



HAL
open science

Effet combiné de l'exercice physique et de la vitamine D en prévention tertiaire sur des souris c57bl/6j soumises à un régime riche en graisse et en sucre : aspects métaboliques de l'obésité et des désordres associés

Alexandra Marziou

► To cite this version:

Alexandra Marziou. Effet combiné de l'exercice physique et de la vitamine D en prévention tertiaire sur des souris c57bl/6j soumises à un régime riche en graisse et en sucre : aspects métaboliques de l'obésité et des désordres associés. Santé. Université d'Avignon, 2021. Français. NNT : 2021AVIG0362 . tel-03131417

HAL Id: tel-03131417

<https://theses.hal.science/tel-03131417>

Submitted on 4 Feb 2021

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.



THÈSE DE DOCTORAT D'AVIGNON UNIVERSITÉ

École Doctorale N° 536
Agrosciences et Sciences

Spécialité / Discipline de doctorat :
Physiologie

Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire

Présentée par
Alexandra Marie MARZIOU

Effet combiné de l'exercice physique et de la vitamine D en prévention tertiaire sur des souris c57bl/6j soumises à un régime riche en graisse et en sucre

Aspects métaboliques de l'obésité et des désordres associés

Soutenue publiquement le 15/01/2021 devant le jury composé de :

Mme Pascale DUCHÉ	PU, Université de Toulon	Rapportrice
Mr Frédéric CAPEL	CR-HDR INRAE, Université Clermont Auvergne	Rapporteur
Mme Sophie ANTOINE	MCF-HDR, Université d'Avignon	Examinatrice
Mr Mohamed Yassine MALLEM	PU, École vétérinaire Oniris Nantes	Examineur
Mme Catherine RIVA	MCF-HDR, Université d'Avignon	Directrice de thèse
Mr Jean-François LANDRIER	DR INRAE, Université d'Aix Marseille	Directeur de thèse



« Je suis le maître de mon destin, le capitaine de mon âme. »

A mon Papie Jean et à Pépé Milo,

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Agnès VINET de m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse au sein de son laboratoire et pour ces précieux conseils lors des comités de thèse.

Je tiens à remercier Pascale DUCHÉ et Frédéric CAPEL d'avoir accepté de rapporter ce travail de thèse.

Merci également aux membres du jurys, Sophie ANTOINE et Yassine MALLEM de me faire l'honneur d'être examinateurs de cette thèse.

Merci à ma directrice Catherine RIVA, d'avoir cru en mes capacités pour réaliser cette thèse. Je me souviens encore de ce coup de fil dans le train après l'audition à l'école doctorale où tu m'annonçais que j'avais décroché la bourse, je n'y croyais pas. Merci de m'avoir accompagnée tout au long de cette thèse, tant sur le plan scientifique que personnel. J'ai beaucoup appris à tes côtés et je t'en remercie sincèrement.

Merci à mon directeur Jean-François LANDRIER, de m'avoir encadrée durant ces 3 années de thèse. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité dès que j'en avais besoin. Merci également pour ta passion pour la science, tu m'as beaucoup appris et j'ai vraiment apprécié travailler avec toi. Patience et optimisme sont de pairs et j'admire la façon donc tu les maîtrises. A plusieurs reprises, j'étais si négative quand aucun effet n'était observé. J'étais entêtée à toujours les dénigrer et tu m'as appris à voir les choses d'une toute autre façon et pour l'avenir je retiendrais que « pas de résultat est un résultat ».

Merci à Philippe OBERT, pour ton implication dans le projet et pour ta passion pour la cardio. Même si au début je ne comprenais pas tout sur les relectures, ta patience et ta pédagogie ont fini par porter leurs fruits.

Merci à Martine DESROIS, pour son expertise et sa bienveillance lors des comités de thèse.

Merci à Séverine SUCHAIL pour tous ces moments passés ensemble lors des TP d'enzymologie. Ce fut un plaisir d'enseigner à tes côtés. Tu auras réussi à me faire renouer des liens avec la biochimie qui à la base n'était pas vraiment ma spécialité. Ce monitorat aura été comme un second souffle à chaque moment de la thèse.

Merci à toute l'équipe du LaPEC, Cyril, Guillaume et Greg, pour leur humour, à la fois drôle et mystérieux. Yannick, c'est toujours un plaisir de te croiser et de discuter avec toi. Sandrine, pour ta disponibilité et ton aide au labo. Florence pour tes conseils fashionistas. Claire pour tes histoires et anecdotes de bébé Léon. Stéphane, pour ta bonne humeur et cette montée du Ventoux, jamais je n'aurai cru y arriver. Merci à vous Natacha, Marielle, Mercedes, Stéphanie et Jenny pour votre gentillesse, votre chaleur et vos mots qui réconfortent à n'importe quel moment.

Merci à la team LaPEC Doc. Tout d'abord, toi Saloua, tu es une personne avec un cœur énorme et je te remercie pour ton accueil si chaleureux lors de mes débuts en thèse. Clothilde, ma binôme bretonne sans qui ce long protocole n'aurait pas été si agréable à mener. Doria, ton calme et ta patience d'or m'épateront toujours, je te souhaite tout le meilleur pour l'avenir. Mathilde, toujours de bonne humeur, merci pour avoir été avec Doria de supers partenaires pour notre choré fitness (d'ailleurs elle restera dans les dossiers de l'Université...). Sydney, tes imitations dignes d'une comédie dramatique sont toujours plus drôles les unes que les autres et tes bons plans pendant les congrès (la vidéo chameau restera à tout jamais). Antoine, pour ton aide dans cette dernière ligne droite, ton humour sans limite et tes chansons grasses. Matthieu, le dernier arrivé et en plus du Nord (en force !), je te souhaite bon courage pour ta thèse. Justine, merci pour ces sorties restos dès que tu venais en Avignon, c'était toujours un plaisir de te voir en dehors du labo. Gaëtan, pour ta gentillesse, tes blagues (pas vraiment drôles) et ta façon d'être, si unique et parfois incompréhensible. Je te souhaite de trouver enfin le pot à ton couvercle (j'espère que tu comprendras cette expression). Charly, pour ton coaching professionnel mais aussi personnel, tu es et tu feras un coach de vie hors pair avec tes brunch healthy, tes citations et ton mental de fer. Je n'oublie pas ton courage lors de la montée du Ventoux où tu as accepté de trainer le boulet que je suis jusqu'en haut. Enfin un merci tout particulier à Cécile, mon acolyte montilienne, pour toutes ces nuits airbnb marseillaises et avignonaises. On en aura passé du temps à papoter à chaque apéro (pauvre Robin !). Tiens bon pour cette dernière ligne droite et compte sur moi pour être au premier rang le jour J ! Léchouille à Parker.

Merci aux stagiaires avec qui j'ai eu plaisir à travailler. Julie, les anneaux d'aorte n'ont plus de secret pour toi et même eux se sont mis à être trilingue entre l'espagnol, l'anglais et le français... Ils étaient un peu tendus quand même ! Merci pour ton énergie et pour tes sonnettes chez moi. Juliette, pour avoir été une étudiante si

sérieuse et impliquée dans les relectures d'échos, je te souhaite plein de belles choses. Benjamin, mon petit stagiaire préféré (c'est bien parce que tu as été le seul !). Merci pour ces après-midi à l'animalerie et pour ton aide lors du protocole, ton âme de Staps a su être aux petits soins avec nos petites souris sportives. Bonne chance pour tous tes projets, je n'ai aucun doute sur le fait que tu réussiras. Merci également à ceux qui étaient présents, Max, pour tes blagues et tes techniques de drague inégalables. Elsa, pour ces bons moments passés en dehors du labo. Lisa, pour ton petit grain de folie et ta joie de vivre. Merci pour ces moments goûters et ces soirées, le redzone n'aura pas eu raison de nous. JB, pour ta moustache à la Dali (il faut déjà le souligner), pour tes histoires plus farfelues les unes que les autres et pour les afterworks fort sympathiques. Ce sera bientôt ton tour et je sais que tu le feras avec brio.

Merci à Marilo, ma binôme espagnole de thèse, pour nos discussions mi espagnol mi français. Ce fut un plaisir de collaborer avec toi et j'espère qu'à l'avenir on se reverra (un petit voyage à Elche peut-être ?).

Merci à l'équipe du C2VN, Flavie, Lourdes, Lorraine, Imène, Nicole, Eva pour votre accueil à chaque venue au labo et ses pauses toutes aussi gourmandes les unes que les autres. Julien, merci d'avoir pris le temps de me former et pour nos discussions en tout genre. Charlène, merci pour ta disponibilité, ta gentillesse incarnée et nos after labos au Vieux Port.

Merci à toutes les personnes formidables que j'ai pu rencontrer au camp d'Hiver CMDO au Canada. Clara, Alexis, Florent, Abderrahim, Arianne, Ina, Isabelle, Camille, Emilie, Danie, Maharajah, Alexandre, Hasan. Cette semaine au pays du froid aura été riche en présentations scientifiques mais aussi en nombreux fous rires. J'en garde de merveilleux souvenirs et j'espère vous revoir vite.

Merci à mes amis Avignonnais. Lucy et Maud, vous êtes exceptionnelles les filles. Vous avez fait de Mamma Corsica une deuxième maison pour moi. Hoël et Chloé, les expatriés bretons toujours au rendez-vous pour l'apéro ou un petit repas ensemble. Maintenant vous êtes de l'autre côté de l'Océan et vous me manquez énormément.

Merci à mes amis bretons et d'ailleurs, d'avoir toujours été présents et pour tous les moments passés ensemble à chaque remontée Bretonne. Ces instants sont de plus en plus rares avec la distance, mais encore plus précieux à mes yeux. Vivement les prochains.

Enfin, je ne remercierai jamais assez ma famille de m'avoir toujours soutenue. Papa, maman, merci d'avoir toujours été là, je ne serais pas arrivée si loin sans vous. Ma petite sœur, ma chouchoune, merci d'être présente et d'être toi. L'année 2020 aura été forte en émotions et je te remercie de m'avoir donné cette chance d'être marraine. Je vous aime. Merci à ma grand-mère, Marraine, Tonton et Léna. Merci à ma belle-famille pour leur soutien et leur accueil. Je suis heureuse de vous avoir comme deuxième famille et les réunions familiales sont toujours bien trop courtes à mon goût.

Merci à toi Jonathan, mon amour. Merci pour tout. Tu es depuis plusieurs années maintenant mon partenaire de vie sans qui je ne serais arrivée jusqu'au bout de cette thèse. Merci de m'avoir supportée, de m'avoir toujours épaulée à chaque moment de doute et d'être au quotidien une personne si attentionnée. On forme une belle équipe et je ne demande qu'à ce que l'avenir nous réserve plein de belles choses, où que l'on sera. Je t'aime. Je n'oublie pas notre petite Mûre, toujours là pour des câlins et pour nous divertir.

Mention spéciale à mes petites souris, sans qui ce projet de thèse n'aurait pu aboutir. Merci de vous être sacrifiées pour ma recherche. J'espère vous avoir fait mener la vie paisible que vous méritiez.

Les études menées dans le cadre de ce manuscrit de thèse ont été réalisées au sein du laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire (LaPEC) de l'Université d'Avignon, en codirection avec le laboratoire du Centre de recherche en CardioVasculaire et Nutrition de l'Université Aix-Marseille. Ces travaux ont été rendus possible par le financement ministériel de l'école doctorale ED536 « Agrosiences et Sciences » d'Avignon.

Sommaire

Liste des publications	15
Liste des communications	16
Liste des abréviations	19
Liste des figures	21
Liste des tableaux.....	22
Introduction générale	23
Revue de littérature	27
1. L'obésité	29
1.1. Définition	29
1.2. Données épidémiologiques	31
1.3. Causes du déséquilibre énergétique	33
1.3.1. Facteurs génétiques	33
1.3.2. Facteurs épigénétiques.....	35
1.3.3. Facteurs environnementaux.....	35
1.4. Complications associées à l'obésité.....	36
1.4.1. Insulino-résistance, diabète de type 2.....	36
1.4.2. Stéatose hépatique	38
1.4.3. Syndrome métabolique	40
2. Le tissu adipeux	40
2.1. Description et composition du tissu adipeux	41
2.2. Localisation du tissu adipeux	44
2.3. Rôles du tissu adipeux	47
2.4. Dysfonctions adipocytaires retrouvées lors de l'obésité	49
2.5. Ectopisme	54
3. Prise en charge de l'obésité	58
3.1. Les traitements médicamenteux.....	59
3.2. Les interventions chirurgicales	59
3.3. Les interventions sur le mode de vie	60
3.3.1. Restriction des apports caloriques	60
3.3.2. Promotion de l'activité physique.....	61

3.3.3. Apport en micronutriments	62
3.3.4. Stratégies alternatives.....	62
4. La vitamine D	63
4.1. Sources	63
4.2. Recommandations	65
4.3. Insuffisance en vitamine D	66
4.4. Supplémentations en vitamine D.....	68
4.5. Métabolisme.....	69
4.6. Mécanismes d'action.....	71
4.7. Sites de stockage et tissus cibles.....	72
4.8. Effets de la vitamine D sur la biologie du tissu adipeux.....	73
4.8.1. Métabolisme de la vitamine D	73
4.8.2. Effets anti-inflammatoires de la vitamine D	74
4.9. Relation vitamine D et obésité.....	75
4.10. Effet de la vitamine D sur l'obésité	75
4.10.1. Etudes cliniques	75
4.10.2. Etudes expérimentales.....	76
4.11. Effet de la vitamine D sur l'insulino-résistance.....	79
4.11.1. Etudes cliniques	79
4.11.2. Etudes expérimentales.....	80
4.12. Effet de la vitamine D sur la stéatose hépatique	81
4.12.1. Etudes cliniques	82
4.12.2. Etudes expérimentales.....	82
5. L'exercice physique.....	83
5.1. Définition	84
5.2. Différentes formes d'activité physique.....	84
5.3. Recommandations nationales	87
5.4. Situation actuelle de l'activité physique en cas d'obésité	88
5.5. Effet de l'activité physique d'un point de vue clinique.....	89
5.6. Effet de l'activité physique dans des modèles expérimentaux	91
5.7. Lien activité physique et vitamine D.....	95
Objectifs de thèse.....	97
Matériels et Méthodes	101

1.	Expérimentation animale	103
2.	Mesures longitudinales.....	105
2.1.	Suivi des apports alimentaires	105
2.2.	Mesure des distances parcourues.....	105
2.3.	Suivi morphologique.....	105
2.4.	Suivi de l'homéostasie glucidique.....	105
2.5.	Mesure de la vitesse maximale aérobie	106
3.	Sacrifice des animaux	106
4.	Mesure des concentrations plasmatiques de vitamine D ₃	107
5.	Extraction des ARN totaux	107
6.	Transcription inverse	107
7.	PCR quantitative en temps réel.....	108
8.	Réalisation et coloration des coupes histologiques	108
9.	Analyses statistiques.....	108
	Résultats	111
1.	Article n°1 : Vitamin D supplementation improves adipose tissue inflammation and reduces hepatic steatosis on obese c57bl/6J mice	113
1.1.	But de l'étude	113
1.2.	Principaux résultats.....	114
1.3.	Article	115
2.	Article n°2 :Combined effect of voluntary physical exercise and vitamin D supplementation on diet obese C57BL/6J mice.....	129
2.1.	But de l'étude	129
2.2.	Principaux résultats.....	129
2.3.	Article	131
	Discussion générale	167
	Conclusion et Perspectives	179
	Conclusion générale.....	181
	Perspectives.....	181
	Références	183
	Annexes	217

Liste des publications

Publications acceptées dans des revues à impact factor

Marziou, A., Philouze, C., Couturier, C., Astier, J., Obert, P., Landrier, J.-F., and Riva, C. (2020). Vitamin D Supplementation Improves Adipose Tissue Inflammation and Reduces Hepatic Steatosis in Obese C57BL/6J Mice. *Nutrients* 12, 342. (IF = 4.17).

Risdon, S., Meyer, G., Marziou, A., Riva, C., Roustit, M., and Walther, G. (2020). Artificial Sweeteners Impair Endothelial Vascular Reactivity: Preliminary Results In Rodents. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* (IF = 3,7).

Publications en cours

Marziou A., Aubert B., Couturier C., Astier J., Philouze C., Obert P., Landrier J-F., Riva C. Combined effect of physical exercise and vitamin D supplementation on diet obese C57BL/6J mice. (*Soumis dans Medicine & Science in Sports and Exercise, IF = 4.3*).

Philouze, C., Martin, J-C., Riva, C., Marziou, A., Couturier, C., Berton, T., Astier, J., Defoort, C., Landrier, J-F., Obert, P. Vitamin D3 supplementation alleviates left ventricular dysfunction in a mouse model of diet-induced type 2 diabetes: potential involvement of cardiac lipotoxicity modulation. (*Accepté dans Cardiovascular Drugs and Therapy, IF = 4.07*).

Liste des communications

Communications orales

Marziou, A., Philouze, C., Couturier, C., Astier, J., Obert, P., Landrier, J.-F., et Riva, C. 2020. Effet d'une supplémentation en vitamine D sur l'inflammation du tissu adipeux et la stéatose hépatique chez des souris C57BL/6J obèses. Réunion Société Québécoise de Lipidologie, Nutrition et Métabolisme. Réseau CardioMétabolique Diabète et Obésité Canadien.

Marziou, A., Philouze, C., Couturier, C., Astier, J., Obert, P., Landrier, J.-F., et Riva, C. 2019. Effet d'une supplémentation en vitamine D sur l'inflammation du tissu adipeux et la stéatose hépatique chez des souris C57BL/6J obèses. Journées Francophones de Nutrition.

Communications avec acte

Thèse 180s. 2020. Camp d'hiver du réseau CardioMétabolique Diabète et Obésité Canadien, Magog Canada.

Thèse 180, sous forme de battle. 2019. Séminaire Centre de recherche en CardioVasculaire et Nutrition. Villa Gaby.

Participation aux Doctoriales de l'Ecole Doctorale ED536. 2018. Présentation du projet de thèse et des résultats préliminaires.

Participation à « Un chercheur à ma table ». 2018. Vulgarisation scientifique du sujet de thèse avec parution dans le journal *Echosciences PACA et Le Dauphiné*.

Communications par affiche

Marziou, A., Aubert B., Couturier C., Astier J., Philouze, C., Obert, P., Landrier, J-F., and Riva, C. (2021). L'exercice physique associé à la supplémentation en vitamine D réversent la stéatose hépatique et la résistance à l'insuline induites par un régime obésogène chez des souris C57bl/6j. Soumis AFERO 2021.

Marziou, A., Tourn, J., Philouze, C., Obert, P., Landrier, J-F., and Riva, C. (2019). Effect of a 15-weeks intervention of physical activity and vitamin D supplementation on type 2 Diabetes prevention in obese c57/bl6 mice. Arch. Cardiovasc. Dis. Suppl. 11, 199.

Philouze, C., Martin, J-C., Riva, C., Marziou, A., Couturier, C., Berton, T., Astier, J., Defoort, C., Landrier, J-F., Obert, P. (2019). Vitamin D3 supplementation alleviates left ventricular dysfunction in a mouse model of diet-induced type 2 diabetes by improving cardiac lipid profile. Arch. Cardiovasc. Dis. Suppl.

Risdon, S., Strock, E., Meyer, G., Marziou, A., Gayrard, S., Riva, C., and Walther, G. (2019). Chronic non-nutritive sweeteners consumption alters lipid metabolism, body composition and arterial vasomotor function: Preliminary data in a healthy rat population. Arch. Cardiovasc. Dis. Suppl. 11, 199–200.

Marziou, A., Tourn, J., Philouze, C., Obert, P., Landrier, J-F., et Riva, C. Effet de l'exercice physique associé à une supplémentation en vitamine D sur des souris c57/bl6 obèses. Obésité, Volume 13. 2019.

Liste des abréviations

25(OH)D : 25-hydroxyvitamine D₃

1,25(OH)₂D : 1,25-dihydroxyvitamine D₃

ACC : Acétyl-CoA Carboxylase

ACO : Acétyl-CoA Oxydase

AG : Acide Gras

AGNE : Acide Gras Non Estérifié

AMP : Adenosine MonoPhosphate

AMPK : AMP-activated Protein Kinase

CCL2 : Chemokine Ligand 2

CNV : Copy Number Variant

EX : Exercice physique

FAS : Fatty Acid Synthase

HFS : High Fat high Sucrose diet

HOMA-IR : Homeostasis Model
Assessment of insulin resistance

IMC : Indice de Masse Corporelle

IL : Interleukine

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

MCP1 : Monocyte Chemoattractant
Protein 1

miR : Micro-ARN

NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver
Disease

NC : Normal Chow diet

NF- κB : Nuclear Factor κB

qPCR : Quantitative Polymerase Chain
Reaction

RXR : Retinoid X Receptor

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

TAsc : Tissu Adipeux sous-cutané

TAv : Tissu Adipeux viscéral

TAB : Tissu Adipeux Brun

TG : Triglycérides

TNF-α : Tumor Necrosis Factor α

VD : Vitamine D

VDR : Vitamin D Receptor

VDRE : Vitamin D Response Element

VDBP : Vitamin D Binding Protein

VMA : Vitesse Maximale Aérobie

Liste des figures

Figure 1 : Chiffres de l'obésité dans le monde par l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) en 2017.....	32
Figure 2 : Prévalence (%) de l'obésité en fonction du sexe et de l'âge (Données issues de la cohorte Constances).....	33
Figure 3 : Réponse de l'insuline en conditions normales et en conditions pathologiques.....	38
Figure 4 : Développement et progression de la NAFLD.....	39
Figure 5 : Tissu adipeux et adipokines.....	41
Figure 6 : Structure et composition du tissu adipeux.....	42
Figure 7 : Origines cellulaires des adipocytes en fonction de leur précurseur.....	42
Figure 8 : Changements phénotypiques des adipocytes en réponse à des modifications d'environnement.....	44
Figure 9 : Répartition des différents tissus adipeux chez l'Homme (d'après Wronska and Kmiec, 2012).....	44
Figure 10 : Répartition du tissu adipeux en fonction de sa localisation : obésité gynoïde et androïde (Vague, 1947).....	45
Figure 11 : Localisations anatomiques du tissu adipeux brun et beige chez la souris et l'Homme (d'après Ikeda et al., 2018).....	46
Figure 12 : Étapes de lipogenèse et de lipolyse dans l'adipocyte.....	48
Figure 13 : Thermogenèse dans l'adipocyte brun (Adapté de Merlin et al., 2016).....	49
Figure 14 : (A) Principales voies de signalisation de l'insuline. (B) Inhibition du signal insulinique. (Adapté de Capeau, 2003).....	53
Figure 15 : Différents types de dépôts ectopiques (Gaborit et al., 2013).....	55
Figure 16 : Sécrétions de molécules par le tissu adipeux, le muscle et le foie et interactions.....	56
Figure 17 : Structure des différentes formes de la vitamine D (Adapté de Landrier et al., 2012).....	64
Figure 18 : Métabolisme général de la vitamine D.....	71
Figure 19 : Schéma expérimental.....	103
Figure 20 : Composition des différents régimes.....	104
Figure 21 : Schéma récapitulatif. Modulation des paramètres observés au cours de l'obésité par l'exercice et la vitamine D.....	177

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification internationale de l'indice de masse corporelle chez l'adulte.....	29
Tableau 2 : Taux de masse grasse par catégorie (Selon l'American Council on Exercise).	30
Tableau 3 : Principales caractéristiques des adipocytes blancs, bruns et beiges.....	43
Tableau 4 : Rôle des adipocytes blancs et bruns.	47
Tableau 5 : Fonctions des différents médiateurs inflammatoires.....	51
Tableau 6 : Effets des adipo-myokines sur le muscle squelettique et le tissu adipeux.	57
Tableau 7 : Principales sources alimentaires de vitamine D3 (1µg = 40 UI) (D'après la table du Centre d'informations sur la qualité des aliments, 2012).	65
Tableau 8 : Références nutritionnelles en vitamine D conseillées pour la population (Issues des données VNR de l'EFSA, 2016).....	66
Tableau 9 : Valeurs déterminant les différents statuts en vitamine D.	67
Tableau 10 : Principaux sites de stockage de la vitamine D (D'après Heaney et al. 2009).	73
Tableau 11 : Effets de la supplémentation en vitamine D dans des programmes de perte de poids chez la personne obèse.....	77
Tableau 12 : Effets de la supplémentation en vitamine D dans des programmes de perte de poids chez la personne obèse (Suite).	78
Tableau 13 : Exemples d'activités physiques classées en fonction de leur intensité, pour un adulte moyen (homme ou femme de 30-40 ans de poids normal, pratiquant une activité physique au moins modérée, 5 jours par semaine ou plus).	86
Tableau 14 : Effets de l'activité physique dans des programmes de perte de poids chez la personne obèse.....	90
Tableau 15 : Effets de l'activité physique dans des programmes de perte de poids chez l'animal.	92

Introduction générale

L'industrialisation des sociétés actuelles a conduit à une évolution du mode de vie de l'Homme qui se caractérise notamment par une surconsommation d'aliments riches en graisse et en sucre et une augmentation de la sédentarité. Ces modifications comportementales ont ainsi favorisé l'émergence de troubles métaboliques tels que l'obésité. Caractérisée comme la première épidémie non contagieuse selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'obésité représente un enjeu majeur de santé publique avec près de 650 millions d'adultes considérés comme obèses dans le monde en 2016. En effet, elle participe à la survenue de nombreuses comorbidités telles que le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et certains cancers. L'obésité résulte d'un déséquilibre de la balance énergétique et se traduit par une accumulation excessive de graisses dans l'organisme. Cette accumulation de tissu adipeux va provoquer des modifications structurales comme l'hypertrophie ou encore sécrétoires avec une altération de la libération d'adipokines. Ceci va favoriser la mise en place d'un statut inflammatoire de bas-grade ainsi que le développement de l'insulino-résistance. De plus, une fois les capacités de stockage atteintes, le surplus d'acides gras s'accumule sous forme de dépôts ectopiques, au niveau du foie et des muscles par exemple. Ainsi, ces différents organes vont être étroitement reliés et leur fonctionnement dépendant d'une activité métabolique saine.

Depuis de nombreuses années, la prise en charge de l'obésité repose principalement sur les interventions médicamenteuses et chirurgicales. Cependant, ces méthodes demeurent invasives pour les patients et coûteuses financièrement. Il apparaît ainsi nécessaire d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans ce type de population afin de pouvoir proposer des stratégies thérapeutiques efficaces et plus naturelles, tout en privilégiant la pratique d'une activité physique régulière.

L'objectif de ma thèse est d'étudier les effets combinés de l'exercice physique volontaire et de la supplémentation en vitamine D sur l'obésité et les désordres métaboliques associés. Ce mémoire comporte plusieurs sections et débute par une étude bibliographique. Cette revue de littérature permet de rappeler l'importance de la prise en charge de l'obésité et de détailler parmi elle, l'exercice physique et la vitamine D. La partie suivante décrit les matériels et méthodes mis en œuvre au cours de notre étude expérimentale. Les résultats de ce travail seront décomposés en deux principales études sous forme d'articles. Enfin, la dernière partie concernera une discussion générale ouvrant sur plusieurs perspectives scientifiques.

Revue de littérature

1. L'obésité

1.1. Définition

L'obésité est définie comme une accumulation anormale et excessive de masse adipeuse, conduisant au stockage des graisses et pouvant nuire à la santé. Elle résulte d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques pouvant être expliqué par la surconsommation ou non, d'aliments riches en graisse et en sucre ainsi que d'une modification du mode de vie avec une augmentation de la sédentarité (Pijl, 2011). La prévalence de l'obésité varie en fonction de différents paramètres : l'âge, le sexe, le statut socio-économique mais aussi ethnique, par les pratiques culturelles (étude ObEpi 2012, ROCHE).

L'indice de masse corporelle (IMC) est un des outils cliniques le plus répandu pour estimer le degré d'obésité. Il correspond au ratio du poids corporel (en kilogrammes, kg) d'un individu divisé par la taille élevée au carré (en mètre carré, m²). A partir des valeurs obtenues par le calcul de l'IMC, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a établi une classification du degré d'obésité allant de la maigreur à l'obésité massive (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification internationale de l'indice de masse corporelle chez l'adulte.

IMC (kg.m ⁻²)	Classification d'après l'OMS
≤ 18,5	Maigreur
18,5 – 24,9	Normal
25 – 29,9	Surpoids
30 – 34,9	Obésité modérée
35 – 39,9	Obésité sévère
≥ 40	Obésité massive

Un individu est considéré comme obèse lorsque son IMC est supérieur à 30 kg.m⁻². En revanche, cette estimation de masse grasse ne doit rester qu'un simple outil d'évaluation. Comme il ne prend en compte aucun autre paramètre, tel que le vieillissement ou la pratique d'exercice physique à haut niveau, les conditions physiologiques induites par ces changements peuvent provoquer des hausses de

l'IMC et pour autant ne pas révéler une obésité pathologique.

Il est possible d'évaluer l'obésité abdominale par d'autres paramètres anthropométriques comme le tour de taille (Waist Circumference WC). Les seuils de référence sont aux environs de 100 cm chez l'homme et de 88cm chez la femme. Le rapport du tour de taille sur hanches (Waist-to-hip ratio WHR) a permis d'établir d'autres valeurs de références et lorsque ce rapport est supérieur à 0,9 chez l'homme et 0,85 chez la femme, l'obésité abdominale est confirmée. Il a été montré qu'il existait un lien entre l'obésité abdominale estimée par le tour de taille et l'hypertension artérielle (Poirier et al., 2005). De plus, une autre étude avait rapporté une association entre les niveaux plasmatiques de cytokines et différents paramètres comme l'IMC, le WC, le WHR et les triglycérides (Lwow and Bohdanowicz-Pawlak, 2020). En revanche, ces outils d'évaluation ne tiennent pas compte des différences de répartition de la masse grasse. D'autres techniques permettent de quantifier les rapports masse grasse/masse maigre. La mesure des plis cutanés grâce à une pince à pli réalisée à différents endroits du corps (bras, dos, hanche, jambe) permet d'évaluer la graisse sous-cutanée. Les balances à impédancemètre mesurent le pourcentage de masse grasse par la génération d'un courant électrique imperceptible à travers le corps dont la résistance est directement liée au taux de matière grasse qu'il contient. Il est également possible d'estimer la proportion de tissus adipeux d'une personne adulte (entre 15 et 50 ans) par le calcul de l'indice de masse grasse. Cette formule est dérivée de l'IMC et fonctionne selon ce calcul : $((1.20 \times \text{IMC}) + (0.23 \times \text{âge}) - (10.8 \times \text{sexe (femme} = 0, \text{ homme} = 1))) - 5.4$. Cette valeur doit être comprise entre 15 et 20% chez les hommes et entre 25 et 30% chez les femmes et peut varier en fonction des catégories et groupes de personnes (Tableau 2).

Tableau 2 : Taux de masse grasse par catégorie (Selon l'American Council on Exercise).

	Femme	Homme
Minimum vital	10-13%	2-5%
Athlétique	14-20%	6-13%
En forme	21-24%	14-17%
Moyen	25-31%	18-24%
Obèse	≥ 32%	≥ 25%

Les techniques d'imagerie comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou encore le scanner permettent d'obtenir des données plus pertinentes dans la mesure du degré de l'obésité mais restent difficiles à mettre en place dans des études épidémiologiques impliquant un nombre d'individus conséquent.

1.2. Données épidémiologiques

En 2016, d'après les données de l'OMS, 1,9 milliards d'adultes étaient en surpoids dont 650 millions d'obèses. L'obésité touche également les enfants avec une estimation inquiétante puisque 340 millions d'enfants et d'adolescents âgés de 5 à 19 ans étaient en surpoids et ou obèses en 2016 (Figure 1) et 38 millions d'enfants de moins de 5 ans étaient en surpoids ou obèses en 2019. Depuis 1975, ces chiffres ont triplé et ne cessent de croître. Ces augmentations, autrefois considérées comme spécifiques des pays à haut revenu, concernent également les pays à revenu faible ou intermédiaire et notamment en milieu urbain. D'après l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE), d'ici 2030 près de la moitié des adultes américains pourraient être obèses.

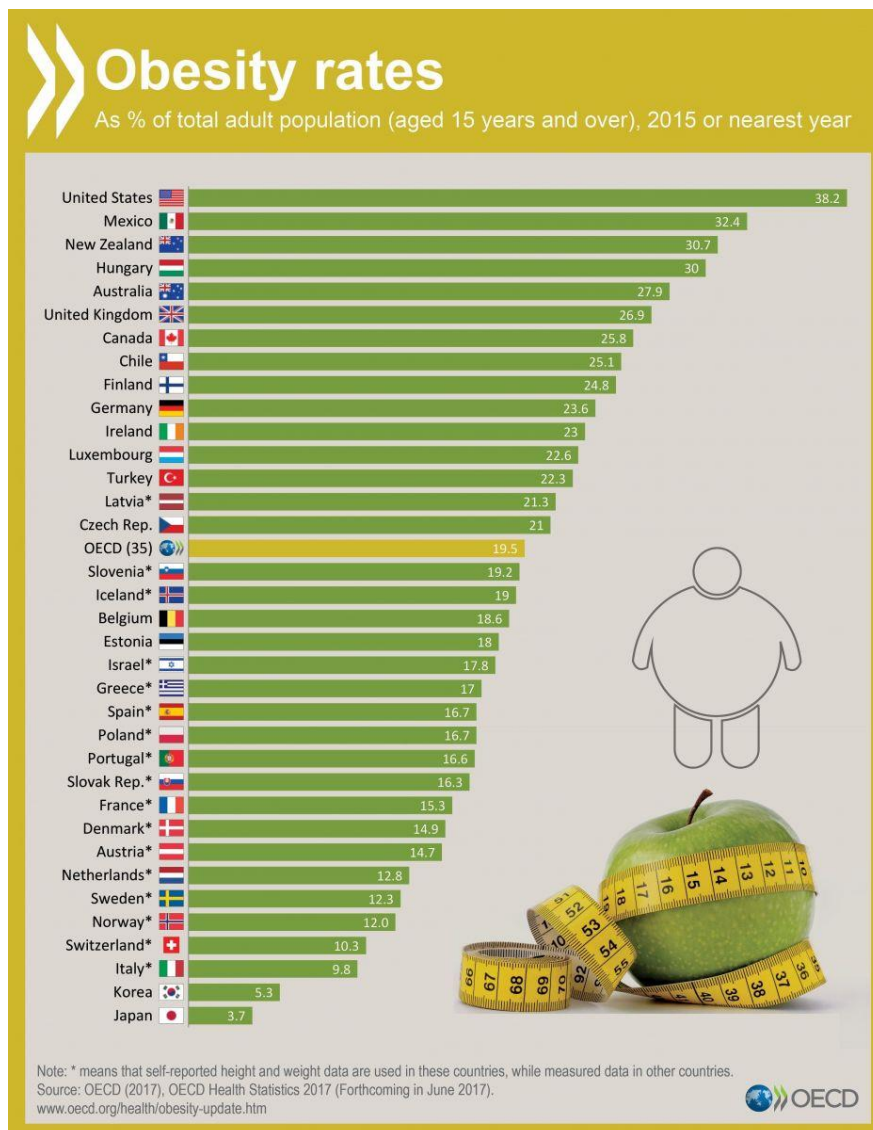


Figure 1 : Chiffres de l'obésité dans le monde par l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) en 2017.

En France, l'INSERM en collaboration avec les laboratoires ROCHE a mis en place une étude nommée ObEpi qui a pour objectif d'évaluer la prévalence du surpoids et de l'obésité depuis 1997 et ce, tous les trois ans. Les dernières données épidémiologiques à avoir été publiées datent de l'automne 2012, regroupant près de 26 000 individus, ont montré que 32,3% des Français adultes âgés de plus 18 ans et plus étaient en surpoids et 15% présentaient une obésité. En 2016, la cohorte Constances regroupant environ 29 000 adultes âgés de 30 à 69 ans a permis d'estimer la prévalence de l'obésité en France (Matta et al., 2016). Les données récoltées sont semblables à celles obtenues dans l'étude ObEpi en 2012 (15,3% chez les hommes et 16,8% chez les femmes de 30-54 ans) et varient en fonction du sexe et de l'âge (Figure 2).

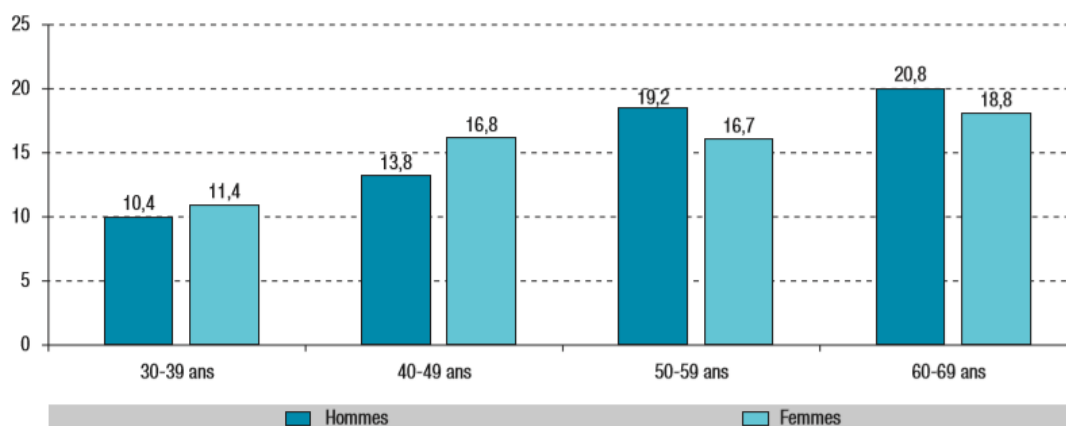


Figure 2 : Prévalence (%) de l'obésité en fonction du sexe et de l'âge (Données issues de la cohorte Constances).

L'obésité est la cinquième cause de mortalité et représente donc un enjeu majeur de santé publique puisque 2,8 millions de personnes en meurent chaque année. Dans ce contexte, de nombreuses stratégies d'interventions ont été mises en place afin de réduire le nombre de personnes touchées par cette pathologie émergente. L'OMS a établi une stratégie mondiale pour l'alimentation, l'exercice physique et la santé et a été adoptée par l'Assemblée Mondiale de la Santé en 2014.

1.3. Causes du déséquilibre énergétique

L'obésité peut être causée par différentes modifications intrinsèques ou extrinsèques. En effet, des modifications génétiques, épigénétiques ou encore des facteurs environnementaux peuvent être à l'origine de l'apparition de l'obésité.

1.3.1. Facteurs génétiques

L'obésité peut être classée en différents sous-groupes : l'obésité monogénique, syndromique, polygénique ou simple (Herrera and Lindgren, 2010). L'obésité monogénique correspond à une obésité sévère en l'absence de retard de développement. L'obésité syndromique peut venir de défauts génétiques silencieux ou d'anomalies chromosomiques provoquant des anomalies développementales organe-spécifique, des dysmorphies ou un retard mental. L'obésité polygénique résulte de l'interaction de nombreux et fréquents variants dans différents gènes, diversement combinés selon les individus et les populations. Pris individuellement, chaque gène a de faibles effets sur le poids corporel tandis que lorsqu'ils sont en interaction avec d'autres gènes et avec des facteurs environnementaux de prédisposition, ces gènes

de susceptibilité contribuent de façon significative à l'obésité. Enfin, l'obésité simple affecte la population globale mais peut être associée à d'autres facteurs de risque cardiovasculaire.

Tout d'abord, l'héritabilité de l'obésité a été mise en évidence dès 1986 (Stunkard et al., 1986) dans une étude sur une large cohorte de jumeaux où la taille, le poids et l'IMC étaient hautement corrélés chez les monozygotes. De plus, lorsque des jumeaux vivaient dans un environnement obésogène, l'héritabilité de l'IMC et de l'adiposité abdominale pouvaient atteindre jusqu'à 70 % (Wardle et al., 2008). Suite à cette mise en évidence, l'hypothèse de l'origine génétique de l'obésité a émergé dans les années 1990 avec la découverte du gène de la leptine chez la souris ob/ob (Zhang et al., 1994). Elle a également été rapportée dans une étude de famille consanguine où deux cousins pakistanais présentaient une déficience congénitale en leptine et a permis de décrire la première forme d'obésité monogénique rapportée chez l'Homme (Montague et al., 1997). Leur obésité sévère a été traitée par leptine recombinante et a nettement diminué montrant ainsi l'implication directe de la leptine dans l'apparition de l'obésité.

D'autres formes monogéniques ont été mises en évidence par la découverte de mutations dans des gènes impliqués dans la prise alimentaire comme le récepteur à la leptine, le récepteur 4 à la mélanocortine (MC4R), la prohormone convertase 1 et la propiomélanocortine (POMC) (Koochakpoor et al., 2016). Cependant, ces mutations représentent des formes rares de mutations avec seulement 3 à 5 % des sujets obèses.

A partir des années 2000, le développement des séquençages à haut niveau a permis de continuer la recherche sur ces obésités génétiques et d'identification de nouveaux gènes candidats en génotypant des milliers de marqueurs génétiques, les « Single Nucleotide Polymorphism » (SNPs) chez des milliers de sujets. Ces Genome Wide Scan (GWS) sont basés sur une approche sans hypothèse préalable où la fréquence de plusieurs milliers de SNPs fréquents répartis dans le génome humain chez les sujets obèses sont comparés aux sujets contrôles. Par cette technique, 35 variants de 33 loci ont été rapportés pour être associés aux variations de l'IMC chez l'enfant mais sont responsables d'une variation de 1,45% de l'IMC (Speliotes et al., 2010). D'autres variations génétiques, appelées Copy Number Variants (CNV) concernent les modifications structurales du génome pouvant être des duplications, délétions ou encore réarrangements chromosomiques. Notamment, une étude

chinoise a retrouvé un CNV qui contribuerait à 1,6% de la variation de l'IMC dans une région du gène régulateur de l'homéostasie énergétique et de la régulation de la prise alimentaire, le Pancreatic Polypeptide Receptor 1 (PPYR1) (Sha et al., 2009).

1.3.2. Facteurs épigénétiques

Les modifications épigénétiques sont aussi responsables de l'apparition de l'obésité par différents mécanismes : la méthylation de l'ADN, la modification des histones ou encore les ARN non-codants et parmi eux les micro-ARNs (miRNAs). Récemment, il a été démontré que les miRNAs ont un rôle dans la biologie du tissu adipeux, la sécrétion et l'action de l'insuline. Lorsque ces derniers se retrouvent dérégulés, le développement de l'obésité a lieu (Landrier et al., 2019a). Notamment, il a été retrouvé une différence d'expression des miR-17-5p et miR-132 dans le tissu adipeux omental de sujets obèses (Heneghan et al., 2011). De plus, une augmentation du miR-21 a été rapportée dans le tissu adipeux blanc de sujets obèses (Keller et al., 2011) et certains miRs sont exprimés de façon différentielle entre le tissu adipeux sous-cutané et viscéral (Klötting et al., 2009).

L'environnement pré- et post-natal semblent également influencer la prédisposition à l'obésité. Des atteintes intra-utérines comme la sous-nutrition, la dysfonction placentaire, l'hypoxie, et l'exposition au tabac pourraient être à l'origine de la prédisposition à l'obésité et à une prise de poids rapide chez des enfants nés prématurément ou avec un faible poids à la naissance (Woo and Patti, 2008). Récemment, il a également été montré que l'obésité gestationnelle avait un impact sur la descendance et de ce fait contribue à la vulnérabilité de certains individus (Levin and Govek, 1998; Poston, 2012) .

1.3.3. Facteurs environnementaux

Enfin, les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans l'émergence de cette pathologie. Tout d'abord, l'industrialisation des sociétés a conduit à une réduction significative de l'activité physique liée à la sédentarisation et une consommation excessive d'aliments caloriques riches en graisse et en sucre mais pauvres en minéraux, micronutriments et vitamines. De plus, une baisse de la qualité et du temps de sommeil, des états de stress et d'anxiété perturbent l'horloge biologique et favorisent ainsi l'installation de l'obésité. Aussi, d'autres facteurs sont connus comme la pollution environnementale, la pression socio-économique, la prise

de médicaments ou bien encore des modifications de la composition du microbiote intestinal (Tremaroli and Bäckhed, 2012).

En effet, des variations de composition des micro-organismes intestinaux jouent un rôle important dans la pathogenèse de l'obésité. Les données chez l'Homme rapportent des différences de composition du microbiote intestinal entre personnes obèses et personnes minces (Crovesy et al., 2020). Notamment, les individus obèses possèdent une flore intestinale marquée d'une dysbiose particularisée par une modification du ratio entre *Firmicutes* et *Bacteroidetes*. De plus, les individus présentant une adiposité globale, une résistance à l'insuline et une dyslipidémie sont caractérisés par une faible richesse bactérienne alors que les individus sains présentent une diversification de la composition du microbiote intestinal (Le Chatelier et al., 2013). Ces travaux réalisés sur 300 patients ont permis de mettre en évidence une réduction de 30 à 70% du nombre de gènes bactériens chez les sujets présentant un IMC supérieur à 45. De plus, le rôle majeur de la composition du microbiote intestinal dans l'obésité a été démontré dans un modèle expérimental de souris axénique. Celui-ci met en exergue qu'une greffe de microbiote fécal provenant d'une souris obèse induisait une prise de poids plus importante que lorsque la greffe provenait d'une souris mince (Ridaura et al., 2013).

1.4. Complications associées à l'obésité

L'obésité est une pathologie complexe favorisant l'apparition de désordres métaboliques et la survenue d'événements cardiovasculaires. L'obésité abdominale notamment est un des facteurs de risque du syndrome métabolique et est associée à de nombreuses comorbidités comme l'hypertension artérielle, les dyslipidémies, le diabète de type 2 provoqué par l'insulino-résistance ou encore certains cancers (sein et côlon notamment). De plus, les perturbations physiologiques lors de l'obésité vont entraîner le développement d'une inflammation chronique de bas-bruit, conduisant à l'affaiblissement du système immunitaire. Ceci aboutit à un plus haut risque d'être touché par des pathologies inflammatoires chroniques. C'est le cas actuellement des personnes obèses qui présentent une fragilité accrue face au SARS-Cov2 et où les complications peuvent s'avérer sévères (Yang et al., 2020).

1.4.1. Insulino-résistance, diabète de type 2

La complication associée à l'obésité la plus connue est l'insulino-résistance

pouvant conduire à l'installation du diabète de type 2. L'accumulation de graisses au niveau intra-abdominal et par conséquent du tissu adipeux viscéral entraîne une intolérance au glucose et une hyperinsulinémie pouvant aller jusqu'à l'insulino-résistance (Lafontan and Berlan, 2003). Dans ce tissu adipeux viscéral, les adipocytes deviennent résistants au stockage supplémentaire de lipides (Gastaldelli et al., 2017). Cela participe à l'installation de l'insulino-résistance systémique et ainsi à une surcharge de lipides circulants entraînant le dépôt ectopique de lipides au niveau du foie, du muscle et du cœur.

L'action de l'insuline sur le métabolisme du glucose permet de caractériser la sensibilité à l'insuline. Les cibles majeurs des effets de l'insuline sont le tissu adipeux, le foie et le muscle (Capeau, 2003). Au niveau de l'organisme, l'insuline va avoir un rôle anabolique majeur consistant à la mise en réserve et l'utilisation des substrats énergétiques par lipogénèse, lipolyse, captation du glucose etc. En conditions physiologiques, le pic insulinique postprandial provoque l'inhibition de la lipolyse et il en résulte une inhibition de la néoglucogénèse hépatique.

L'insulino-résistance correspond à une réponse inadaptée des cellules cibles de l'insuline à des concentrations physiologiques due à un défaut de captation du glucose, une augmentation importante de la production de glucose hépatique et une altération du métabolisme lipidique. Elle se manifeste également par un défaut de transport du glucose dans le muscle squelettique et le myocarde et à un défaut d'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux (Nobecourt, 2008). Il en résulte donc une augmentation du niveau de glucose circulant que les cellules β pancréatiques tentent de compenser par une hyperinsulinémie afin d'assurer le maintien de l'homéostasie glucidique et lipidique (Wang et al., 2004) (Figure 3).

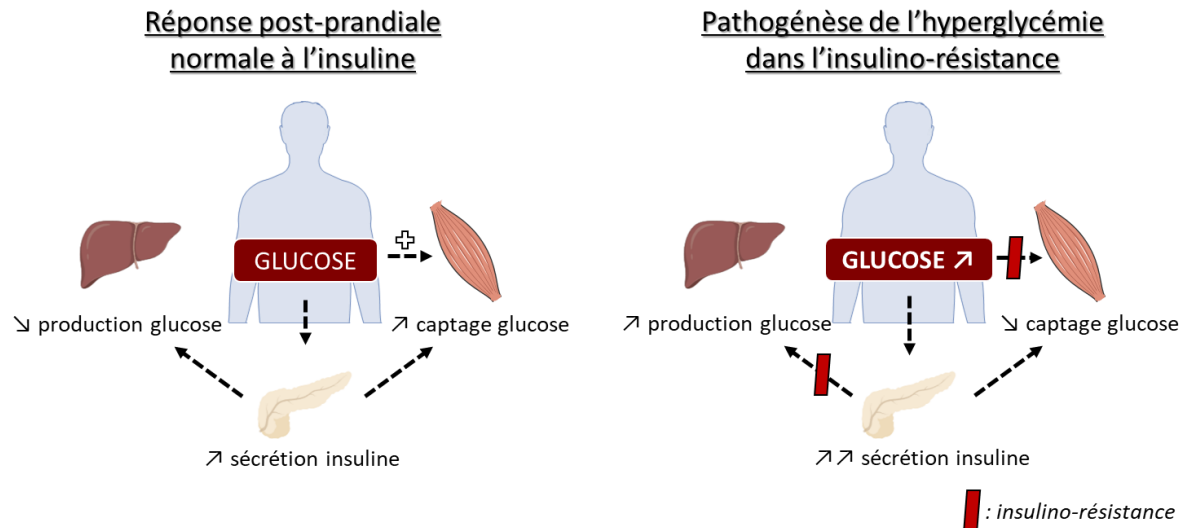


Figure 3 : Réponse de l'insuline en conditions normales et en conditions pathologiques.

Cependant, dans le cas d'une résistance à l'insuline, les cellules pancréatiques sont dans l'incapacité de sécréter suffisamment d'insuline permettant d'assurer le maintien d'une glycémie comprise dans les valeurs physiologiques et provoque donc l'installation du diabète de type 2. Cette perturbation de la signalisation à l'insuline joue un rôle majeur dans le développement du syndrome métabolique.

A l'heure actuelle, le nombre de diabétiques dans le monde est estimé à 463 millions, dont 90-95% de diabétiques de type 2 (International Diabetes Federation, 2019).

1.4.2. Stéatose hépatique

Outre le stockage de graisses au niveau adipeux, des dépôts peuvent également être retrouvés au niveau hépatique. Ces atteintes peuvent provoquer l'apparition de maladies hépatiques. La plus fréquente est la stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD) qui est en augmentation considérable en Europe (Gehrke et al., 2019) et qui est fortement liée à l'épidémie d'obésité. La NAFLD regroupe un large spectre de maladies hépatiques pouvant aller de la simple stéatose, vers la stéatohépatite non-alcoolique (NASH), la fibrose hépatique pouvant entraîner une cirrhose, et finalement l'hépatocarcinome (Willebrords et al., 2015) (Figure 4).

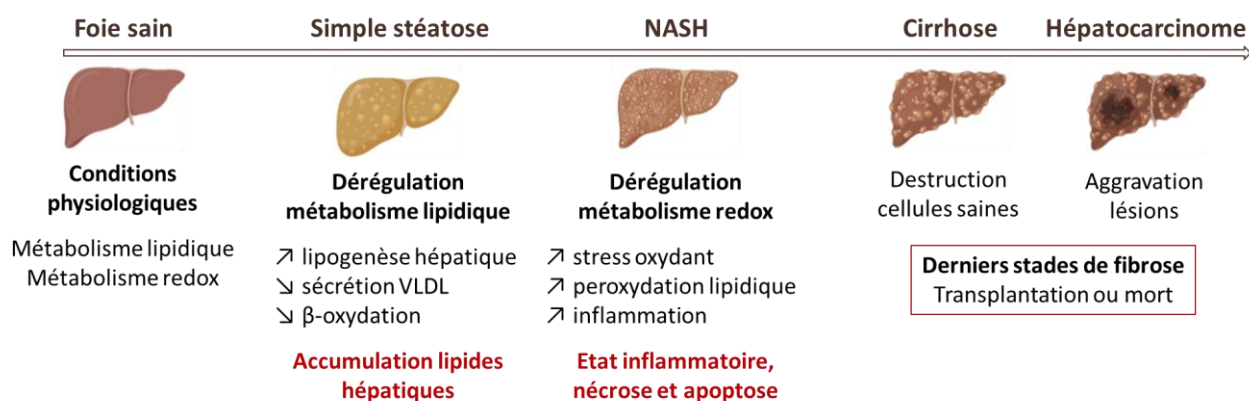


Figure 4 : Développement et progression de la NAFLD. La première étape est la stéatose hépatique simple appelée « steatosis ». Dans cette étape, on retrouve une accumulation de lipides dans le foie en raison de la résistance périphérique à l'insuline. Cette accumulation peut résulter d'une augmentation de la lipolyse par les adipocytes ou par l'augmentation de l'apport en graisse alimentaire, suivie par l'augmentation des acides gras libres. La dysfonction mitochondriale associée à l'insulino-résistance peut aussi induire cette accumulation lipidique par la dysfonction de la beta-oxydation ou bien encore par l'augmentation de la lipogenèse *de novo*. Enfin, la diminution de l'excrétion des triglycérides via la sécrétion de lipoprotéines de basse densité (VLDL) par le foie peut aggraver la stéatose (Koo, 2013).

Ensuite, la seconde étape vers la progression de la NASH est caractérisée par une augmentation du stress oxydant dans les hépatocytes due à une dérégulation du métabolisme redox. Lorsque le stress oxydant hépatique s'intensifie, on retrouve une augmentation de la peroxydation lipidique accompagnée de dommages à l'ADN et l'induction de marqueurs inflammatoires. Tous ces événements contribuent activement au phénomène de fibrose.

La dernière étape représente l'incapacité du foie à renouveler ses cellules. En temps normal, la mort cellulaire stimule la réplication des hépatocytes matures permettant de reconstituer une fonction tissulaire normale. Cependant, le stress oxydant généré dans la NAFLD inhibe cette réplication et favorise la croissance de cellules progénitrices hépatiques. Ces cellules sont capables de se différencier en cellules assimilables aux hépatocytes et sont fortement associées à la fibrose. Cette inefficacité à régénérer des hépatocytes entraîne une altération sévère des fonctions hépatiques menant à la cirrhose. Si les lésions provoquées par la cirrhose s'aggravent avec le temps, cela peut mener à l'insuffisance hépatique et à l'hépatocarcinome

(Dowman et al., 2010).

1.4.3. Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique a été défini pour la première fois en 1988 comme un ensemble de perturbations métaboliques et cardiovasculaires (Reaven, 1988). Une actualisation a ensuite été faite par l'OMS (Alberti and Zimmet, 1998) puis mise à jour par le National Cholesterol Education Program (NCEP, 2001). Trois des cinq critères suivants doivent être réunis pour diagnostiquer un syndrome métabolique :

- Obésité abdominale (tour de taille >88 cm chez la femme et >102 cm chez l'homme)
- Pression artérielle systolique >130 mmHg et diastolique >85mmHg
- HDL-Cholestérol <1 mmol/L pour les hommes et <1,3 mmol/L pour les femmes
- Triglycérides >1,7 mmol/L
- Glycémie à jeûn >6,1 mmol/L

Cette définition permet de se rendre compte que l'obésité abdominale joue un rôle important dans le développement des anomalies métaboliques en relation avec l'obésité (Després and Lemieux, 2006).

2. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux est un organe à part entière qui a évolué de la représentation d'un dépôt inerte d'excédent d'énergie à un tissu avec des fonctions endocrine, paracrine ou autocrine actives. La plupart des substances libérées par les adipocytes du tissu adipeux, appelées adipokines, régulent l'apport énergétique et le métabolisme dont certaines vont venir agir sur la fonction cardiovasculaire (Gao, 2007) (Figure 5). Certaines de ces adipokines seront présentées dans la partie « Dysfonctions retrouvées lors de l'obésité ».

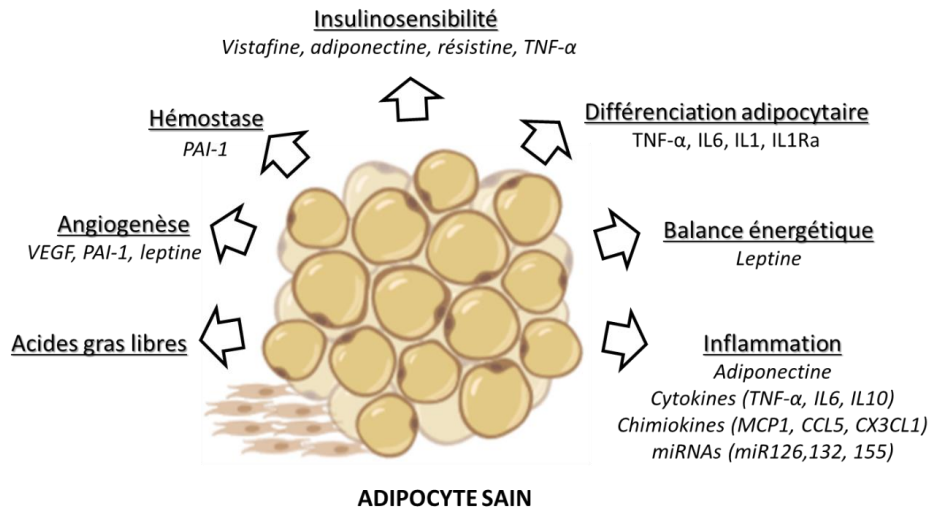


Figure 5 : Tissu adipeux et adipokines.

De ce fait, le tissu adipeux, qui est l'organe majeur impliqué dans le développement de l'obésité et des désordres associés, représente la cible majeure de remaniements cellulaires et structuraux. Cette plasticité adipocytaire permet à l'organisme de pouvoir s'adapter à un grand nombre de conditions physiologiques et pathologiques (Lee et al., 2014).

2.1. Description et composition du tissu adipeux

Le tissu adipeux est constitué majoritairement d'adipocytes et de la fraction stroma-vasculaire (Figure 6). L'adipocyte est une cellule ronde de grande taille composée de plusieurs vacuoles lipidiques pouvant se fusionner en une et repousse donc le noyau et les autres organites vers la périphérie et le cytoplasme. La fraction stroma-vasculaire comprend les cellules précurseurs (pré-adipocytes), les vaisseaux, les fibroblastes ainsi que les cellules immunitaires (leucocytes, macrophages) (Cohen and Spiegelman, 2016; Ouchi et al., 2011).

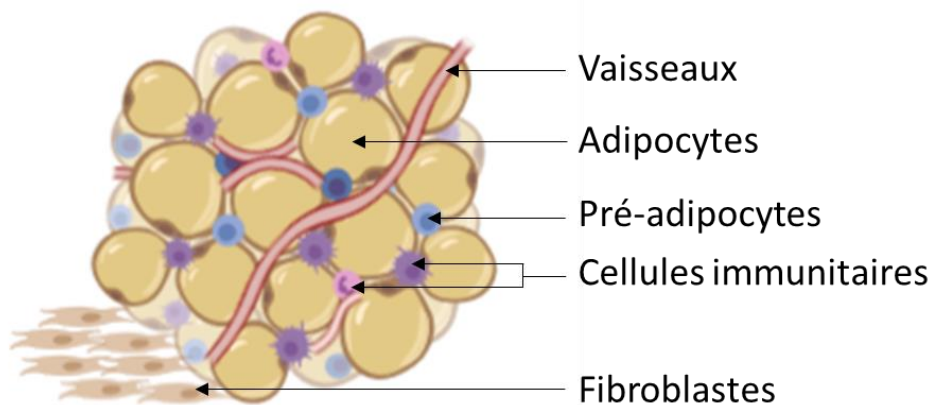


Figure 6 : Structure et composition du tissu adipeux.

Il existe trois types de tissus adipeux : le blanc, le brun et le beige. Les adipocytes proviennent de pré-adipocytes qui ont suivi différentes voies de signalisation afin d'aboutir aux différents types (Kuhn et al., 2012) (Figure 7). Ils présentent des différences de morphologie, de composition et de rôles (Tableau 3).

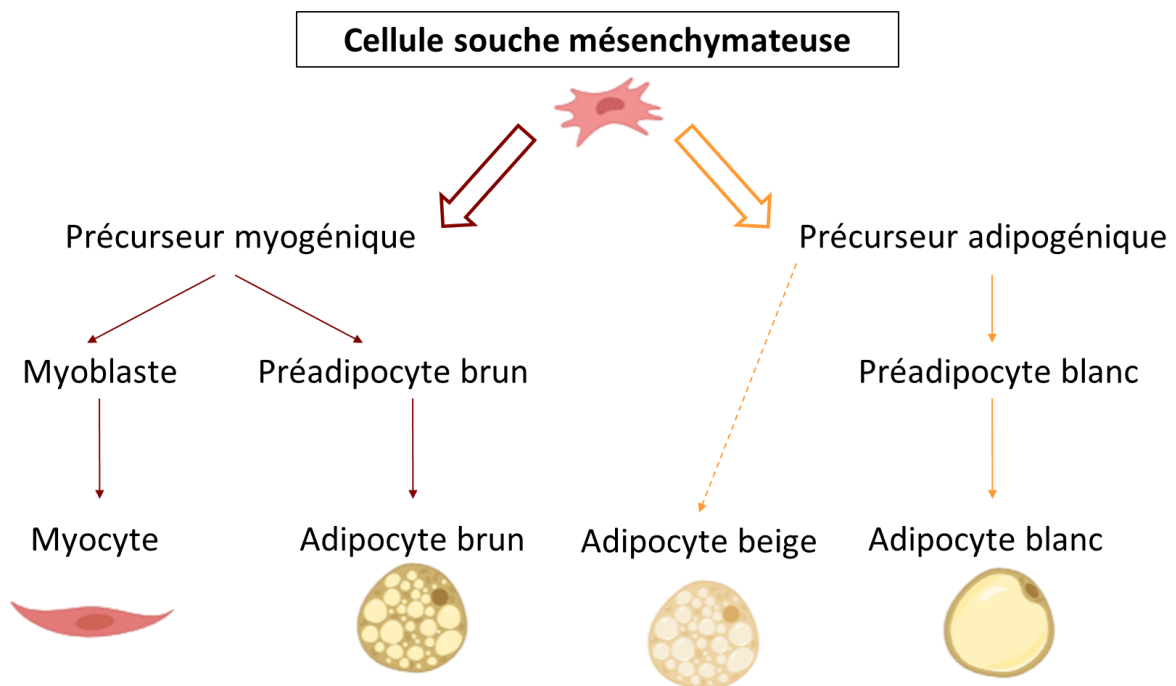


Figure 7 : Origines cellulaires des adipocytes en fonction de leur précurseur.

Tableau 3 : Principales caractéristiques des adipocytes blancs, bruns et beiges.

	Adipocytes blancs	Adipocytes bruns	Adipocytes beiges
Adipocyte	Uniloculaire	Multiloculaire	Multiloculaire
Taille	25-200 µm	15-60 µm	15-60 µm
Mitochondrie	Peu	Abondantes	Abondantes
Vacuole lipidique	Unique	Multiples	Multiples
Noyau	Périphérique	Central	Central

Le tissu adipeux blanc est connu pour être un organe de réserve et d'homéostasie énergétique, à travers le stockage de l'énergie sous forme de triglycérides. Il est très peu vascularisé et pauvre en mitochondries.

Le tissu adipeux brun est connu pour être métaboliquement actif et associé à une production d'énergie sous forme de chaleur via la thermogénèse chimique, elle-même engendrée par le découplage de la phosphorylation oxydative. A l'inverse du tissu adipeux blanc, celui-ci est très vascularisé et riche en mitochondries afin d'assurer son rôle de dépense énergétique.

Récemment identifié et caractérisé, le tissu adipeux beige résulte de la conversion du tissu adipeux blanc en beige. Ce phénomène de « browning » ou de beigisation permet aux adipocytes blancs d'acquérir un phénotype brun et donc de pouvoir dissiper l'énergie sous forme de chaleur (Aldiss et al., 2018; Cinti, 2009). Cette transformation peut se réaliser dans différentes situations comme l'exposition au froid, l'administration d'agonistes des récepteurs β 3-adrénergiques et des récepteurs PPAR- γ (Bonet et al., 2013; van Marken Lichtenbelt et al., 2009). Des stratégies naturelles ont également fait l'objet de nombreuses recherches dans ce phénomène de beigisation (Okla et al., 2017). Inversement, dans le cas d'une consommation d'un régime obésogène, le tissu adipeux brun peut devenir blanc, phénomène appelé blanchiment (« whitening ») (Bartelt and Heeren, 2013) (Figure 8). Outre ces changements, la plasticité adipocytaire peut aboutir à des modifications structurales et notamment l'augmentation de la taille et du nombre des adipocytes présents au sein du tissu adipeux. Ceci sera expliqué plus en détails dans la partie « Dysfonctions retrouvées lors de l'obésité ».

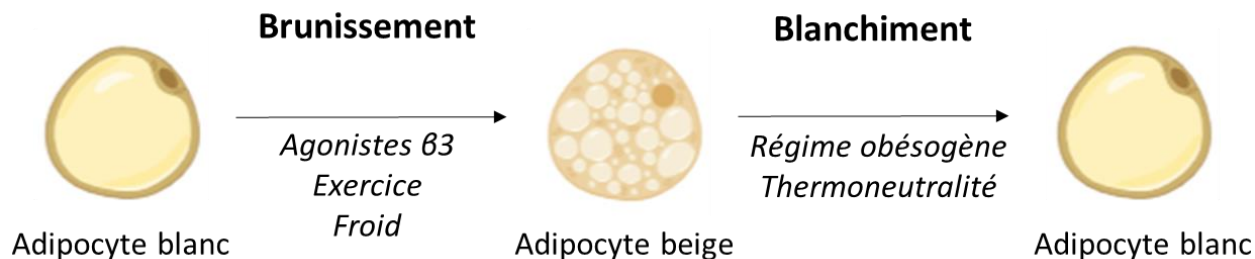


Figure 8 : Changements phénotypiques des adipocytes en réponse à des modifications d'environnement.

2.2. Localisation du tissu adipeux

Chez l'Homme adulte, le tissu adipeux blanc représente entre 15 et 25% du poids d'un individu. Sa localisation varie puisqu'il peut être soit sous-cutané, soit viscéral (Figure 9).

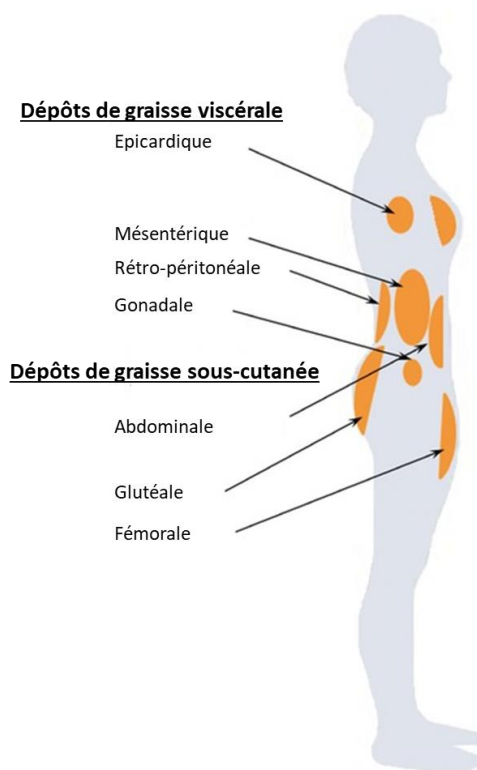


Figure 9 : Répartition des différents tissus adipeux chez l'Homme (d'après Wronska and Kmiec, 2012).

En fonction de la localisation de ce tissu adipeux, on distingue deux formes d'obésité (Vague, 1947). Lorsque l'adiposité est retrouvée au niveau du bas du corps

(cuisses, hanches, bassin), on parle d'adiposité « gynoïde ». En revanche, lorsque la graisse est localisée principalement au niveau abdominal, il s'agit d'adiposité « androïde ». Celle-ci reste la forme d'obésité la plus néfaste pour l'Homme et est fortement associée à l'apparition de risques cardiovasculaires (Figure 10).



Figure 10 : Répartition du tissu adipeux en fonction de sa localisation : obésité gynoïde et androïde (Vague, 1947).

Chez l'adulte, le tissu adipeux blanc sous-cutané (TAsc) est situé sous la peau et au niveau inguinal. Le tissu adipeux viscéral (TAv) est présent autour des organes et au niveau mésentérique. Le TAsc représente environ 80% de la masse grasse totale chez le sujet sain et le TAv entre 10-20% de la masse grasse chez l'homme maigre ou obèse et 5 à 10 % chez la femme (Bastard and Fève, 2012). Longtemps considéré comme inexistant chez l'adulte et très présent chez le nouveau-né et les mammifères hibernants, le tissu adipeux brun (TAB) a récemment été détecté chez l'adulte par la technique de tomographie par émission de positrons (PET-scan) fluorescents au niveau supra-claviculaire et dans la région cervicale (Cypess et al., 2009). Au-delà de l'imagerie par PET-Scan, une variété de techniques se sont révélées prometteuses pour l'imagerie du TAB. La résonance magnétique, n'utilisant pas de radiation ionisante, permet à la fois de localiser et de quantifier l'activité du TAB (Sampath et al., 2016; Wu et al., 2020). Une autre technique moins coûteuse et ne nécessitant pas de radiation ionisante repose sur l'ultrasonographie, qui permet de mesurer le flux sanguin du TAB (Baron David et al., 2012). Comme le TAB génère de la chaleur, la thermométrie peut être utilisée. Des études chez des sujets humains ont démontré que l'imagerie thermique pouvait mettre en évidence des augmentations de température induites par le froid (Symonds et al., 2012).

Chez les rongeurs, le tissu adipeux blanc a les mêmes localisations que chez l'Homme. Des dépôts de graisse viscérale sont retrouvés au niveau épïcardique, mésentérique, péricrénal, rétro-péritonéal et en plus au niveau gonadal (Bartelt and Heeren, 2013). La graisse sous-cutanée se situe au niveau abdominal et inguinal (Park et al., 2014). En revanche, le tissu adipeux brun est organisé en dépôts localisés au niveau interscapulaire, cervical, médiastinal (péricardique, péricrénal, péri-aortique) (Figure 11). Des dépôts de tissu adipeux blanc, comme le sous-cutané et l'inguinal, sont susceptibles d'acquérir les caractéristiques du tissu adipeux brun sous certaines conditions citées précédemment (Figure 8). De par leurs activités thermogéniques, ces tissus représentent de potentielles cibles thérapeutiques intéressantes.

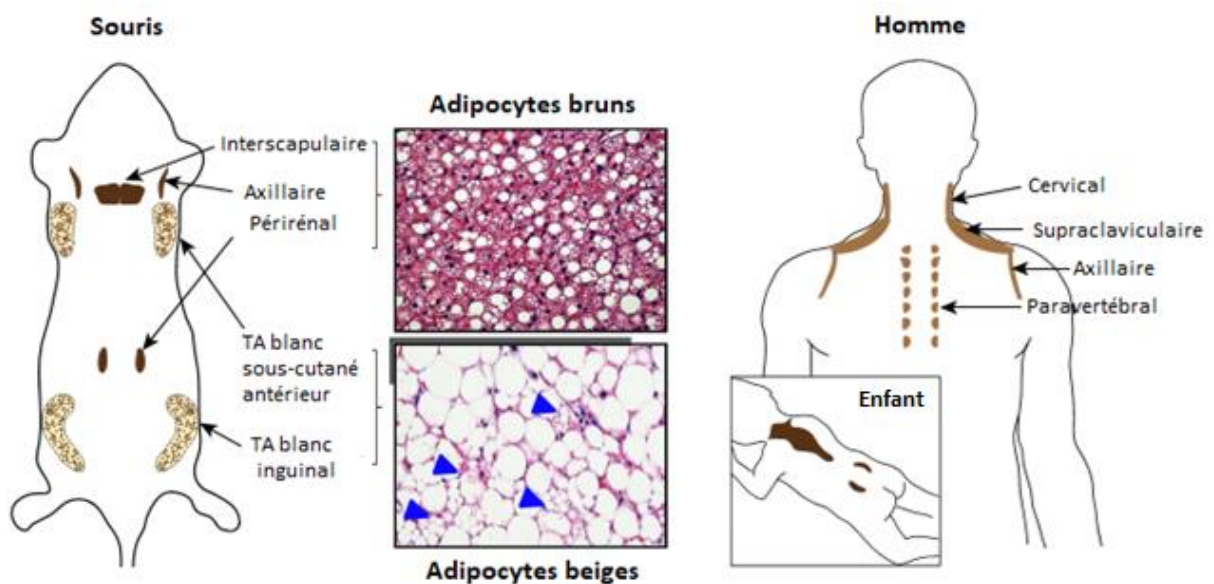


Figure 11 : Localisations anatomiques du tissu adipeux brun et beige chez la souris et l'Homme (d'après Ikeda et al., 2018).

2.3. Rôles du tissu adipeux

Tableau 4 : Rôle des adipocytes blancs et bruns.

	Adipocytes blancs	Adipocytes bruns
Fonctions	Stockage d'énergie Adipogenèse Lipogenèse Lipolyse Sécrétion d'adipokines	Thermogénèse
Oxydation des acides gras	+	+++
Chaîne respiratoire	+	+++

De par leur composition différente, le tissu adipeux blanc et brun vont avoir des rôles différents (Tableau 4).

Le stockage des lipides dans les adipocytes se fait sous forme de triglycérides (TG). La principale source de ces lipides provient des lipides plasmatiques circulants qui sont soit des acides gras non estérifiés (AGNE) liés à l'albumine soit des TG incorporés dans des lipoprotéines provenant de l'alimentation. Une autre partie des TG peut venir de la lipogenèse *de novo* au niveau hépatique, principalement des lipoprotéines à très basse densité (VLDL). Les TG contenus à la fois dans les chylomicrons et dans les VLDL sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme sécrétée par les adipocytes et ancrée sur la membrane de cellules endothéliales des capillaires sanguins, en 2-monoglycérol. Les protéines de transports (FATP) permettent la captation des acides gras libres par les adipocytes et ces acides gras se lient ensuite à des protéines cytoplasmiques (FABP) pour être activés en acyl-CoA par une Acyl-CoA synthase. Ils peuvent ensuite être ré-estérifiés en TG en présence de glucose-3-phosphate (G-3-P). Les acides gras néosynthétisés par la voie lipogénique assurent le stockage des lipides sous forme de TG. La lipogenèse *de novo* contribue de manière minoritaire au stockage des TG. Principalement, la régulation du stockage des acides gras est soumise à un contrôle nutritionnel (glucose, AGNE) mais elle est également sensible à des hormones comme l'insuline, les stéroïdes ou encore les catécholamines.

La lipolyse, quant à elle, est le processus permettant la libération des AGNE par l'hydrolyse des TG contenus dans la gouttelette lipidique. Ce mécanisme permet de subvenir aux besoins de l'organisme en cas de restriction énergétique. La lipolyse est

sous l'action de deux lipases, la lipase hormono-sensible (HSL) et la triglycéride lipase (ATGL). Ces enzymes catalysent les réactions successives d'hydrolyses des TG en diacylglycérol, en monoacylglycérol et en glycérol. Finalement, à chaque étape il y a libération de molécules d'acides gras dans le sang et qui sont par la suite utilisables par les autres cellules de l'organisme à des fins énergétiques (Figure 12). Comme pour la lipogénèse, la lipolyse est soumise à un contrôle nutritionnel et plurihormonal (insuline, adrénaline, noradrénaline). L'état métabolique, nutritionnel et hormonal de l'organisme régule le flux d'AGNE entrant et sortant du tissu adipeux.

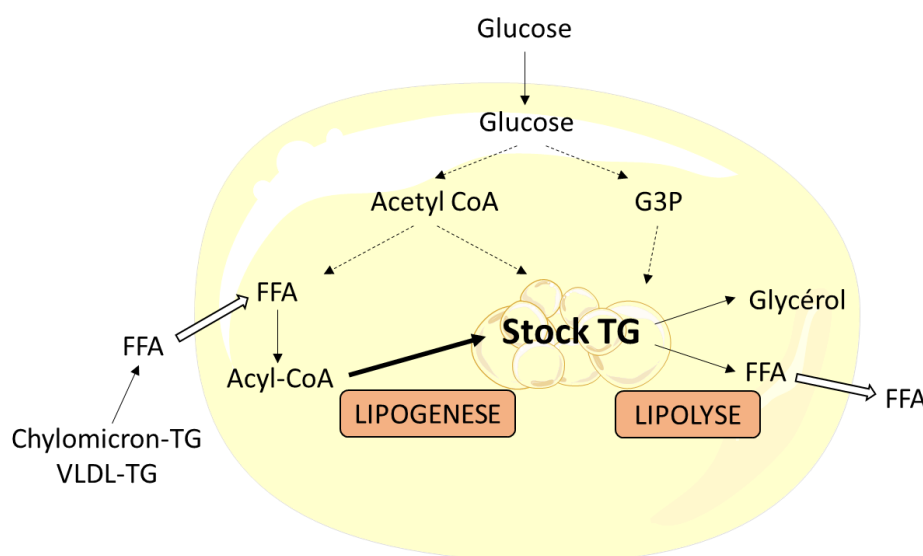


Figure 12 : Étapes de lipogénèse et de lipolyse dans l'adipocyte.

Le tissu adipeux brun régule la thermogénèse dite non frissonnante médiée par le système nerveux sympathique. Cette capacité thermogénique est permise grâce à la présence abondante dans la membrane interne mitochondriale d'une protéine découplante, l'UCP1 (Uncoupling Protein 1) ou thermogénine. Suite à une exposition au froid ou à l'ingestion de nourriture, une libération de noradrénaline produite par le système nerveux sympathique entraîne une augmentation du nombre d'adipocytes bruns, de mitochondries et par conséquent de l'expression d'UCP1 (Merlin et al., 2016). Cette protéine découple la phosphorylation oxydative en facilitant la diffusion des protons à travers la membrane interne mitochondriale provoquant ainsi une dissipation du gradient de protons entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Finalement, l'énergie résultant de l'oxydation des acides gras est dissipée sous forme de chaleur au lieu d'une production d'énergie sous forme d'ATP (Adénosine triphosphate) (Figure 13).

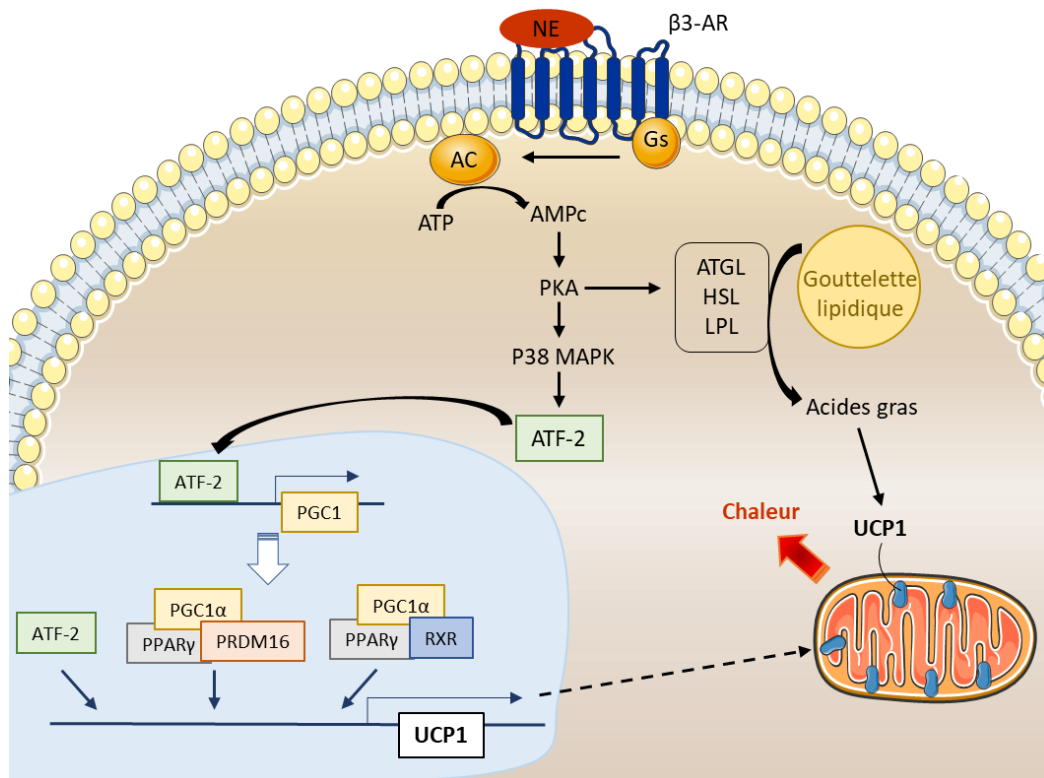


Figure 13 : Thermogenèse dans l'adipocyte brun (Adapté de Merlin et al., 2016).

2.4. Dysfonctions adipocytaires retrouvées lors de l'obésité

Lors de l'installation de l'obésité, des modifications phénotypiques peuvent aussi être observées. Ceci se traduit par une augmentation 1/ de la taille des adipocytes afin de pouvoir accueillir l'excédent d'énergie, phénomène appelé hypertrophie ou 2/ du nombre d'adipocytes au sein du tissu adipeux, appelé hyperplasie (Spalding et al., 2008).

En plus de modifications structurales, l'obésité induit des changements fonctionnels. La dysfonction adipocytaire va favoriser l'installation de plusieurs paramètres comme un statut inflammatoire chronique de bas-grade conduisant à une insulino-résistance systémique et périphérique, une hypoxie tissulaire ainsi que des dysfonctions endocrines (Klötting and Blüher, 2014).

Tous ces événements vont entraîner un déséquilibre de l'homéostasie se traduisant par une modification de sécrétions d'adipokines (adiponectine, leptine) ainsi que des cellules inflammatoires.

Les études portant sur le lien entre l'obésité et l'inflammation datent d'il y a environ

30 ans. Chez les souris obèses, il avait été reporté pour la toute première fois une augmentation de production de la quantité de cytokine pro-inflammatoire Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) (Hotamisligil et al., 1995). A la suite de cette découverte, de nombreuses recherches décrivant les différences inflammatoires entre les animaux obèses et normopondérés ainsi que chez l'Homme ont été réalisées. Notamment, une augmentation des taux circulants plasmatiques de nombreux médiateurs inflammatoires a été décrite chez les obèses (Calder et al., 2011; Gregor and Hotamisligil, 2011; Landrier et al., 2019b) (Tableau 5). Les adipocytes du tissu adipeux produisent également la cytokine MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) conduisant à l'infiltration macrophagique dans le tissu adipeux et entraînant une inflammation chronique (Gregor and Hotamisligil, 2011). Il en résulte donc une augmentation du nombre de macrophages due au recrutement et à la différenciation de monocytes périphériques, venant accroître la population de macrophages résidents déjà présents. De plus, une modification du phénotype des macrophages a été observée dans le tissu adipeux obèse. Classiquement, 2 sous-populations de macrophages sont distinguées : les M1 sécrétant des molécules pro-inflammatoires telles que le TNF- α , IL-1 β , IL-6, 12 et MCP-1 et les M2 anti-inflammatoires sécrétant IL-4, IL10, IL-13 et TGF- β (Apostolopoulos et al., 2016). Dans le tissu adipeux de personnes minces, on retrouve principalement des macrophages résidents de type 2 alors que chez les patients obèses, une majorité de macrophages de type 1 est rapportée (Chylikova et al., 2018). Ce phénotype pro-inflammatoire pourrait expliquer la propagation de l'inflammation associée à l'obésité.

Tableau 5 : Fonctions des différents médiateurs inflammatoires.

Groupe	Nom	Fonctions
Hormones	Adiponectine	Insulino-sensible Stimule l'oxydation des AG Action anti-inflammatoire
	Leptine	Signal de satiété par effet direct sur l'hypothalamus Stimule la lipolyse, inhibe la lipogenèse, stimule l'oxydation des AG
	Résistine	Induit l'insulino-résistance Différenciation adipocytaire
Protéines de la phase aigüe	PAI Plasminogen Activator Inhibitor	Inhibition système fibrinolytique Induit l'insulino-résistance
	Haptoglobine	Propriétés anti-oxydantes
Cytokines	IL-6 Interleukin 6	Pro-inflammatoire Diminution voies de la leptine et de l'insuline
	IL-10	Inhibition production cytokines Diminution réponse immunitaire
	TNF- α Tumor Necrosis Factor α	Pro-inflammatoire Induit l'insulino-résistance Augmentation lipolyse dans les adipocytes
Chimiokines	CCL5 C-C motif ligand 5	Recrutement leucocytes sur les sites inflammatoires
	MCP1 Monocyte Chemoattractant Protein 1	Recrutement des macrophages sur les sites inflammatoires Augmentation lipolyse et sécrétion leptine
Facteurs de croissance	Angiopoïétine	Impliquée dans l'angiogenèse Stimulation/prolifération cellules endothéliales
	TGF- β Transformation Growth Factor β	Anti-inflammatoire Effet sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose
miRNAs	miR-14, mir-218, let-7	Métabolisme lipidique et glucidique
	Familles miR-17/20/93, miR-21/590-5p, miR-200b/c, miR-221/222, let-7/miR-98, miR-203	Régulation par l'alimentation
	miR-21	Corrélation avec l'IMC
	miR-132, miR-126, miR-193b, miR-145	Régulation de l'expression de marqueurs inflammatoires
	miR-155	Inflammation adipocytaire

L'adiponectine, considérée habituellement comme ayant des propriétés de sensibilisation à l'insuline et anti-inflammatoires, est retrouvée diminuée lors de l'obésité (Trayhurn and Wood, 2004). Elle est impliquée dans le métabolisme glucidique et lipidique et agit au niveau cellulaire en se fixant principalement sur deux récepteurs : AdipoR1 et AdipoR2, respectivement exprimés dans le muscle et dans le foie. Une fois activés, ces récepteurs se lient à une protéine adaptatrice qui relaye l'activation de l'AMPK (Adenosine MonoPhosphate activated protein Kinase). Ceci provoque l'entrée de glucose dans le muscle et le foie, l'augmentation de l'oxydation des acides gras et l'inhibition de la néoglucogenèse (Reverchon et al., 2013).

De façon intéressante, la leptine est également impliquée dans l'homéostasie du glucose et la balance énergétique. Elle permet la capture du glucose, l'oxydation des acides gras et permet de prévenir de l'accumulation de lipides au niveau du tissu adipeux et des tissus sensibles à l'insuline. Chez les individus obèses, une hyperleptinémie est observée et conduit à une résistance à la leptine (Vázquez-Vela et al., 2008). Ainsi, la leptine perd sa capacité à contrôler le développement de l'obésité en ne régulant plus la prise alimentaire.

Les cytokines inflammatoires interfèrent avec la signalisation de l'insuline en activant les protéines sérine/thréonine kinases dont notamment les kinases Jun N-terminale kinase (JNK) et Inhibitor of nuclear factor Kappa-B Kinase (IKK β).

Elles vont avoir plusieurs rôles dont l'inhibition de la phosphorylation de la tyrosine Insulin Receptor Substrate (IRS-1), la régulation des programmes de transcription des effecteurs terminaux Activator Protein-1 (AP1) et Nuclear Factor-Kappa B (NF- κ B) (Gao et al., 2002; Tanti and Jager, 2009) (Figure 14).

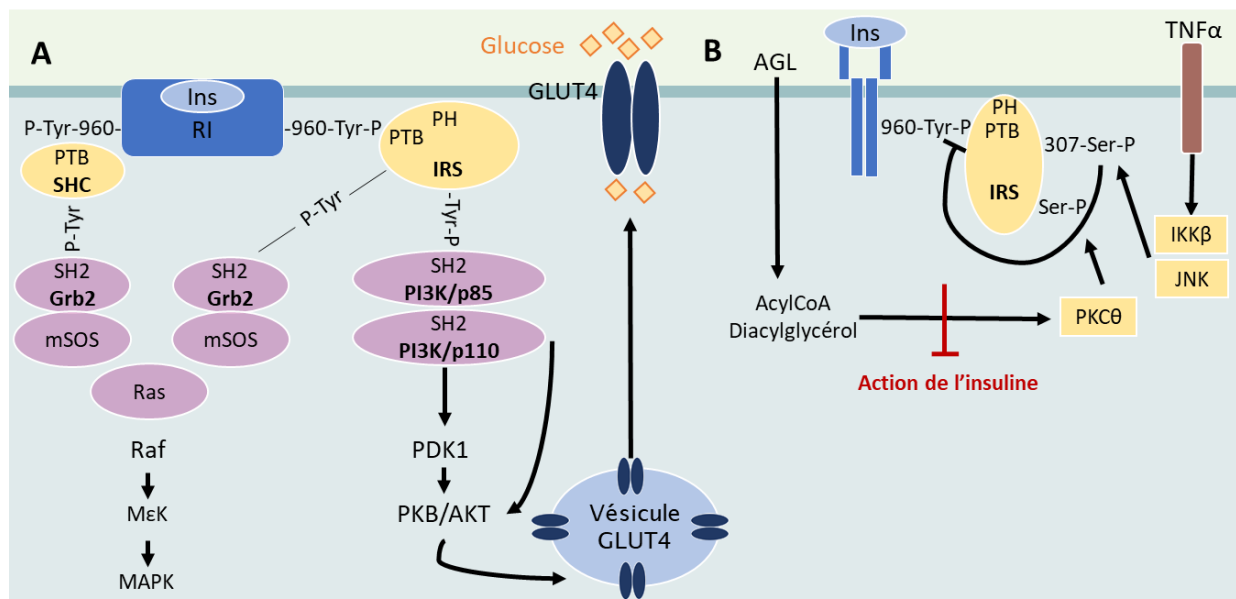


Figure 14 : (A) Principales voies de signalisation de l'insuline et (B) Inhibition du signal insulinaire (Adapté de Capeau, 2003).

(A) Les protéines IRS sont positionnées au niveau de la face cytosolique de la membrane plasmique par leur domaine PH (domaine d'homologie). Elles positionnent ainsi leur domaine PTB (phosphotyrosine binding), en face de la tyrosine 960 du récepteur à l'insuline (RI) et se fixent au RI sur la tyrosine 960 phosphorylée par l'intermédiaire de leur domaine PTB. La moitié carboxy-terminale des protéines IRS phosphoryle des résidus tyrosines spécifiques sur les IRS. Les protéines IRS ainsi phosphorylées sont à leur tour reconnues par les domaines SH2 (src homology 2) de protéines relais : PI3 (phosphatidyl-inositol 3) kinase, Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2). La PI3 kinase crée ensuite des sites de reconnaissance d'autres kinases cellulaires telles que PKB/Akt qui va à son tour phosphoryler et activer d'autres relais cellulaires impliqués dans les effets métaboliques de l'hormone (synthèse de glycogène, effets anti-apoptotique et anti-lipolyse). PKB/Akt permet également la translocation de GLUT4 à la membrane cellulaire, augmentant ainsi l'absorption du glucose. L'autre protéine relais Grb2, fixée sur des phosphotyrosines spécifiques des IRS permet d'activer le facteur d'échange nucléotidique SOS (son of sevenless). SOS active la protéine G Ras activant par la suite la kinase Raf. Finalement, Raf phosphoryle et active la MAP kinase M&K qui va activer des kinases impliquées dans la synthèse protéique.

(B) Les kinases JNK et IKKβ activées par le TNFα exercent un rétrocontrôle négatif du signal de l'insuline. Elles phosphorylent la sérine 307 de l'IRS et empêchent ainsi l'interaction du domaine PTB avec la tyrosine 960 phosphorylée du RI et donc la transmission du signal insulinaire. L'élévation des acides gras libres (AGL) et l'accumulation de diacylglycérol et d'acylCoA peuvent conduire à l'activation de la PKCθ (protéine kinase spécifique des sérines/thréonines) et donc à la phosphorylation de l'IRS sur Ser/Thr.

La voie NF-κB joue un rôle essentiel dans la régulation de l'inflammation avec comme gènes cibles le TNF-α, l'IL-6 et CCL2 et est retrouvée augmentée dans le cas d'obésité. De plus, il a été montré chez les souris invalidées pour IKKβ nourries avec une nourriture riche en graisse, une meilleure sensibilité à l'insuline (Yuan et al., 2001).

Les protéines kinases JNK appartiennent à la famille des Mitogen-Activated Protein (MAP) kinases et sont impliquées dans de nombreuses voies de stress. Cette voie joue un rôle clé dans l'inflammation induite par le stress du réticulum endoplasmique et dans l'inhibition de la sensibilité à l'insuline (Gregor and Hotamisligil, 2011) et est activée par l'obésité (Sabio and Davis, 2010). Les souris transgéniques déficientes pour le gène JNK présentaient une protection contre la résistance à l'insuline ainsi qu'une baisse de prise de poids malgré la consommation d'un régime riche en graisse (Hirosumi et al., 2002). Ce résultat est également obtenu lorsque cette voie est inhibée par des inhibiteurs pharmacologiques comme le salicylate (Kim et al., 2001). De plus, la voie JNK est également impliquée dans l'inflammation et il a été montré qu'elle était nécessaire pour l'installation de l'insulino-résistance induite par l'obésité. Dans l'étude d'Han et *al.*, des souris déficientes en JNK et soumises à un régime riche en graisse conservaient leur sensibilité à l'insuline tout en étant obèses (Han et al., 2012).

L'expansion du tissu adipeux s'accompagne également de zones hypoxiques. Ces dernières sont dues à une rarification des capillaires sanguins dans le tissu adipeux (Loustau et al., 2020; Ye et al., 2007). Celle-ci est étroitement corrélée à une inflammation tissulaire puisque la réduction du flux sanguin peut contribuer à la nécrose des adipocytes par ischémie induisant ainsi le recrutement et la prolifération de macrophages. De plus, le tissu adipeux obèse présente une plus faible densité de capillaires (Loustau et al., 2020) ainsi qu'une augmentation du diamètre suggérant une vascularisation moins efficace (Pasarica et al., 2009). Chez des souris, l'obésité induite soit par la consommation d'un régime riche en graisse ou génétiquement, provoque une hypoxie adipocytaire ainsi qu'une inflammation par la diminution de la pression partielle en oxygène pouvant atteindre une réduction de 70% dans le tissu adipeux viscéral (Ye et al., 2007). Outre ces phénomènes d'inflammation et d'hypoxie, le tissu adipeux va également être confronté à un stress du réticulum endoplasmique et à un stress oxydant.

2.5. Ectopisme

La dysfonction adipocytaire, aggravée par l'insulino-résistance systémique, va bloquer la lipogenèse, ralentir l'action anti-lipolytique de l'insuline et donc induire une augmentation du flux d'acides gras libres, n'étant plus gérés par les adipocytes. Chaque individu possède sa propre limite intrinsèque de capacité à stocker l'excès de

lipides dans le tissu adipeux. Lorsque l'organisme est dépassé par la surcharge d'acides gras alimentaires, d'autres organes vont être affectés et des dépôts adipeux vont être redirigés vers le foie, les muscles et le cœur. Ces dépôts constituent la graisse ectopique et se distinguent en deux types : soit par la formation de tissus adipeux autour des organes soit par l'accumulation de triglycérides intracellulaires dans des tissus adipeux appelée stéatose (Figure 15). De plus, ces dépôts ectopiques vont avoir une action locale ou systémique. Les dépôts de graisses viscérale, intra-hépatique et intra-musculaire ont un effet systémique conduisant aux perturbations métaboliques. Ces perturbations métaboliques regroupent l'inflammation et le déséquilibre des cytokines pouvant aller jusqu'au syndrome métabolique. Les dépôts de graisses périvasculaire et épigardique exercent des effets locaux participant à la survenue des maladies cardiovasculaires (Britton and Fox, 2011). Suivant la localisation de ces effets, on retrouve des atteintes au niveau myocardique (dysfonction myocardique et arythmies), artériel (athérosclérose des artères coronaires et vaisseaux périphériques) et au niveau rénal (glomérulopathie) (Ferrara et al., 2019).

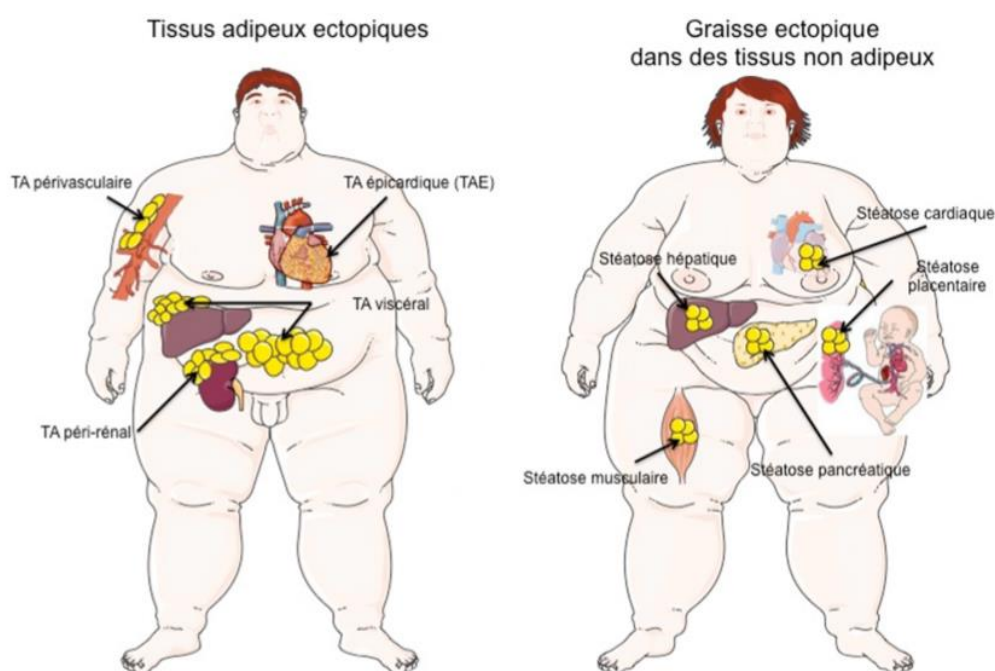


Figure 15 : Différents types de dépôts ectopiques (Gaborit et al., 2013).

De par ces interactions, un véritable dialogue inter-organes se met en place amenant le développement d'anomalies métaboliques et cardiovasculaires associées à l'obésité. Ce dialogue se résume principalement par la sécrétion de molécules

respectivement appelées adipokines, myokines et hépatokines pour le tissu adipeux, le muscle et le foie (Figure 16). Ces organes métaboliques communiquent ainsi entre eux afin de réguler l'homéostasie énergétique et la sensibilité à l'insuline. Les adipokines vont agir sur le foie et le muscle en participant au niveau hépatique à l'accumulation de graisses, le captage des acides gras, la production de glucose et au niveau musculaire au captage du glucose, à la lipolyse et à la sensibilité à l'insuline.

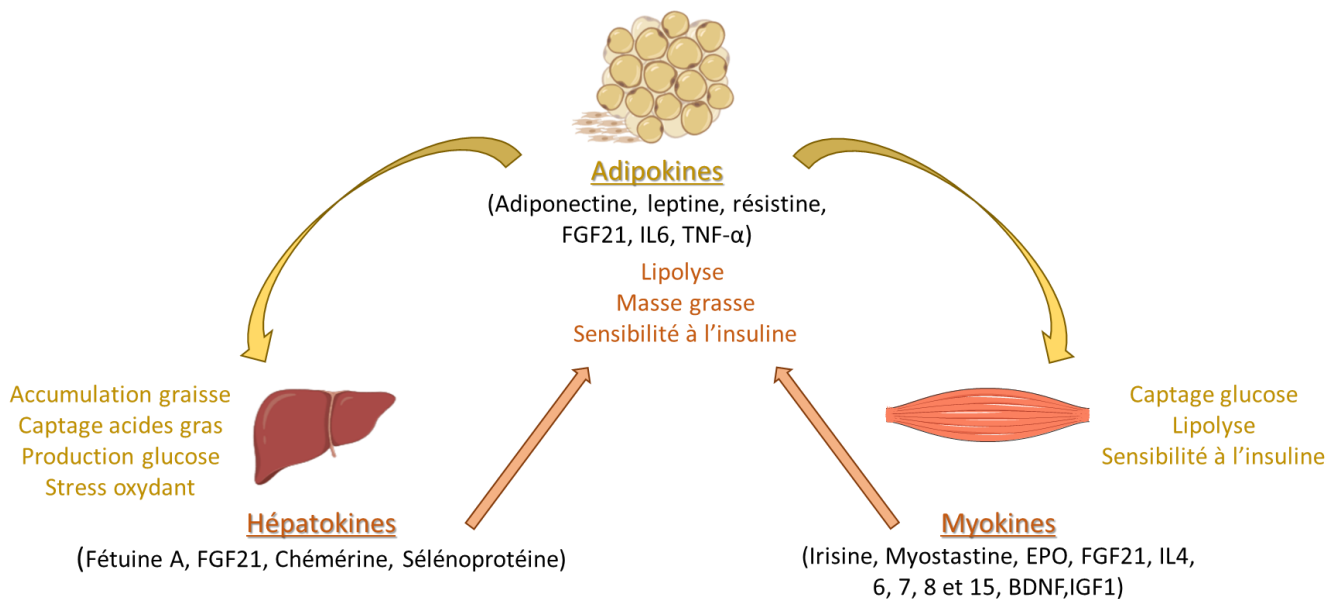


Figure 16 : Sécrétions de molécules par le tissu adipeux, le muscle et le foie et interactions.
BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor, EPO : erythropoietin ; FGF21: Fibroblast Growth Factor 21; IGF : Insulin Growth Factor ; IL-6: Interleukin 6 ; TNF-α : Tumor Necrosis Factor α.

L'excès de nutriments dans l'organisme va favoriser la surcharge d'acides gras libres qui vont pouvoir se stocker au niveau du foie (Azzu et al., 2020). Cette accumulation de lipides dans le foie protège les autres organes de cette surcharge lipidique quand le tissu adipeux n'est plus capable d'assurer sa fonction de stockage. Elle peut être transitoire comme définitive lorsqu'elle est associée à l'obésité. On parle alors de stéatose hépatique et c'est un marqueur précoce du syndrome de dépôts ectopiques de lipides. Des molécules appelées hépatokines sont libérées par le foie et vont avoir une action sur les autres organes. La Féтуine A, la sélénoprotéine et la chémérine vont participer à l'insulino-résistance, l'intolérance au glucose ainsi qu'au développement de la stéatose hépatique (Oh et al., 2016). Au niveau adipeux, ces hépatokines vont également réguler la lipolyse et l'accumulation de masse grasse.

Récemment, les myokines (molécules libérées par le muscle squelettique) ont été découvertes et ont des fonctions endocrines et paracrines (Liu et al., 2017). Il existe

une réelle communication entre les adipokines et les myokines (Graf and Ferrari, 2019). Ceci va entraîner la perturbation de la signalisation à l'insuline ainsi que le captage du glucose (Tableau 6). De plus, elles vont agir au niveau adipeux en régulant la lipolyse, l'accumulation de masse grasse et la sensibilité à l'insuline comme les hépatokines.

Les altérations de la lipogénèse et de la lipolyse conduisent non seulement à une accumulation excessive de triglycérides au sein de ces différents organes, mais également à l'accumulation de dérivés lipidiques toxiques, phénomène appelé lipotoxicité. Ces métabolites intermédiaires sont générés par les étapes de synthèse et de dégradation des triglycérides et phospholipides (Capel et al., 2013). Il en existe plusieurs comme l'acyl-CoA, les DAG (diacylglycérols), les céramides, les acyl-carnitines et certaines prostaglandines. Ces intermédiaires interfèrent avec la signalisation de l'insuline en activant des voies pro-inflammatoires impliquées dans la résistance à l'insuline. Par exemple, l'accumulation de DAG provoque une activation de protéines kinase C qui vont interagir avec le récepteur à l'insuline et s'opposer à la transduction du signal insulinique (Jornayvaz et Shulman, 2012).

Tableau 6 : Effets des adipo-myokines sur le muscle squelettique et le tissu adipeux.

Adipo-myokines	Effets sur le muscle squelettique	Effets sur le tissu adipeux
FGF21	Contrôle homéostasie glucidique, sensibilité à l'insuline et cétogénèse	Thermogénèse Browning
BDNF	Augmentation de l'oxydation des acides gras	Taille des adipocytes
Myostatine	Inhibition hypertrophie musculaire	Lipolyse, oxydation lipidique mitochondriale
IL-6	Hypertrophie musculaire, captage glucose, dégradation glycogène, lipolyse, effet anti-inflammatoire	Augmentation lipolyse, oxydation acides gras, effet pro-inflammatoire
Irisine	Stimulation captage glucose, métabolisme lipidique, croissance musculaire	Browning, lipolyse, stimulation glycogénèse, baisse gluconéogénèse et lipogénèse hépatique

Au niveau cardiaque, le tissu adipeux épique s'accumule autour du myocarde et cette accumulation de lipides est associée à l'apparition de cardiomyopathies induisant un remodelage cardiaque (Greulich et al., 2012; Schaffer, 2003). Celle-ci peut induire la mort cellulaire par apoptose des cardiomyocytes et ainsi contribuer à l'altération de la fonction systolique.

Le tissu adipeux interagit également avec le pancréas en induisant le captage du glucose via l'action de l'insuline qui entraîne le stockage de triacylglycérol dans les adipocytes. Il a également été montré que le profil pro-inflammatoire des adipokines dans le tissu adipeux obèse contribue aux lésions des cellules β pancréatiques. Les adipokines telles que la leptine, la résistine ou encore l'adiponectine vont jouer un rôle important dans la dysfonction des cellules β et dans le développement du diabète de type 2 (Romacho et al., 2014).

3. Prise en charge de l'obésité

Les conséquences économiques, médicales et psychologiques de la pandémie d'obésité exigent une application généralisée des traitements et des interventions efficaces pour lutter contre l'obésité. L'apparition de l'obésité est principalement due à de mauvaises habitudes alimentaires et comportementales. De ce fait, une meilleure qualité de vie, tant sur le plan nutritionnel avec un apport suffisant de micro- et macroéléments que sur le plan social avec des activités physiques régulières ont un rôle crucial dans le traitement de l'obésité. Les plans d'intervention au niveau mondial, mis en place par différents organismes sanitaires comme l'OMS visent à améliorer la prise en charge et la réduction du nombre d'obèses.

Un plan de prévention dans la lutte contre l'obésité a été mis en place dès 2011 par le Ministère de la Santé en France et la Haute Autorité de Santé (HAS) qui permettrait d'atteindre des diminutions significatives de respectivement 15% et 20% concernant les adultes et les enfants/adolescents d'ici 2023. La HAS a ainsi publié deux recommandations, l'une pour la prise en charge de l'adulte, l'autre pour la prise en charge de l'enfant et de l'adolescent. Ces recommandations destinées aux médecins traitants ont pour objectif d'améliorer la qualité de la prise en charge médicale de premier recours des personnes ayant un surpoids ou une obésité. De plus, en 2018, l'OMS a établi une stratégie mondiale dont le but est de promouvoir et de protéger la santé grâce à une alimentation saine et à l'exercice physique d'ici 2030, l'objectif étant

de réduire de 15% l'inactivité aussi bien chez les adultes que chez les adolescents.

3.1. Les traitements médicamenteux

Des traitements médicamenteux existent mais restent très limités. Autrefois, des médicaments dits « coupe-faim » étaient prescrits mais sont désormais interdits dans le traitement de l'obésité depuis de nombreuses années. Actuellement, il n'existe plus qu'un médicament en France : l'orlistat (Bansal and Al Khalili, 2020). Ce médicament a pour effet une réduction de l'absorption des gras alimentaires d'environ 30%. Les matières grasses non digérées sont excrétées dans les selles. Il doit être accompagné d'un régime faible en gras pour éviter ou réduire les effets indésirables. L'orlistat a aussi été administré en combinaison avec de l'acarbose et a montré des effets substantiels sur la réduction de l'appétit et de la glycémie postprandiale (Holmbäck et al., 2020). En combinaison avec un régime hypocalorique, le traitement à l'orlistat s'est révélé efficace pour promouvoir la perte de poids sur une période d'un an. Ces essais cliniques ont rapporté une baisse de poids comprise entre 2 et 5 kilos (Ballinger and Peikin, 2002).

Néanmoins, la prescription de thérapie anti-obésité doit être associée à une approche plus complète associant aussi une diète et des programmes d'exercice physique selon un récent rapport de Milano et son équipe (Milano et al., 2020).

3.2. Les interventions chirurgicales

Le traitement de l'obésité par les chirurgies bariatriques est réservé aux personnes souffrant d'obésité morbide c'est-à-dire 1/ celles dont l'IMC dépasse 40, 2/ celles dont l'IMC est supérieur à 35 et souffrant d'obésité associée à une ou plusieurs complications métaboliques, 3/ celles dont l'obésité a des conséquences graves sur la vie professionnelle ou familiale ; 4/ celles qui ne parviennent pas à perdre suffisamment de poids et dont l'IMC reste compris entre 35 et 39,9 km/m² malgré un régime alimentaire et la pratique d'une activité physique (traitement hygiéno-diététique) (Dragano et al., 2020). Le but de cette intervention étant de restreindre l'absorption des aliments afin de réduire l'apport calorique journalier et l'ingestion de nourriture d'environ 40%.

Trois types majeurs d'interventions existent : la gastroplastie, qui regroupe la sleeve gastrique, pose d'agrafes, et l'anneau gastrique, pose d'un anneau modulable ;

le ballon gastrique et le by-pass gastrique. L'anneau gastrique est placé autour de la jonction entre l'œsophage et l'estomac, la gastrectomie longitudinale consiste à retirer les deux tiers de l'estomac et enfin le court-circuit gastrique à réduire le volume de l'estomac et modifier le circuit alimentaire. Cette dernière chirurgie est réalisée par le raccord d'une poche stomacale résiduelle directement à une portion de l'intestin grêle (jéjunum) par pontage gastrique. Elle permet de réduire considérablement le volume de l'estomac et permet de réduire significativement la masse pondérale en outrepassant la partie proximale de l'intestin.

La chirurgie bariatrique est connue pour être efficace et aide à perdre du poids durablement. Cependant, ces interventions sont très coûteuses financièrement et peuvent dramatiquement changer la vie des patients avec un changement de mode de vie impliquant une activité physique régulière, la prise quotidienne à vie de compléments tels que les oligoéléments, vitamines et minéraux (Arterburn et al., 2020; Bal et al., 2012).

3.3. Les interventions sur le mode de vie

Des études cliniques visant la perte de poids mettent en place des restrictions alimentaires accompagnées de programmes d'exercice physique. Cependant, ces études présentent des limites puisque le suivi des différents régimes et la réalisation d'activité physique peuvent être jugées de manière subjective (Benaich et al., 2020).

Dans le cadre du traitement de l'obésité, des modifications axées sur le mode de vie sont préconisées, en particulier sur l'exercice physique et le régime alimentaire (Ferrari et al., 2020; Roderka et al., 2020). Ces recommandations jouent à plusieurs niveaux : effets préventifs notables, stabilisation du poids, voire même réduction pondérale modérée, mais significative d'un point de vue clinique. Cependant, l'un des inconvénients à ces interventions est d'induire des phénomènes de découragement et de perte de motivation chez les patients obèses.

3.3.1. Restriction des apports caloriques

La première intervention concerne les apports caloriques. Des troubles alimentaires sont observés chez les personnes obèses dont le grignotage, les excès boulimiques ou compulsifs, la mauvaise qualité nutritionnelle des aliments, il est donc important de lutter contre ces mauvaises habitudes (Laster and Frame, 2019; Williamson et al., 2020). Une diminution de l'apport calorique par la densité et la quantité sont

préconisés tout en respectant un rythme alimentaire normal avec des prises de repas à heure fixe (Kessler and Pivovarova-Ramich, 2019). Le rythme circadien est soumis à une régulation métabolique. En temps normal, l'expression cyclique des régulateurs métaboliques coordonnent les processus cellulaires de manière efficace alors que des perturbations métaboliques dues à un déséquilibre ou un excès nutritionnel vont résulter en une atténuation de la régulation métabolique.

3.3.2. Promotion de l'activité physique

La méthode d'intervention la plus connue reste l'activité physique et est considérée comme thérapeutique à part entière dans de nombreuses maladies chroniques et états de santé (Depiesse et al., 2016; Inserm, 2019). Elle est importante dans les programmes de perte de poids mais également dans le maintien pondéral après une perte de poids conséquente. Il a été établi par l'OMS une liste de recommandations d'activité physique et pour les adultes de 18 à 64 ans, au moins 150 minutes par semaine d'activité physique d'endurance à intensité modérée sont préconisées. Ce temps d'activité couplé à une réduction des apports alimentaires présente un impact positif (Thompson et al., 2013). Il est évident que pour les personnes obèses, ces valeurs sont difficilement atteignables. Il est donc primordial, dans la prise en charge de l'obésité d'accompagner ces personnes en leur proposant des programmes d'activité physique adaptée. L'amélioration de la prise en charge de l'obésité infantile consiste à élaborer des recommandations spécifiques de bonnes pratiques en tenant compte des goûts individuels, de l'accessibilité des sites d'activité physique, du caractère de l'encadrement et les financements possibles (Morrissey, 2018). Dans une récente méta-analyse (García-Hermoso et al., 2020), l'estimation du changement minimum de la capacité cardiorespiratoire nécessaire pour réduire le pourcentage de graisse corporelle permet ensuite d'adapter les programmes d'exercice chez l'enfant et l'adolescent. Chez l'adulte atteint de syndrome métabolique, des programmes d'intervention sur le mode de vie ont été appliqués par un régime standardisé et l'activité physique durant 6 mois. L'apport calorique journalier devait atteindre un déficit de 500 kcal par jour et l'activité physique reposait sur l'endurance et des exercices de résistance. Ce type d'intervention a permis de réduire la résistance à l'insuline, l'inflammation ainsi que d'améliorer la fonction vasculaire (Vinet et al., 2015). Dans la même cohorte, ils ont également attribué aléatoirement différentes modalités d'exercices avec des répartitions différentes de l'entraînement par

endurance et résistance (Dutheil et al., 2013).

3.3.3. Apport en micronutriments

Alors que l'obésité est couramment liée à un apport énergétique excessif par rapport aux besoins ; elle peut aussi être associée à des apports déficitaires en certains micronutriments. La prévalence et les mécanismes de carences en macronutriments et en micronutriments chez les personnes obèses et plus particulièrement avant et après chirurgie bariatrique ont été décrits en détails dans une récente revue par Mohapatra et son équipe (Mohapatra et al., 2020). De plus, une autre étude issue de l'enquête transversale NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey), représentant la population des Etats-Unis et utilisant les données de près de 3000 personnes âgées de plus de 60 ans, a permis d'examiner le statut en micronutriments et la qualité globale de l'alimentation, chez les personnes en situation d'obésité (Jun et al., 2020). Ces résultats ont montré que le pourcentage de personnes présentant une insuffisance en magnésium était significativement augmenté en cas d'obésité, aussi bien chez les hommes que chez les femmes. Par ailleurs, chez les femmes uniquement, les personnes en situation d'obésité sont plus à risque d'avoir des apports insuffisants en calcium et en vitamine B6. Des déficiences en rétinol, anti-oxydants comme la vitamine C et E, du β -carotène, des folates, du fer et du sélénium ont également été relevées (Damms-Machado et al., 2012 ; Garcia et al., 2019). Lorsque ceux-ci sont identifiés comme déficients, le statut oxydatif de l'individu est compromis et augmente ainsi le risque de développer les comorbidités associées à l'obésité. C'est également le cas de la vitamine D où une déficience est associée à l'obésité (García et al., 2009) et au risque de développer une résistance à l'insuline (Szymczak-Pajor and Śliwińska, 2019). Nous reviendrons sur la vitamine D dans la partie suivante (Partie 4).

3.3.4. Stratégies alternatives

En plus de ces interventions « classiques », de nouvelles stratégies thérapeutiques en recherche sont étudiées. L'exposition au froid favorise le développement de la graisse brune, considérée comme métaboliquement active (Manfredi, 2020; Palmer and Clegg, 2019; Peres Valgas da Silva et al., 2019). L'exposition au froid permet d'activer le tissu adipeux brun et donc la thermogénèse non-frissonnante qui provoque une augmentation de la dépense énergétique. Ensuite, il existe le jeun intermittent qui est présent sous différentes formes : une alternance d'un jour sur deux, de deux jours

par semaine ou encore d'une limitation quotidienne du temps passé à manger. Ces méthodes ont rapporté des effets bénéfiques sur la perte de poids, sur l'installation d'une restriction énergétique spontanée ou encore la sensibilité à l'insuline (Gabel and Varady, 2020). Enfin, la diète cétogène est caractérisée par une restriction calorique, une quantité de protéines suffisante pour le maintien de la masse maigre et une faible teneur en glucides (<30-50 g/jour) renforcée par un apport en lipides (Casanueva et al., 2020). Ceci favorise l'épuisement des réserves de glucose (i.e. glycogène hépatique et musculaire) pour entraîner la dégradation des acides gras sous forme de corps cétoniques qui ont des propriétés anorexigènes permettant la perte de poids.

4. La vitamine D

La découverte de la vitamine D est liée à une maladie touchant les enfants vivant dans des régions pauvres et faiblement ensoleillées, le rachitisme. Dans les années 1920, les chercheurs Mellanby et McCollum ont démontré l'efficacité de l'huile de foie de morue dans le traitement du rachitisme et nommeront la substance antirachitique contenue dans l'huile : vitamine D. Depuis, elle est également connue pour son implication dans les maladies osseuses chez l'adulte (ostéomalacie, ostéoporose) et considérée comme essentielle à la bonne santé osseuse par le maintien de l'homéostasie calcique.

4.1. Sources

La vitamine D est une hormone liposoluble appartenant à la famille des stérols et plus particulièrement à la classe des sécostéroïdes. On la retrouve sous 6 formes principales dans l'organisme : l'ergocalciférol, le cholécalciférol (forme native et majoritaire), la 25-hydroxyvitamine D₂ et D₃ (25(OH)D₂, 25(OH)D₃) ou calcidiol (forme circulante) et la 1,25dihydroxyvitamine D₂ et D₃ (1,25(OH)₂D₂, 1,25(OH)₂D₃) ou calcitriol (forme active) (Figure 17).

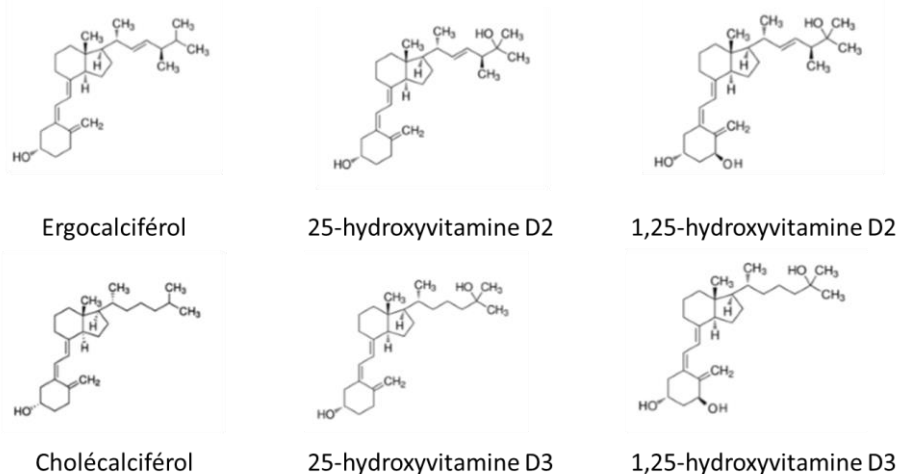


Figure 17 : Structure des différentes formes de la vitamine D (Adapté de Landrier et al., 2012).

La vitamine D peut provenir de deux sources, endogène et exogène. Dans un premier temps, la synthèse endogène est réalisée par la peau suite à une exposition aux ultraviolets B (UVB longueurs d'onde 290 – 315 nm) (Lehmann and Meurer, 2010). Elle est possible puisqu'au niveau de l'épiderme et du derme, le 7-déhydrocholestérol, un dérivé du cholestérol est présent au niveau des membranes cellulaires. Les rayons UVB fournissent l'énergie nécessaire afin de le transformer en pré-vitamine D3, rapidement convertie en vitamine D3 sous l'effet de la chaleur. La vitamine D3, aussi nommée cholécalficérol, est libérée dans la circulation. Cette synthèse par la peau est limitée par différents paramètres incluant la pigmentation de la peau, l'âge, l'incidence de l'angle formée par le soleil, sa latitude, la saison, la qualité de l'air et la surface corporelle d'exposition (Battault et al., 2013). Une exposition comprise entre 7 et 30 minutes par jour entre le mois d'avril et octobre permet de couvrir 50 à 70% des besoins en vitamine D (Bouillon, 2017). Cependant, l'apport endogène est largement remis en cause et afin d'obtenir un apport suffisant en vitamine D, des apports nutritionnels sont nécessaires.

La deuxième source, exogène, concerne l'apport par l'alimentation. Elle peut se faire par l'apport de vitamine D2, ou ergocalciférol qui est principalement retrouvée dans les végétaux ou par le cholécalficérol retrouvée principalement dans les substances animales. Ce dernier est présent dans l'huile de foie de morue, les poissons gras (saumon, maquereau, harengs, thon), le foie de veau, le jaune d'œuf, les arachides (cacahuètes) et les produits laitiers (Tableau 7).

Tableau 7 : Principales sources alimentaires de vitamine D3 (1µg = 40 UI) (D'après la table du Centre d'informations sur la qualité des aliments, 2012).

Aliments	Vitamine D3 (µg / 100 g)	Vitamine D3 (UI / 100 g)
Viande, œufs, poissons		
Huile de foie de morue	250	10 000
Hareng, saumon	8 – 22	320 – 880
Thon, maquereau, sardine, anchois	7 – 10	280 – 400
Foie de veau	2.5	100
Jaune d'œuf	2.1	84
Fruits, légumes, légumineuses et oléagineux		
Cacahuète ou arachide	10.3	412
Champignons	3.1 – 5.3	124 – 212
Laits et produits laitiers		
Laitages enrichis	1.25	50
Beurre	1.1	44

Dans le calcul des apports alimentaires en vitamine D, l'apport exogène en 25(OH)D est largement sous-estimé, pourtant elle est naturellement présente dans un grand nombre d'aliments de consommation courante (Ovesen et al., 2003). De plus, il semble que son absorption soit plus efficace que celle de la vitamine D. Toutefois, la contribution réelle de ce métabolite dans le maintien des taux plasmatiques n'est pas complètement établie et nécessite de plus amples recherches afin d'en tenir compte dans les calculs d'apports vitaminiques chez l'Homme.

4.2. Recommandations

Depuis 2017, la nouvelle appellation « Référence nutritionnelle pour la population » (RNP) est utilisée par l'ANSES pour définir les apports journaliers recommandés en nutriments. La RNP en vitamine D a été établie en considérant que la synthèse endogène cutanée était nulle, afin de couvrir les besoins nutritionnels de la quasi-totalité de la population française, sans distinction socio-économique ou géographique. Certes cette hypothèse est extrême, mais il est évident que c'est un critère difficile à estimer puisqu'il est variable selon les individus.

Les valeurs nutritionnelles de référence (VNR) de l'Agence Européenne de la Sécurité Alimentaire (EFSA) ont permis de fixer les RNP de la vitamine D afin

d'assurer son rôle dans le maintien de l'ossature et des fonctions musculaires (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2016). Cependant, l'EFSA n'a pas pris en compte les autres bénéfices supposés de la vitamine D comme les cancers et les maladies cardiovasculaires. L'apport adéquat pour un adulte a été fixé à 15µg par jour pour un adulte et de 10µg par jour pour les nourrissons (Tableau 8). En accord avec ces valeurs, le SACN qui est le Comité Scientifique Consultatif de Nutrition en Angleterre a fixé à 10µg par jour l'apport pour les adultes et entre 8,5-10 µg par jour pour les nourrissons.

Cependant, ces recommandations sont bien éloignées de la consommation réelle de vitamine D. En France, l'étude INCA 3 (Etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires), réalisée sur la période 2014-2015, a eu pour objectif de réaliser une base de données de la consommation alimentaire au niveau individuel. Ceci a permis d'estimer à 3,1 µg/jour d'apport en vitamine D chez l'adulte et inférieur à 3 µg/jour chez l'enfant contre les 15 µg recommandés.

Tableau 8 : Références nutritionnelles en vitamine D conseillées pour la population (Issues des données VNR de l'EFSA, 2016).

Tranche d'âge	RNP (µg / jour)	RNP (UI / jour)
Nourrisson (7 – 11 mois)	10	400
Enfants (1 – 17 ans)	15	600
Adultes (homme, femme)	15	600
Femmes enceintes et allaitantes	15	600

4.3. Insuffisance en vitamine D

La vitamine D est principalement retrouvée sous forme de 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D) dans la circulation sanguine, aussi appelée calcidiol. Les cliniciens l'utilisent afin de pouvoir évaluer le statut en vitamine D. Elle peut être mesurée par différentes techniques comme la chromatographie en phase liquide à haute performance, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ou bien encore des immuno-essais. Une carence est observée lorsque les concentrations plasmatiques de 25(OH)D sont inférieures à 10 ng/mL et une intoxication est observée lorsque celles-ci sont supérieures à 150 ng/mL (Tableau 9). Les niveaux entre 10 et

30 ng/ml correspondent à une situation d'insuffisance, tandis que des valeurs entre 30 et 90 ng/ml sont considérées comme les valeurs à atteindre (valeurs de référence) (Holick, 2007).

Tableau 9 : Valeurs déterminant les différents statuts en vitamine D.

	Concentrations plasmatiques 25(OH)D en ng.mL⁻¹	[25(OH)D] en nmol.L⁻¹
Carence	< 10	< 25
Insuffisance	10 – 30	25 – 75
Valeurs cibles	30 – 90	75 – 225
Surdose	> 100	250
Intoxication	> 150 – 200	> 375

En plus de la mesure des concentrations plasmatiques de 25(OH)D, il existe d'autres marqueurs permettant de refléter l'insuffisance ou la carence en vitamine D. La mesure des taux sériques en 25(OH)D libre a récemment été évoquée, comme nouveau marqueur du statut plasmatique en vitamine D (Bikle et al., 2017). Il a été rapporté une corrélation entre les taux plasmatiques en 25(OH)D libre et les taux plasmatiques en 25(OH)D totale chez l'Homme (Oleröd et al., 2017). Cependant, des études appropriées sont nécessaires afin de définir l'intérêt clinique du dosage de la 25(OH)D libre, plutôt que de la 25(OH)D totale, chez des sujets sains ainsi que dans diverses pathologies (Bouillon, 2016). D'autres marqueurs peuvent être utilisés comme les concentrations plasmatiques en calcium, phosphore ou encore de l'hormone parathyroïdienne (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2016). Cependant, la mesure de la 25(OH)D totale reste la plus utilisée quant à l'analyse du statut vitaminique d'un individu.

Bien que la vitamine D ait une double origine (endogène et exogène), la population française dans sa globalité est fortement en carence ou en insuffisance. D'après les données de l'Étude Nationale Nutrition Santé (ENNS) effectuée entre 2006-2007 (Vernay et al., 2012), 40% de la population française est déficiente si le seuil plasmatique de 25(OH)D est fixé à 20 ng/mL et de 80% s'il est placé à 30 ng/mL. Cette forte prévalence peut s'expliquer d'une part par le faible nombre d'aliments riches en vitamine D consommés et d'autre part par une faible néosynthèse cutanée de vitamine D. Autrefois, elle était considérée comme majoritaire avec 50 à 70% des

besoins en vitamine D couverts alors que certains facteurs peuvent influencer la synthèse endogène de la vitamine D. Tout d'abord, la zone de résidence est un facteur à prendre en compte puisque l'intensité des rayons UVB n'est pas la même en fonction de la latitude, l'altitude, la saison et de l'heure d'exposition. De plus, suivant le lieu d'habitation, la synthèse ne sera pas la même que l'on vive à la campagne ou dans une mégapole polluée. Les personnes âgées ont également une diminution de la synthèse cutanée de vitamine D avec une concentration en 7-déhydrocholestérol plus faible (MacLaughlin and Holick, 1985). Enfin, la pigmentation de la peau joue un rôle dans cette synthèse avec une prédisposition des individus à peau foncée à moins être efficace. En d'autres termes, ils doivent s'exposer plus longtemps au soleil que les individus à peau claire pour produire des quantités égales de cholécalciférol (Meunier, 2008).

4.4. Supplémentations en vitamine D

Au vu du grand nombre d'insuffisances observées dans différentes pathologies, la supplémentation en vitamine D reste essentielle à l'équilibre nutritionnel. Avant d'envisager le recours à une supplémentation pharmacologique, plusieurs recommandations peuvent être préconisées en intervenant sur le plan nutritionnel et comportemental. Par exemple, une exposition au soleil des bras et des jambes pendant 5 à 30 minutes, 2 fois par semaines, entre 10 et 15 heures, hors période hivernale, accroît significativement les taux plasmatiques de 25(OH)D. Si le corps entier est exposé, 20 000 UI de vitamine D peuvent être apportées.

Du point de vue de l'alimentation, il reste très difficile de compenser une carence en vitamine D par la nutrition puisque peu d'aliments en contiennent naturellement et ont une teneur lipidique importante. Par exemple, la consommation de poissons gras ne doit pas excéder la fréquence de deux fois par semaine afin d'éviter l'exposition aux métaux lourds, selon l'ANSES. C'est pourquoi des prescriptions de vitamine D sont utilisées. Une posologie minimale de 800 UI/j de vitamine D3 apparaît nécessaire pour protéger l'os et semble être un prérequis utile en termes de santé publique (Audran and Briot, 2010). Enfin, même si les doses et les durées sont très bien connues, un surdosage en vitamine D (>250 nmol/L) peut avoir des effets néfastes sur l'organisme. En effet, un excès de vitamine D peut entraîner des nausées, vomissements, perte de poids, maux de têtes, polyurie, et dans les cas sévères une hypercalcémie engendrant une calcification tissulaire et pouvant causer des risques rénaux et cardiovasculaires

(Haute Autorité de Santé, 2013).

4.5. Métabolisme

La vitamine D apportée par l'alimentation est incorporée dans les micelles mixtes et absorbée dans la partie proximale de l'intestin grêle. Bien que longtemps considéré comme exclusivement passif, ce processus implique également des transporteurs du cholestérol. Notamment, Cluster of Differentiation 36 (CD36), Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) et Scavenger Receptor class B type 1 (SR-B1) participent à l'absorption de la vitamine D (Reboul et al., 2011). L'efficacité de l'absorption de la vitamine D va être comprise entre 55 et 99% chez l'Homme. De par sa liposolubilité, elle sera plus efficace en présence de sels biliaires et en présence de graisses alimentaires dans la lumière intestinale (Reboul, 2015). Celle-ci est lente, environ 40% sont absorbés en 12h et elle couvre 10 à 25% des besoins en vitamine D.

Après absorption, la vitamine D va être transportée jusqu'au foie grâce à son incorporation dans les chylomicrons. Les vitamines D2 et D3 ont un métabolisme sensiblement identique et dépendant des mêmes complexes enzymatiques chez l'Homme. La vitamine D néosynthétisée semble être très majoritairement liée à la Vitamin D Binding Protein (VDBP) (Haddad et al., 1981). Cette protéine lie à la fois la vitamine D mais aussi ces métabolites (25(OH)D et 1,25(OH)₂D) et constitue leur principal transporteur plasmatique.

La vitamine D3, apportée soit par synthèse endogène ou par l'alimentation est libérée dans la circulation sanguine, liée à la VDBP où elle va pouvoir exercer ses effets directs. Elle peut également être stockée dans le tissu adipeux ou encore transportée vers les organes où des hydroxylations successives lui permettront de devenir biologiquement active (Figure 18).

La vitamine D subit une première hydroxylation au niveau hépatique où elle sera hydroxylée sur le carbone 25 pour former la 25-hydroxyvitamine D₃ (25-OH-D) dont la demi-vie est relativement longue (3- 4 semaines). Plusieurs enzymes sont capables de catalyser cette réaction chez l'Homme et la souris comme la CYP27A1, CYP2R1, CYP2J2 (ou CYP2J6 chez la souris) et CYP314 (ou CYP3A11 chez la souris) et appartiennent à la famille des cytochromes P450 (CYP). La CYP2R1 semble être l'enzyme clé de cette réaction (Zhu et al., 2013a). De plus, cette étape de 25-hydroxylation semble être très peu régulée (Girgis et al., 2013), bien que de récents

travaux remettent en cause ce dogme.

Dans le sang, la 25(OH)D ainsi que la 1,25(OH)₂D sont majoritairement liées à la VDBP (85-90% de la 25(OH)D totale présente dans le plasma) alors que le reste est lié à l'albumine (10-15 %) ou sous forme libre qui correspond à environ 1% de leur quantité totale (Bikle et al., 1986).

Le complexe 25(OH)D-VDBP est endocyté par un complexe faisant intervenir les protéines mégaline, cubuline, amniloless et disabled au niveau des cellules du tubule proximal du rein. La cubuline séquestre la VDBP à la surface de la cellule avant son association avec la mégaline qui permet l'internalisation du complexe cubuline/25(OH)D/VDBP. Ce complexe est ensuite dirigé vers les lysosomes où la VDBP est dégradée et la 25(OH)D libérée dans le cytosol de la cellule. La 25(OH)D est soit réexcrétée dans le sang, soit elle se fixe à d'autres transporteurs dans la cellule rénale où son acheminement jusqu'aux mitochondries va permettre sa seconde hydroxylation. Cette étape est réalisée par la présence de la 1 α -hydroxylase, mettant en jeu la CYP27B1 (Schuster, 2011) afin de donner la 1,25-dihydroxyvitamine D3 (1,25(OH)₂D), forme active de la vitamine D (Dusso et al., 2005) dont la demi-vie est de quelques heures (4 heures). L'activation de ces hydroxylations sont dépendantes de la régulation de l'hormone parathyroïdienne (PTH), du calcium (Ca²⁺) ainsi que du phosphore (P).

Un processus autorégulé d'inactivation est régulé par l'expression du CYP24A1 (Schuster, 2011). Cette enzyme permet l'hydroxylation de la 1,25(OH)₂D en 25(OH)D sur le carbone 24. Ce mécanisme permet l'obtention de métabolites inactivés, moins polaires et moins actifs, qui vont ensuite être pris en charge et excrétés par la bile.

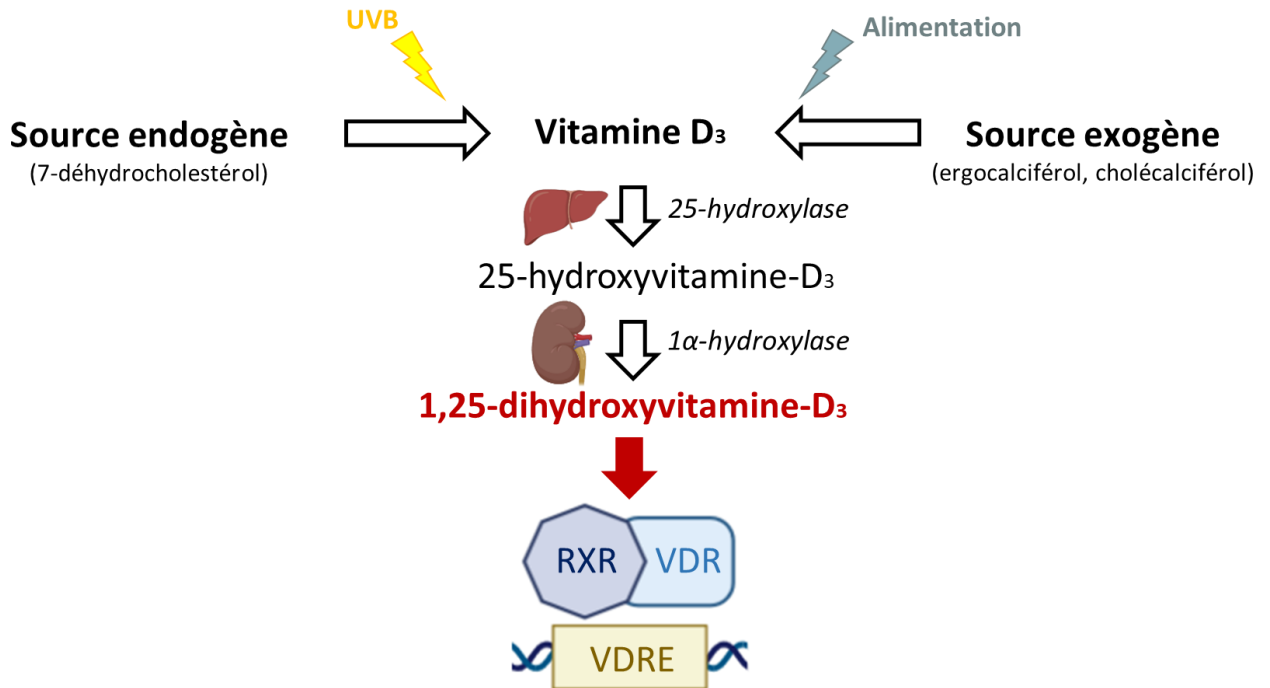


Figure 18 : Métabolisme général de la vitamine D. VDR : Vitamin D Receptor ; VDRE : Vitamin D Response Element ; RXR : Retinoic Acid Receptor.

4.6. Mécanismes d'action

La 1,25(OH)₂D, métabolite actif de la vitamine D présente à la fois des effets génomiques, non génomiques et épigénétiques.

Les effets génomiques de la vitamine D font intervenir le Vitamin D Receptor (VDR) appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires et des hormones stéroïdes où la 1,25(OH)₂D va venir se lier. Ce complexe 1,25(OH)₂D-VDR va être transloqué au niveau du noyau cellulaire pour ensuite se lier au récepteur de l'acide rétinoïque, le Retinoic Acid Receptor (RXR). En présence de ligand, l'hétérodimère formé par le VDR-RXR se lie à l'ADN sur les éléments de réponses à la vitamine D (VDRE) dans des régions promotrices de gènes. Ceci entraîne par la suite la transcription de gènes cibles où les gènes vont être activés ou réprimés. La plupart des tissus humains et types cellulaires expriment le VDR (Bouillon et al., 2008; Christakos et al., 2015). Au vu de sa distribution ubiquitaire, ceci permet d'expliquer qu'un grand nombre de gènes soit régulé de manière directe ou indirecte par la 1,25(OH)₂D (Bouillon et al., 2008). La vitamine D va être impliquée dans de nombreuses voies métaboliques telles que le métabolisme calcique, l'inflammation, l'apoptose, l'angiogenèse ou encore la prolifération et la différenciation cellulaires (Christakos et al., 2015; Jeon and Shin,

2018). Cette régulation des gènes cibles implique le recrutement de coactivateurs ou de corépresseurs lors de la fixation du ligand au VDR (Girgis et al., 2013; Rosen et al., 2012). De plus, d'autres éléments comme le niveau de méthylation et d'acétylation de la chromatine vont orienter cette régulation génique.

Outre la régulation par la présence de ligand, le VDR peut également réguler l'expression génique de manière indépendante en s'hétérodimérisant avec RXR sur des régions promotrices. Il est donc important de noter que la régulation génique de la vitamine D fait intervenir de nombreux facteurs de transcription et ainsi devenir très complexe.

Il peut également y avoir des modifications non-génomiques impliquant le récepteur membranaire Protein Disulfide Isomerase Family A member 3 (PDIA3). Il participe au captage rapide du calcium (Nemere et al., 2010) au niveau de l'entérocyte mais également au niveau des ostéoblastes, hépatocytes ou les cellules β du pancréas. Après fixation et activation par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, il va permettre d'activer de nombreuses voies comme celles des phospholipases C et A2, les Mitogen-Activated Protein kinases (MAPK), la protéine kinase C ainsi que les canaux calciques (Landrier, 2014). La réponse au calcitriol par ce récepteur va être à l'origine de réponses très rapides pouvant aller de quelques secondes à quelques minutes.

Enfin, des modifications épigénétiques peuvent avoir lieu comme la méthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG (Fu et al., 2013) en régulant l'expression d'histones méthylases et de DNA méthyltransférases. De même, la vitamine D agit sur la régulation d'histones acétylases (HAT) et d'histones désacétylases (HDAC) ainsi que sur leur recrutement (Karlic and Varga, 2011) permettant donc de jouer sur le niveau d'acétylation des histones. Enfin, la vitamine D via son récepteur est capable de réguler l'expression des micros ARN (miRNAs) de manière directe ou indirecte en modulant l'activité de facteurs de transcriptions (Karkeni et al., 2018; Lisse et al., 2013).

4.7. Sites de stockage et tissus cibles

Le tissu adipeux représente le principal site de stockage de la vitamine D sous forme native (cholécalférol) ou sous forme de $25(\text{OH})\text{D}$ ainsi que dans le muscle (Tableau 10) (Heaney et al., 2009; Landrier et al., 2012). Il est également la cible de la vitamine D avec la présence de VDR et un lieu de synthèse locale de calcitriol par la

présence de la 1α -hydroxylase. Il a été montré que le tissu adipeux viscéral contient 20% de plus de vitamine D que le tissu adipeux sous-cutané (Beckman et al., 2013). De plus, 65% de la forme totale de vitamine D présente dans l'organisme est sous forme de vitamine D₃ (73% au niveau du tissu adipeux et 13% au niveau du muscle). Concernant la 25(OH)D, 34% sont retrouvés dans le tissu adipeux, 30% dans le sérum et 20% dans le muscle.

Tableau 10 : Principaux sites de stockage de la vitamine D (D'après Heaney et al. 2009).

	Vitamine D (UI)	25(OH)D (UI)	Total (UI)
Tissu adipeux	6960	1763	8723
Muscle	1527	1055	2581
Foie	168	214	382
Sérum	271	1559	1830
Autre	571	578	1149
Total	9426	5169	14665

4.8. Effets de la vitamine D sur la biologie du tissu adipeux

4.8.1. Métabolisme de la vitamine D

Le tissu adipeux exprime la plupart des enzymes nécessaires au métabolisme de la vitamine D (Wamberg et al., 2013a). Dans l'étude de Zoico (Zoico et al., 2014), la 25-hydroxylation semble être fonctionnelle dans le tissu adipeux puisque l'ajout de vitamine D dans un milieu de culture contenant des adipocytes permet la production de 25(OH)D. La 1α -hydroxylase est également fonctionnelle dans le tissu adipeux puisqu'elle a permis la conversion de la 25(OH)D en $1,25(OH)_2D$ dans des cultures d'adipocytes (Ching et al., 2011; Li et al., 2008; Nimitphong et al., 2012). L'expression du VDR a été retrouvée dans des pré-adipocytes humains et adipocytes différenciés en culture (Trayhurn et al., 2011), des adipocytes 3T3-L1 (Kamei et al., 1993) et dans le tissu adipeux humain sous-cutané et viscéral (Ding et al., 2012). L'absorption et la sécrétion de la vitamine D par le tissu adipeux impliquent de nombreux mécanismes moléculaires dont certains ont été identifiés par de récents travaux du laboratoire. Notamment, il a été montré que toutes les enzymes nécessaires au métabolisme de la

vitamine D étaient présentes dans le tissu adipeux et l'adipocyte murin (Bonnet et al., 2018). De plus, le stockage de la vitamine D et ses métabolites est finement régulé et contrôlé par la cubuline, une protéine d'endocytose (Bonnet et al., 2018).

4.8.2. Effets anti-inflammatoires de la vitamine D

Les effets anti-inflammatoires de la vitamine D ont beaucoup été étudiés dans des modèles *in vitro*. Il a été montré que la 1,25(OH)₂D diminuait significativement la libération d'IL8, MCP1 et IL6 par les préadipocytes humains (Gao et al., 2013) et MCP1 par les adipocytes humains (Lorente-Cebrián et al., 2012) et murins (Marcotorchino et al., 2012). En accord avec ces résultats, Wamberg et son équipe ont montré que l'incubation d'adipocytes humains avec la 1,25(OH)₂D permettait de réduire l'expression d'IL6, IL8 et MCP1 (Wamberg et al., 2013b). Cet effet anti-inflammatoire était également médié par une diminution de l'infiltration leucocytaire et de la migration macrophagique (Zoico et al., 2014). Les travaux de notre laboratoire sur des cultures d'adipocytes humains et murins prétraités avec la 1,25(OH)₂D ont également rapporté une baisse d'expression et de sécrétion de nombreuses chimiokines, induites par le TNF α (Karkeni et al., 2015a). De plus, ils observaient une limitation de la migration macrophagique induite par le milieu conditionné dans des adipocytes murins. Ces observations ont été étudiées plus en détails et ont permis de décrire les mécanismes moléculaires impliqués dans ces effets. L'effet anti-inflammatoire de la vitamine D est principalement médié par une inhibition des voies de signalisation NF- κ B et des MAPK (Karkeni et al., 2015a; Marcotorchino et al., 2012; Mutt et al., 2012) et par la modulation de microARNs pro-inflammatoires (Karkeni et al., 2018).

Ces résultats ont également été confirmés dans des modèles *in vivo*. Notre groupe a montré qu'une supplémentation en vitamine D entraînait une limitation de l'expression des chimiokines et de l'infiltration leucocytaire au sein du tissu adipeux chez un modèle murin d'inflammation chronique (Karkeni et al., 2015a). En accord avec ces données, une autre étude a rapporté une diminution de la concentration de TNF α et MCP1 dans le tissu adipeux de rats soumis à un régime riche en graisse et supplémentés en vitamine D (Farhangi et al., 2017).

4.9. Relation vitamine D et obésité

La déficience en vitamine D observée chez les individus obèses peut être causée par différents changements comportementaux : une diminution de l'apport en vitamine D, par une moindre exposition au soleil, par le manque d'activités en extérieur et le port d'habits couvrants (Landrier, 2014). D'autres explications sont plus vraisemblables et la première hypothèse a été émise par Wortsman et son équipe (Wortsman et al., 2000). Pour eux, la baisse de biodisponibilité de la 25(OH)D était due à la séquestration dans le tissu adipeux de la vitamine D. Puisque dans l'obésité, il y a une expansion du tissu adipeux, il représente ainsi un réservoir plus important de stockage. Cependant, cette hypothèse a ensuite été reprise par Drincic et son équipe (Drincic et al., 2012) où ils ont rapporté une corrélation entre les bas taux plasmatiques de 25(OH)D et le volume total des individus. Il en résulte l'hypothèse de la dilution volumétrique. Enfin, la dernière hypothèse serait celle d'une modification du métabolisme enzymatique et des cytochromes impliqués dans l'activation biologique de la vitamine D (Park et al., 2015; Wamberg et al., 2013a). En effet, une récente étude de notre laboratoire a pu mettre en évidence que le tissu adipeux et l'adipocyte en particulier jouaient un rôle actif dans la production et le stockage de la 25(OH)D, par la modulation d'expression des enzymes impliquées dans la 25- et la 1,25-hydroxylation (Bonnet et al., 2019a). Des données récentes suggèrent aussi une diminution de la 25-hydroxylation hépatique lors de l'obésité/diabète de type 2 qui pourrait expliquer en partie la diminution de 25(OH)D lors de l'obésité (Aatsinki et al., 2019; Bonnet et al., 2020; Roizen et al., 2019).

4.10. Effet de la vitamine D sur l'obésité

4.10.1. Etudes cliniques

Du fait de la déficience en vitamine D observée chez les personnes obèses, de nombreuses études ont eu recours à la supplémentation en vitamine D dans des programmes de perte de poids (Tableaux 11-12). Différentes méthodologies ont été appliquées, utilisant différentes doses et différentes modalités d'administration. Dans la majorité des études, la supplémentation en vitamine D n'a pas induit de différence concernant la perte de poids (Al-Daghri et al., 2016; Farag et al., 2018; Holecki et al., 2008; Mai et al., 2017; Mason et al., 2014; Rosenblum et al., 2012; Salehpour et al., 2012; Sneve et al., 2008; Wamberg et al., 2013c; Zhou et al., 2010; Zittermann et al., 2009). Cependant, avec une dose plus ou moins forte (50 000 UI par semaine ou

100 000 UI toutes les 2 semaines), une perte de poids est rapportée (Hanafy and Elkatawy, 2018; Khosravi et al., 2018). Encore plus intéressant, lorsque l'on s'intéresse à la masse grasse, la supplémentation en vitamine D permet de réduire significativement son pourcentage (Hanafy and Elkatawy, 2018; Salehpour et al., 2012; Zhu et al., 2013b).

4.10.2. *Etudes expérimentales*

Sur le plan expérimental, peu d'études ont été réalisées dans le cadre de la perte de poids. Cependant, des données sont disponibles en prévention de l'apparition de l'obésité où la supplémentation en vitamine D permet une limitation de l'expansion du tissu adipeux et de la prise de poids malgré la consommation d'un régime riche en sucre et en graisse durant 10 semaines chez des souris c57/bl6 (Marcotorchino et al., 2014). Ceci est associé à une augmentation de la dépense énergétique due à une oxydation accrue de lipides. En effet, chez des souris supplémentées en vitamine D, l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial et dans l'oxydation lipidique est fortement induite dans le muscle, le foie ou encore le tissu adipeux brun. De nombreuses études ont confirmé ces résultats et mis en évidence une limitation de la prise de poids. Une étude sur des rats Sprague-Dawley soumis au régime riche en sucre et en graisse associé à une supplémentation en vitamine D durant 8 semaines a également rapporté une limitation de la prise de poids (Yin et al., 2012). Des résultats similaires ont été observés chez la souris (Sergeev, 2016; Sergeev and Song, 2014). De plus, une augmentation de la masse grasse a été observée chez des rats déficients en vitamine D (Chanet et al., 2017).

Tableau 11 : Effets de la supplémentation en vitamine D dans des programmes de perte de poids chez la personne obèse.

Auteurs	Année	Sujets	Durée	Supplémentation	Effets
(Al-Daghri et al.)	2016	Obèses adultes	12 mois	Aliments riches en vitamine D Exposition au soleil et activité physique	Pas de changement de poids Augmentation de l'irisine
(Farag et al.)	2018	Adultes avec syndrome métabolique	12 semaines	2 000 UI/jour Exercice	Pas d'effet sur la perte de poids
(Hanafy and Elkatawy)	2018	Adultes avec obésité réfractaire	12 semaines	Restriction calorique Exercice modéré 100 000 UI cholécalciférol toutes les 2 semaines	Perte de poids, amélioration de la sensibilité à l'insuline, diminution graisse sous-cutanée
(Holecki et al.)	2008	Femmes obèses	3 mois	10 UI cholécalciférol/jour Calcium	Pas d'effet sur la perte de poids et masse grasse
(Khosravi et al.)	2018	Femmes obèses	6 semaines	50 000 UI cholécalciférol par semaine	Effet sur la perte de poids et diminution IMC
(Mai et al.)	2017	Adultes obèses	28 jours	600 000 UI cholécalciférol	Pas de changement de poids Réduction du ratio leptine/adiponectine
(Mason et al.)	2014	Femmes obèses post-ménopausées	12 mois	2 000 UI cholécalciférol/jour	Pas d'effet sur le poids ou la masse grasse

Tableau 12 : Effets de la supplémentation en vitamine D dans des programmes de perte de poids chez la personne obèse (Suite).

Auteurs	Année	Sujets	Durée	Supplémentation	Effets
(Rosenblum et al.)	2012	Adultes en surpoids ou obèses	16 semaines	Vitamine D contenue dans jus d'orange Calcium	Pas d'effet sur le poids mais réduction de la masse grasse viscérale
(Salehpour et al.)	2012	Femmes en surpoids ou obèses	12 semaines	1 000 UI cholécalciférol/jour	Pas d'effet sur le poids mais réduction de la masse grasse
(Sneve et al.)	2008	Adultes en surpoids ou obèses	12 mois	20 000 UI cholécalciférol 2 fois par semaine Calcium	Pas d'effet sur le poids ni sur la masse grasse
(Wamberg et al.)	2013	Adultes obèses	26 semaines	7 000 UI cholécalciférol/jour	Pas d'effet sur le poids ni facteurs de risques métaboliques et inflammatoires
(Zittermann et al.)	2009	Adultes obèses	12 mois	3332 UI cholécalciférol/jour	Pas d'effet sur le poids mais effets bénéfiques sur certains facteurs de risques cardiovasculaires
(Zhou et al.)	2010	Femmes post-ménopausées en surpoids	4 ans	1 100 UI cholécalciférol/jour Calcium	Pas d'effet sur l'IMC
(Zhu et al.)	2013	Jeunes adultes obèses	12 semaines	125 UI cholécalciférol/jour Calcium	Baisse de la masse grasse (%) et masse grasse viscérale

4.11. Effet de la vitamine D sur l'insulino-résistance

Les premiers travaux réalisés sur les effets de la vitamine D et l'insuline remontent aux années 1980. Il a été démontré que la vitamine D stimule la sécrétion d'insuline dans les cellules β pancréatiques dans différents modèles précliniques ou cellulaires (Norman et al., 1980). Cette stimulation est possible par un mécanisme moléculaire impliquant à la fois les flux calciques, mais aussi le VDR. En parallèle, il a été montré que la vitamine D augmente la sensibilité périphérique à l'insuline qui est inversement corrélée à l'inflammation métabolique résultant de l'obésité.

4.11.1. *Etudes cliniques*

Ces découvertes ont permis de mettre en avant l'importance de la vitamine D dans la sensibilité à l'insuline. Ainsi, il a été démontré par la suite que la résistance à l'insuline était fortement liée à une déficience en vitamine D (Cheng et al., 2010). En effet, une étude sur des sujets tolérants au glucose a rapporté une corrélation positive entre la concentration en 25(OH)D et la sensibilité à l'insuline et également que l'hypovitaminose D avait des effets négatifs sur la fonction des cellules β pancréatiques (Chiu et al., 2004). En outre, une autre étude sur des enfants et adolescents obèses a montré que les sujets déficients en vitamine D présentaient une diminution de la sensibilité à l'insuline en comparaison avec des sujets ayant des concentrations suffisantes en vitamine D (Alemzadeh et al., 2008).

Dans ce cadre, des essais cliniques et des études interventionnelles ont eu un grand intérêt pour la supplémentation en vitamine D dans la prise en charge de personnes ayant des troubles de l'homéostasie glucidique. Notamment, dans la prise en charge du diabète de type 2, la supplémentation en vitamine D permettait d'améliorer le statut glycémique de patients diabétiques (Chagas et al., 2012; Nikooyeh et al., 2011; Pittas et al., 2007a). Ceci a également été retrouvé dans une récente étude où la supplémentation en vitamine D permettait de contrôler la réponse glycémique et d'améliorer la sensibilité à l'insuline (Mirhosseini et al., 2017). Dans une étude randomisée, des sujets insulino-résistants et déficients en vitamine D ont été supplémentés en vitamine D et avaient une meilleure sensibilité et résistance à l'insuline par rapport aux contrôles, même si aucun effet n'était rapporté sur la sécrétion d'insuline (von Hurst et al., 2010). Chez des personnes à haut risque de développer un diabète un type 2 ou récemment diagnostiquées, la supplémentation

en vitamine D a permis d'améliorer la sensibilité périphérique à l'insuline, mesurée par clamp euglycémique hyperinsulinémique (Lemieux et al., 2019).

Une supplémentation en vitamine D chez des sujets souffrant d'obésité réfractaire permettait de corriger la sensibilité à l'insuline (Hanafy and Elkatawy, 2018). Aussi, la vitamine D améliorait la sensibilité à l'insuline post-prandiale chez des hommes sains susceptibles de présenter une résistance à l'insuline (non-diabétique, obésité centrale) (Nagpal et al., 2009) et de limiter l'hyperglycémie chez des adultes souffrant de troubles de la glycémie à jeun (Pittas et al., 2007b).

Il est intéressant de noter que la supplémentation ne bénéficie qu'aux personnes en situation de diabète et pas aux personnes ne présentant pas de troubles de l'homéostasie glucidique (Seida et al., 2014). Un bénéfice de la vitamine D est également observé sur la sécrétion d'insuline uniquement chez les diabétiques récemment diagnostiqués, suggérant que la vitamine D n'est pas efficace une fois les cellules pancréatiques défectueuses (Alvarez and Ashraf, 2010).

4.11.2. *Etudes expérimentales*

Les études sur l'animal ont également permis de mettre en évidence le lien entre la vitamine D et la résistance à l'insuline. Il a été montré que l'administration de vitamine D à des rats déficients augmentait la sécrétion d'insuline et réduisait la réponse glycémique suite à l'injection intraveineuse d'une charge de glucose (Cade and Norman, 1987). De la même façon, lorsque les souris ne possédaient pas de récepteur à la vitamine D fonctionnel, elles présentaient une perturbation de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose, liée à une baisse de synthèse d'insuline (Zeitz et al., 2003). Récemment, une étude a montré qu'une surexpression des récepteurs à la vitamine D chez des souris diabétiques préservait les cellules β pancréatiques et réduisait leur statut inflammatoire, assurant ainsi une protection contre le diabète (Morró et al., 2020).

Un nombre limité d'études interventionnelles sur le modèle animal ont été réalisées pour décrire le rôle de la vitamine D dans le traitement du diabète de type 2. Par exemple, dans un modèle de souris diabétique et obèse (souris ob/ob), il a été montré que le traitement avec de la vitamine D améliorait l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie (Kawashima and Castro, 1981). De plus, la vitamine D était capable d'améliorer l'homéostasie glucidique dans un modèle de rats hypertendus (rats SHR)

et de rats Wistar rendus diabétiques par l'alimentation (de Souza Santos and Vianna, 2005). Dans cette continuité, des rats rendus diabétiques par la streptomycine ont confirmé l'amélioration de l'homéostasie glucidique suite à une supplémentation avec de l'huile de foie de morue contenant de l'huile d'olive (Ceylan-Isik et al., 2007).

Enfin, dans un modèle *in vitro* d'adipocytes murins, notre laboratoire a montré que la vitamine D (sous sa forme active) permettait de restaurer la captation de glucose dans des adipocytes murins rendus insulino-résistants, par les effets anti-inflammatoires de la vitamine D (Marcotorchino et al., 2012). Dans un autre modèle *in vitro*, la vitamine D était capable de réduire les acides gras induits par l'insulino-résistance à la fois au niveau périphérique et dans les hépatocytes (Zhou et al., 2008).

De plus, dans une autre étude réalisée chez des souris c57bl/6j soumises à un régime riche en sucre et en graisse durant 10 semaines, une limitation de l'augmentation des taux de glucose grâce à la supplémentation en vitamine D a été rapportée (Marcotorchino et al., 2014). Cette amélioration de l'insulino-résistance a été retrouvée dans un modèle de rats diabétiques et semblait être médiée par une diminution de la dégradation de l'insuline et par une augmentation de la phosphorylation du récepteur à l'insuline (Elseweidy et al., 2017).

4.12. Effet de la vitamine D sur la stéatose hépatique

Comme évoqué précédemment, l'obésité est fortement associée à l'insulino-résistance et par conséquent à la stéatose hépatique (NAFLD). Du fait de l'importance de la vitamine D dans ces pathologies, la question de l'effet de la vitamine D sur les maladies hépatiques a vu le jour. En effet, dans une étude clinique incluant des adultes ayant un taux normal d'enzymes hépatiques sériques, de faibles concentrations en 25(OH)D étaient corrélées à la présence de stéatose hépatique, indépendamment du syndrome métabolique, de l'obésité et du profil insulino-résistant (Barchetta et al., 2011). Cette observation a ensuite été confirmée dans une étude où des patients atteints de NAFLD présentaient de faibles taux en 25(OH)D (Eliades et al., 2013) et suggérait ainsi le rôle de la vitamine D dans la pathogenèse de la NAFLD (Cimini et al., 2017; Liu et al., 2019).

4.12.1. *Etudes cliniques*

Les études épidémiologiques révélant l'association entre la vitamine D et les maladies hépatiques ont ainsi conduit à l'utilisation de la vitamine D comme stratégie thérapeutique pour les dommages hépatiques (Nobili and Reif, 2015).

De nombreuses études en ont découlé et la majorité n'a pas rapporté d'effet bénéfique sur la stéatose hépatique (Barchetta et al., 2017; Sangouni et al., 2019). En effet, l'étude pilote sur la stéatohépatite non alcoolique réalisée par Kitson et son équipe, n'a pas mis en évidence d'effet de la vitamine D sur l'accumulation de graisses intra-hépatiques, l'inflammation ou la fibrose (Kitson et al., 2016). En accord avec ces données, une étude chez des patients diabétiques de type 2 et atteints de NAFLD n'a pas montré d'effet correctif de la supplémentation en vitamine D durant 24 semaines (Barchetta et al., 2016).

Cependant, d'autres études ont rapporté des effets de la supplémentation en vitamine D sur les paramètres biochimiques de la NAFLD. Par exemple, il a été montré que la supplémentation limitait les atteintes hépatiques, avec une diminution de l'inflammation hépatique mais sans changement du degré de la stéatose (Sharifi et al., 2014). Dans l'étude de Lorvand Amiri combinant la supplémentation en vitamine D et un régime hypocalorique, la vitamine D permettait de réduire les concentrations de triglycérides et d'augmenter le HDL-cholestérol (Lorvand Amiri et al., 2016) et également d'avoir des effets positifs sur le profil lipidique et la sensibilité à l'insuline (Lorvand Amiri et al., 2017). Enfin, la vitamine D réduisait la stéatose hépatique chez des patients ayant une accumulation de graisses hépatiques à partir de 4 semaines de supplémentation (Papapostoli et al., 2016).

4.12.2. *Etudes expérimentales*

La déficience en vitamine D a également été rapportée dans le modèle animal pour être associée à l'accumulation de graisses au niveau hépatique (Giblin et al., 2017) et au développement de la NAFLD (Roth et al., 2012). De plus, l'importance de cette déficience a été rapportée dans une étude chez des rattes gestantes et déficientes en vitamine D où la descendance présentait une altération du métabolisme lipidique et hépatique contribuant au développement de la stéatose hépatique (Sharma et al., 2017).

Bien que l'effet d'une supplémentation en vitamine D dans le traitement de la stéatose hépatique chez l'Homme soit controversé, les études précliniques chez l'animal démontrent un effet thérapeutique bénéfique (Karatayli et al., 2020). Par exemple, la photothérapie, permettant d'augmenter les niveaux de vitamine D, a montré des effets bénéfiques sur la progression de la stéatohépatite non alcoolique en régulant les protéines impliquées dans le transfert lipidique et le métabolisme (Nakano et al., 2011). Dans un modèle de rat atteint de stéatose hépatique induite par la consommation d'un régime riche en graisse, l'injection de vitamine D durant 2 mois permettait de prévenir la stéatose hépatique en réduisant l'accumulation de triglycérides hépatiques par l'inhibition de la lipogenèse et l'induction d'oxydation lipidique (Yin et al., 2012). De plus, les modifications concernant la lipogenèse, la beta-oxydation et l'inflammation hépatique induites par la déficience en vitamine D, étaient améliorées par la supplémentation en vitamine D durant 10 semaines chez des souris (Maia-Ceciliano et al., 2019). Cette amélioration était également retrouvée dans une étude interventionnelle sur des souris où la supplémentation en vitamine D réduisait la stéatose et mettait en avant l'effet préventif de la vitamine D sur la baisse d'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse et dans la progression de la maladie (Jahn et al., 2019).

Dans la prise en charge de l'obésité et ses pathologies associées comme l'insulino-résistance et la stéatose hépatique, la vitamine D joue un rôle majeur. Cependant, concernant les paramètres anthropométriques, la vitamine D, administrée seule, ne permet pas la perte ou le maintien de poids. Il est donc intéressant, dans des stratégies thérapeutiques de perte de poids chez les individus obèses d'associer la pratique d'activité physique.

5. L'exercice physique

Si le bien-être passe par une alimentation équilibrée et un sommeil régulier, il ne faut pas perdre de vue l'importance de la pratique d'une activité physique régulière. Il y a « le sport », mais pas seulement. Des activités quotidiennes comme la marche, le jardinage etc. constituent autant « d'activités physiques » présentant aussi des bienfaits sur la santé.

5.1. Définition

L'activité physique, selon la définition de l'OMS correspond à tout mouvement produit par les muscles squelettiques responsable d'une augmentation de la dépense énergétique. Elle résulte donc d'une activité motrice volontaire en l'absence de compétition et induisant une dépense énergétique supérieure à celle du métabolisme de repos. Les différentes activités physiques peuvent être classées en quatre principales catégories selon les fonctions physiologiques qu'elles sollicitent : cardio-respiratoire, musculaire, d'assouplissement et d'équilibre.

Selon les recommandations de l'OMS en 2018, le terme « activité physique » ne doit pas être confondu avec l'expression « faire de l'exercice », qui est une sous-catégorie de l'activité physique plus délibérée, structurée, répétitive, et qui vise à améliorer ou à entretenir un ou plusieurs aspects de la condition physique. Que le niveau d'intensité soit modéré ou plus fort, l'activité physique comporte des bienfaits pour la santé.

L'inactivité physique est quant à elle, définie par un niveau insuffisant d'activité physique ne permettant pas d'atteindre le seuil recommandé pour la santé. Le niveau d'intensité d'une activité physique est caractérisé par un outil appelé le Metabolic Equivalent Task (MET) dont la valeur est calculée par le rapport de la dépense énergétique de l'activité considérée, sur la quantité d'énergie dépensée au repos. En cas de sédentarité, cette valeur est inférieure ou égale à 1,5 MET et correspond à une situation d'éveil en position assise ou allongée.

5.2. Différentes formes d'activité physique

L'activité physique peut prendre différentes formes. Elle regroupe les tâches quotidiennes, les activités domestiques, les jeux, les transports, les loisirs, les activités professionnelles, l'exercice planifié. Les activités domestiques concernent les activités physiques réalisées chez soi, que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur (travaux ménagers, porter des courses, montées/descentes d'escaliers, bricolage, jardinage). Les activités physiques de loisirs incluent le sport, l'exercice et l'activité physique de loisirs non structurée. L'activité physique de loisirs peut être encadrée (associations, éducations populaires) ou spontanée (promenades à pied, vélo, trottinette ; équipements spécialisés en accès libre, parcours santé aménagé, terrains multisports,

pistes cyclables etc.). L'exercice constitue un sous-ensemble de l'activité physique, c'est une activité physique planifiée, structurée, répétitive dont l'objectif principal est le maintien ou l'amélioration d'une ou plusieurs composantes de la condition physique. Quant au sport, celui-ci constitue également un sous-ensemble de l'activité physique au cours duquel les participants adhèrent à un ensemble de règles communes et où un objectif est défini.

L'activité physique peut être caractérisée par plusieurs facteurs comme la fréquence de pratique, l'intensité et le type de pratique. La fréquence permet de rendre compte de la répétition des périodes d'activité dans un espace-temps. L'intensité permet d'évaluer le coût énergétique de l'activité considérée, l'augmentation de la fréquence cardiaque qu'elle provoque ou la puissance développée. Elle peut être exprimée par le MET, défini comme le rapport de la dépense énergétique liée à l'activité physique sur le métabolisme de base. 1 MET correspond au niveau de dépense énergétique au repos, assis sur une chaise (3,5 mL O₂/min/kg). Les activités supérieures à 2 METs sont considérées comme des activités physiques (Tableau 13). Le type d'activité correspond à une activité spécifique permettant d'envisager des effets physiologiques attendus comme le renforcement musculaire, l'assouplissement, le maintien de l'équilibre etc. Enfin, le temps de maintien est la durée d'une session exprimant le temps pendant lequel l'activité physique aura été maintenue, qu'elle soit réalisée en continu ou en fractionné.

Tableau 13 : Exemples d'activités physiques classées en fonction de leur intensité, pour un adulte moyen (homme ou femme de 30-40 ans de poids normal, pratiquant une activité physique au moins modérée, 5 jours par semaine ou plus).

Intensité	Mesures	Exemples
Faible	1,6 à 2,9 MET 40 à 50 % FCmax 20 à 40 % VO2max	Marche < 5 km/h, promener son chien, conduite automobile, déplacement de petits objets
Modérée	3 à 5,9 MET 55 à 70 % FCmax 40 à 60 % VO2max	Marche de 5 à 6,5 km/h, montée d'escaliers à vitesse lente, nage de loisir, tennis en double, vélo à 15 km/h
Élevée	6 à 8,9 MET 70 à 90 % FCmax 60 à 85 % VO2max	Montée rapide d'escaliers, pompes répétées, course de 8 à 9 km/h, marche à 5 km/h sur une pente à 12 %, vélo à 20 km/h
Très élevée	> 9 MET > 90 % FCmax > 85 % VO2max	Activités sportives intenses, course de 9 à 16 km/h, vélo > 25 km/h

Les mesures de l'activité physique peuvent être réalisées par des méthodes déclaratives ou objectives. Les méthodes déclaratives reposent sur la participation du sujet qui rapporte son activité en temps réel, à l'aide de questionnaires ou d'un journal. Les méthodes objectives peuvent être réalisées suivant différents paramètres :

- L'enregistrement de la fréquence cardiaque (FC) : cette méthode est basée sur l'hypothèse selon laquelle il existe une relation linéaire étroite entre la fréquence cardiaque et la dépense énergétique pour des activités physiques d'intensité croissante. Cependant, il existe des variations en fonction des capacités cardiaques du sujet, de son sexe, de sa condition physique et du type d'activité. La méthode la plus répandue du calcul de la FC max s'effectue selon la formule d'Astrand : $FC_{Max} = 220 - \text{âge}$ (hommes) ; $FC_{max} = 226 - \text{âge}$ (femmes).
- Le podomètre : permet de compter le nombre de pas, de calculer la distance parcourue et la dépense énergétique associée.
- La mesure de la VO₂max (vitesse maximale aérobie) ou consommation maximale d'oxygène représente un indicateur de performance sportive. Sa

mesure directe consiste en un test sur vélo ergométrique ou un tapis de courses où sont comparés, lors d'un effort, les volumes d'air inspiré et expiré. La mesure peut également être réalisée par un relevé du taux de lactates sanguins à chaque palier d'effort.

Du point de vue de l'exercice physique, il en existe deux types : aérobie ou anaérobie. Plus ou moins prolongés et intenses, ils ne mobilisent pas les mêmes ressources en énergie (Zierath and Wallberg-Henriksson, 2015).

Une activité aérobie est d'intensité modérée. Par exemple, c'est le cas d'une course lente. Classé dans la catégorie de l'endurance, l'effort va mobiliser entre 65% et 80% de la fréquence cardiaque maximale (FCmax). Les réserves d'énergie utilisées sont essentiellement graisseuses et représente donc la stratégie à privilégier pour la perte de poids. Une activité anaérobie est plus intense et peut être par exemple de l'ordre d'un sprint. Il constitue un effort en résistance, à 85-90% de la FCmax. Les muscles produiront des déchets dont principalement de l'acide lactique et l'organisme éliminera cette fois des sucres. Cet effort ne peut être maintenu que quelques minutes, tout comme les exercices de musculation. En fonction de chaque individu, une grande hétérogénéité dans la réponse adaptative peut être observée.

Une autre forme d'exercice est l'entraînement intermittent à haute intensité (HIIT) qui consiste en une répétition de périodes d'efforts à haute intensité entrecoupées par des périodes de récupération (Billat, 2001). De nos jours, ce type d'entraînement est largement reconnu pour améliorer les performances physiques ainsi que la VO₂ max.

5.3. Recommandations nationales

D'après le rapport de l'INSERM, en 2019, l'activité physique permet de réduire l'incidence des maladies chroniques comme l'obésité, le diabète et de prévenir de l'apparition de certains cancers. L'activité physique régulière permet de réduire en particulier le risque d'hypertension artérielle et l'apparition d'évènements cardiovasculaires.

En fonction des tranches d'âge, les recommandations diffèrent. Les enfants de 5 à 17 ans doivent pratiquer au moins 60 minutes d'activité physique à intensité modérée à soutenue par jour. Il est également recommandé d'inclure des activités de renforcement musculaire à raison d'au moins trois fois par semaine. Pour les adultes

de 18 à 64 ans, il est recommandé d'effectuer au minimum 150 minutes d'activité d'endurance à intensité modérée ou 75 minutes d'activité d'endurance à intensité soutenue ou une combinaison équivalente d'activité d'intensité modérée et soutenue par semaine. En complément, des activités de renforcement musculaire mettant en jeu les principaux muscles sont à effectuer au moins deux fois par semaine. Ce sont les mêmes recommandations pour les personnes âgées de plus de 65 ans, avec, suivant leur état de santé et la possibilité de la pratique, d'une activité physique adaptée. Il est fortement conseillé pour les personnes à mobilité réduite de pratiquer une activité physique pour améliorer l'équilibre et prévenir les chutes, à raison de trois fois par semaine.

En France, d'après l'étude ESTEBAN 2014-2016 de l'Agence nationale de Santé Publique, seulement 53% des femmes et 70% des hommes atteignaient les recommandations d'activité physique de l'OMS. Plus alarmant encore, un adulte sur cinq présentait un niveau de sédentarité élevé.

5.4. Situation actuelle de l'activité physique en cas d'obésité

Chez les personnes souffrant d'obésité, il a été observé que les recommandations faites par l'OMS ne sont pas respectées. Ces dernières décennies, l'urbanisation et l'automatisation ont contribué à une baisse progressive du niveau d'activité physique associée au travail et aux tâches quotidiennes. De plus, une forte augmentation des activités très sédentaires comme le temps passé devant la télévision, les jeux vidéo ou encore derrière les écrans même au travail contribue à l'augmentation de la sédentarité (Rezende et al., 2014). Il a été montré que le temps passé devant la télévision était fortement associé au gain de poids et à l'obésité, à la fois chez l'enfant (Biddle et al., 2017) et chez l'adulte (Trivedi et al., 2015). D'après l'Observatoire National de l'Activité Physique et de la Sédentarité (ONAPS), en France, le temps passé devant un écran pour les enfants et adolescents de 3 à 17 ans est d'environ 3 heures par jour et pour les adultes d'environ 3 heures et 30 minutes, hors heures de travail. Ces chiffres sont d'autant plus alarmants que cette durée augmente avec l'âge. L'activité physique régulière constitue donc une des modalités importantes de la prise en charge de l'obésité en accord avec des publications récentes (Chin et al., 2016; Lavie et al., 2018; Swift et al., 2018).

5.5. Effet de l'activité physique d'un point de vue clinique

L'accumulation progressive de tissu adipeux au sein de l'organisme peut se faire à différents endroits comme décrit précédemment avec l'apparition d'une obésité gynoïde ou androïde et des risques associés. Cet excès de graisse, notamment au niveau abdominal, est associé à l'apparition de pathologies métaboliques et l'exercice physique a été désigné pour diminuer ce tissu adipeux viscéral (Zhang et al., 2017). Plusieurs méta-analyses ont montré que l'entraînement en endurance diminuait significativement la masse grasse viscérale avec ou sans perte de poids associée (Maillard et al., 2018; Ross et al., 2020; Vissers et al., 2013). De manière intéressante, l'exercice aérobic a été rapporté pour être plus efficace dans la diminution de la masse grasse sous-cutanée abdominale (Yarizadeh et al., 2020). De plus, il existe une relation dose-réponse entre la quantité d'exercice aérobic réalisée et la diminution de graisse viscérale chez les sujets obèses (Ismail et al., 2012; Ohkawara et al., 2007).

L'exercice physique, allant de la marche rapide à l'exercice aérobic, permet une diminution significative du poids corporel à partir de quelques semaines de pratique (Bouchard et al., 2009; Fisher et al., 2015) à plusieurs mois (Donnelly et al., 2009; Heydari et al., 2012; Irving et al., 2008; Sijie et al., 2012; Zhang et al., 2017). En plus de cette perte de poids, l'exercice permet également de réduire la masse grasse viscérale et abdominale de manière importante (Heydari et al., 2012; Hong et al., 2014; Irving et al., 2008; Lee et al., 2012; Zhang et al., 2017).

De plus, dans certaines études, la sensibilité à l'insuline est améliorée par l'exercice physique soit sous forme d'entraînement combinant les exercices aérobic et de résistance (Bell et al., 2007; Lee et al., 2012) soit par la marche et les exercices à intensité modérée ou à haute intensité (Fisher et al., 2015; Hong et al., 2014). Chez les personnes âgées, les exercices de résistance et de flexibilité permettent une amélioration de la fonction et de la fragilité physiques (Villareal et al., 2011) (Tableau 14).

Tableau 14 : Effets de l'activité physique dans des programmes de perte de poids chez la personne obèse.

Auteurs	Année	Sujets	Durée	Type d'exercice	Effets
(Bell et al.)	2007	Enfants obèses	8 semaines	Entraînements par circuit (aérobie et résistance)	Diminution tour de taille Amélioration sensibilité à l'insuline
(Bouchard et al.)	2009	Femmes obèses en postménopause	12 semaines	Exercice aérobie, résistance et flexibilité	Baisse poids et masse grasse quand associé à une restriction calorique
(Donnelly et al.)	2009	Jeunes adultes en surpoids ou obèses	16 mois	Marche sur tapis	Diminution poids corporel
(Fisher et al.)	2015	Hommes obèses	6 semaines	Exercice modéré ou à haute intensité	Baisse poids corporel, meilleure sensibilité à l'insuline
(Heydari et al.)	2012	Hommes en surpoids	12 semaines	Exercice intermittent à haute intensité	Baisse poids corporel et masse grasse viscérale
(Hong et al.)	2012	Femmes obèses	12 semaines	Marche rapide	Baisse masse grasse abdominale et amélioration sensibilité à l'insuline
(Irving et al.)	2008	Femmes obèses	16 semaines	Exercice aérobie ou à haute intensité	Baisse poids corporel et masse grasse sous-cutanée et viscérale
(Lee et al.)	2012	Adolescents obèses	12 semaines	Exercice aérobie et de résistance	Baisse masse grasse abdominale Amélioration sensibilité à l'insuline
(Sijie et al.)	2012	Femmes obèses	12 semaines	Exercice intermittent à haute intensité	Baisse poids corporel et graisse corporelle
(Villareal et al.)	2011	Personnes âgées obèses	1 an	Entraînements aérobie, résistance et flexibilité	Baisse du poids corporel Amélioration fonction et fragilité physique
(Zhang et al.)	2017	Femmes obèses	12 semaines	Entraînements intensité modérée et haute intensité	Baisse du poids corporel et masse grasse viscérale et sous-cutanée

5.6. Effet de l'activité physique dans des modèles expérimentaux

L'effet de l'exercice physique sur l'obésité a aussi été étudié sur des modèles expérimentaux. Afin d'induire le phénotype obèse chez les rongeurs, la plupart des études utilisent un régime riche en sucre et en graisse (HFS) (Lutz, 2018) avant l'introduction des protocoles d'activité physique. L'activité physique peut être mise en place par l'introduction de roues dans les cages ou par des sessions de nage ou tapis de courses. La durée du protocole peut aller de 4 à 20 semaines (Tableau 15).

Tableau 15 : Effets de l'activité physique dans des programmes de perte de poids chez l'animal.

Auteurs	Année	Animaux	Durée	Type d'exercice	Effets
(Fang and Tang)	2017	Souris régime high fat (HFD)	16 semaines	Protocole de nage	Limitation prise de poids Amélioration métabolisme lipidique et sensibilité à l'insuline
(Gehrke et al.)	2019	Souris HFD	4 semaines	Exercice volontaire roues	Baisse poids, Amélioration métabolisme lipidique, baisse stéatose hépatique
(Gollisch et al.)	2009	Rats HFD	4 semaines	Exercice volontaire roues	Baisse poids, masses adipeuses viscérale et sous-cutanée Amélioration sensibilité à l'insuline
(Loustau et al.)	2020	Souris HFD	7 semaines	Exercice volontaire roues	Baisse poids corporel et masse grasse
(Touati et al.)	2015	Rats HFD	12 semaines	Sessions course sur tapis	Augmentation activité moléculaire anti-athérogène, anti-inflammatoire et anti-oxydative : protection fonction vasculaire
(Tsuzuki et al.)	2015	Rats obèses diabétiques	20 semaines	Exercice volontaire roues	Amélioration sensibilité à l'insuline systémique et hépatique Baisse triglycérides hépatiques
(Wu et al.)	2014	Rats HFD	8 semaines	Sessions course sur tapis	Diminution de l'adiposité Augmentation thermogénèse et beigisation
(Yu et al.)	2016	Rats obèses par HFD	8 semaines	Protocole de nage	Limitation de la prise de poids, amélioration métabolisme lipidique et sensibilité à l'insuline
(Zhang et al.)	2019	Rats HFD	8 semaines	Protocole de nage	Baisse poids, masse viscérale, Amélioration sensibilité à l'insuline, Diminution TG hépatiques

La consommation d'un régime HFS dans un modèle murin ou de rat résulte en une prise de poids importante, mais induit aussi des désordres métaboliques importants comme l'inflammation amenant à un état d'insulino-résistance pouvant provoquer une infiltration lipidique majeure au niveau des muscles, du tissu adipeux et du foie. L'exercice physique permet de diminuer significativement cette prise de poids induite par la consommation du régime HFS ainsi qu'une réduction de l'adiposité, en particulier viscérale et sous-cutanée. De plus, l'exercice physique va également permettre d'améliorer certaines fonctions métaboliques. Il permet d'améliorer l'homéostasie du glucose et des lipides avec notamment une augmentation de la glycogénolyse musculaire et hépatique, la lipolyse des triglycérides et l'oxydation des lipides dans le tissu adipeux (Hargreaves and Richter, 1988; Horowitz and Klein, 2000). Il contribue également à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et du transport du glucose à la fois dans le muscle squelettique et dans le tissu adipeux (Stanford et al., 2015).

Il a été rapporté dans des modèles expérimentaux que l'exercice physique était impliqué dans le changement d'activité du tissu adipeux blanc avec la présence d'adipocytes beiges au sein de celui-ci. Ce phénomène est appelé beigisation et est caractérisé par une augmentation d'expression des gènes impliqués dans l'activité et la biogenèse mitochondriales (UCP1, PGC1- β , PPAR- α etc.) (Rocha-Rodrigues et al., 2016; Stanford et al., 2015).

De plus, l'obésité est accompagnée d'une augmentation des taux plasmatiques de leptine et d'une diminution de l'adiponectine induisant la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire. Quand l'exercice physique est ajouté, une baisse de la réponse inflammatoire est observée avec une diminution de la leptine et une augmentation de l'adiponectine (Fang and Tang, 2017; Gollisch et al., 2009; Loustau et al., 2020). Les autres adipokines pro-inflammatoires sécrétées par le tissu adipeux sont également diminuées par l'exercice physique, dont le Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), les interleukines 6, 8 et 10 (Gehrke et al., 2019; Gollisch et al., 2009; Kawanishi et al., 2012; Loustau et al., 2020). L'expression du Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP1), impliqué dans l'infiltration macrophagique, est également réduite (Fang and Tang, 2017; Gehrke et al., 2019; Kawanishi et al., 2012; Loustau et al., 2020).

L'exercice permet de réduire la stéatose hépatique, induite par l'infiltration lipidique au niveau hépatique (Kawanishi et al., 2012) et met en jeu différentes voies de

signalisation comme la voie des kinases c-Jun N-terminal (JNK), des protéines kinases activées par l'AMP (AMPK) et des protéines kinases B (Akt) (Gehrke et al., 2019; Loustau et al., 2020; Tsuzuki et al., 2015; Zhang et al., 2019). La stéatose hépatique est associée à l'activation de la voie JNK, régulant les signaux inflammatoires et participant à l'installation de l'insulino-résistance. Il a été rapporté une suppression de la phosphorylation de JNK associée à une baisse du stress oxydant et de la stéatose hépatique permettant ainsi de diminuer le niveau d'inflammation et la résistance à l'insuline systémique chez des rats diabétiques (Tsuzuki et al., 2015). Aussi, l'exercice permet une augmentation de l'activité de l'AMPK provoquant une baisse de la lipogenèse *de novo* et une augmentation de l'oxydation des acides gras afin de rétablir la balance énergétique. Son activité est dépendante de sa phosphorylation et permet d'évaluer la réponse tissulaire à l'insuline et la sensibilité à l'insuline (Miyamoto, 2018; Viollet, 2017). Dans l'étude de Loustau et son équipe, une augmentation significative de l'activité AMPK a été observée dans le tissu adipeux blanc chez les souris exercées par rapport aux sédentaires (Loustau et al., 2020).

Un médiateur central de l'inflammation hépatique est le Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B). Au cours de l'obésité, cette voie est activée en réponse aux adipokines mais également aux acides gras libres présents en excès et au stress oxydatif. L'équipe de Gehrke a montré une baisse de la phosphorylation de NF- κ B p65 par l'exercice physique. Cette baisse d'activité induit une diminution d'expression des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et de l'infiltration macrophagique dans le foie et participe donc à une baisse de l'inflammation (Gehrke et al., 2019).

De plus, chez les personnes obèses, une inflammation athérogène du mur vasculaire est observée. Le manque d'activité physique induit une augmentation du stress oxydant qui va participer à la dysfonction endothéliale et par la suite à la mise en place de l'athérosclérose (Laufs Ulrich et al., 2005). Cette dysfonction a été caractérisée par une altération de la relaxation endothélium dépendante (Deanfield John E. et al., 2007). Il a été montré que la fonction vasculaire ne dépendait pas seulement des cellules résidant au sein du mur vasculaire mais pouvait être modulée par les cellules circulantes dérivées de la moelle osseuse dont certaines sont impliquées dans l'amélioration de l'angiogenèse, de la reconstruction vasculaire, de la fonction endothéliale et de l'inhibition de l'athérosclérose. L'exercice physique est

connu pour réduire l'inflammation athérogène du mur vasculaire par la stimulation de la différenciation de certaines cellules souches de la moelle osseuse en cellules progénitrices endothéliales (Laufs Ulrich et al., 2004). Un autre mécanisme pouvant être responsable de cette réduction reposerait sur l'augmentation du flux sanguin et des forces de cisaillement dans les vaisseaux (artères, artérioles) qui vont être à l'origine d'une diminution de la sécrétion de molécules d'adhésion participant à l'infiltration des leucocytes (Mills et al., 2006). De plus, il a été démontré que l'exercice physique améliore la relaxation endothélium dépendante chez des souris soumises à un régime riche en sucre et en graisse par la baisse du stress oxydant et de la libération d'adipokines pro-inflammatoires (Fang and Tang, 2017).

5.7. Lien activité physique et vitamine D

Au vu des effets bénéfiques rapportés de l'activité physique et de la vitamine D, quelques études ont permis de mettre en évidence des effets potentialisés quand ces deux interventions sont combinées. Pour citer quelques exemples, une étude américaine regroupant environ 10,500 individus âgés entre 45 et 64 ans s'est intéressée à la relation entre l'activité physique et la 25(OH)D et à leur impact sur l'incidence des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques (Chin et al., 2017). Il a été démontré qu'il existait une relation positive entre l'activité physique et la vitamine D, à savoir que lorsque les recommandations d'activité physique étaient atteintes, les niveaux de 25(OH)D étaient plus élevés. De plus, le risque cardiovasculaire était nettement diminué lorsque les individus étaient exercés et présentaient un bon taux de vitamine D, suggérant ainsi un effet synergique de l'activité physique et de la vitamine D. Une autre étude clinique sur des femmes âgées déficientes en vitamine D et atteintes de NAFLD a rapporté cet effet synergique de l'activité physique et de la vitamine D (Hoseini et al., 2020) sur la réduction de certains facteurs de risques hépatiques dans la NAFLD.

Dans une étude expérimentale portant sur des rattes ovariectomisées, la combinaison de l'exercice physique à une supplémentation en vitamine D a rapporté une amélioration de la dyslipidémie et de la résistance à l'insuline. Ces effets n'étaient pas observés lorsque les rattes recevaient une faible dose de vitamine D, mettant ainsi en lumière l'importance d'un taux suffisant en vitamine D pour observer les effets bénéfiques de l'activité physique sur le métabolisme (Hoseini et al., 2017).

Bien que peu d'études existent et que les mécanismes sous-jacents à cette relation entre vitamine D et exercice physique soient encore mal décrits, cette double stratégie représente un réel potentiel. Il serait donc intéressant d'étudier cette combinaison dans le traitement de l'obésité afin d'observer une potentielle majoration de leurs effets sur le statut inflammatoire, l'insulino-résistance et la stéatose hépatique, qui sont les principales thématiques abordées dans ce travail de thèse.

Objectifs de thèse

Cette revue de la littérature nous a permis de montrer que l'obésité était associée à de nombreux désordres métaboliques et que l'inflammation de bas-gras présente chez les individus obèses pouvait entraîner des répercussions néfastes sur différents organes. Nous avons vu que l'expansion du tissu adipeux peut provoquer des modifications de la libération d'adipokines et ainsi modifier l'homéostasie glucidique, lipidique et entraîner également l'expansion des dépôts de tissus adipeux dans des sites ectopiques. Une communication inter-organes contribue de ce fait, défavorablement à la survenue de complications et d'événements cardiovasculaires.

Les travaux réalisés au sein du laboratoire ont permis dans un premier temps de mettre en évidence des effets bénéfiques de la vitamine D en prévention primaire sur la prise de poids avec des effets anti-inflammatoires marqués. De plus, il a été montré que l'exercice physique volontaire avait un rôle important dans le contrôle de l'expansion du tissu adipeux avec une modification de la balance angiogénique aussi appelé phénomène « d'angio-adaptation ». Dans ce contexte, il était donc intéressant de voir si une double stratégie d'intervention couplant la supplémentation en vitamine D à de l'exercice physique volontaire allait avoir des effets potentiels dans le traitement de l'obésité et des comorbidités associées.

Avant d'initier les différents protocoles, il a fallu dans un premier temps valider notre modèle d'obésité induite par l'alimentation chez les souris c57/bl6. La validation a été réalisée en caractérisant les différents paramètres anthropométriques, biologiques, moléculaires et fonctionnels. Une fois validé, notre premier objectif était d'étudier les effets d'une supplémentation en vitamine D en prévention tertiaire de l'obésité sur ce modèle de souris c57/bl6, à travers la mise en oeuvre d'un protocole au long terme sur la biologie du tissu adipeux ainsi que son statut inflammatoire mais également sur l'infiltration lipidique retrouvée au niveau hépatique (**article 1**). Notre première hypothèse de recherche était que la supplémentation en vitamine D pourrait diminuer l'accumulation lipidiques tant dans les dépôts adipeux que dans les dépôts ectopiques et exercer des effets anti-inflammatoires sur le tissu adipeux.

Enfin le deuxième objectif était d'étudier les effets de la supplémentation en vitamine D couplée à l'exercice physique volontaire dans cette approche de prévention tertiaire de l'obésité sur ce modèle de souris c57/bl6 obèses. Cette étude avait pour but d'évaluer les changements morphométriques, physiologiques et biologiques ainsi que les différences de profil inflammatoire au sein du tissu adipeux,

ainsi que la prévention de l'apparition de la stéatose hépatique (**article 2**). Notre deuxième hypothèse était que la double intervention combinant l'exercice physique et la supplémentation en vitamine D pourrait majorer les effets de chacune des interventions prises isolément sur la limitation de la prise de poids, les paramètres métaboliques, l'inflammation et l'accumulation de dépôts ectopiques.

Matériels et Méthodes

Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées conformément aux Directives Parlementaires Européennes 2013/63/EU (N°CEEA-00322.03) et ont été approuvées par le comité d'évaluation local pour l'expérimentation animale (2017110611453051-RIVA).

1. Expérimentation animale

Le modèle expérimental choisi pour la réalisation des études a été la souris c57bl/6j. C'est un modèle couramment utilisé en laboratoire susceptible de développer à la fois le diabète et l'obésité par des interventions nutritionnelles (Loustau et al., 2020; Petro et al., 2000; Shafrir and Ziv, 2009).

Les expérimentations ont été réalisées sur des souris c57bl/6j âgées de 8 semaines (n=110) et ont été hébergées en animalerie dans des conditions contrôlées avec un cycle de 12 heures lumière-obscurité, avec une humidité avoisinant les 60% ainsi qu'une température d'environ 21 °C. Les souris ont eu un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Les souris ont été acclimatées 2 semaines afin de débiter les protocoles à l'âge de 10 semaines. Le protocole d'étude est résumé sur le schéma présenté ci-dessous (Figure 19) :

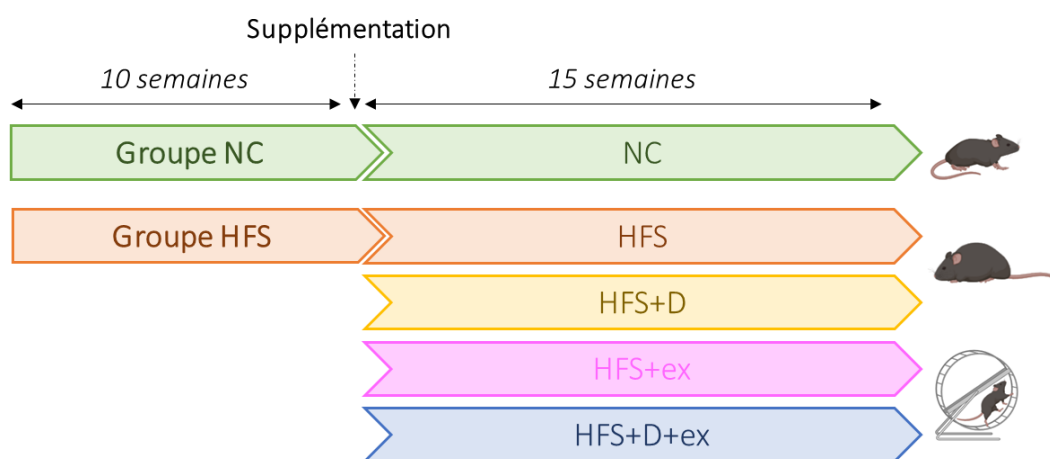


Figure 19 : Schéma expérimental. Groupe NC (Normal Chow) : n=20 ; groupe HFS (High fat high sucrose) : n=30 ; groupe HFS+D (HFS supplémenté en vitamine D) : n=30 ; HFS+ex (HFS + exercice) : n=15 ; HFS+D+ex (HFS supplémenté en vitamine D + exercice) : n=15.

Dans un premier temps, les souris ont été réparties aléatoirement en deux groupes de régime :

- Le groupe « normal chow » (NC) correspondant au régime standard (croquettes A04 (SAFE Diets, Augy, France) et de l'eau.
- Le groupe « High Fat high Sucrose » (HFS) correspondant au régime hypercalorique riche en graisse et en sucre (pâte HF230 (SAFE Diets, Augy France) et de 10% de saccharose contenu dans l'eau de boisson) (Figure 20).

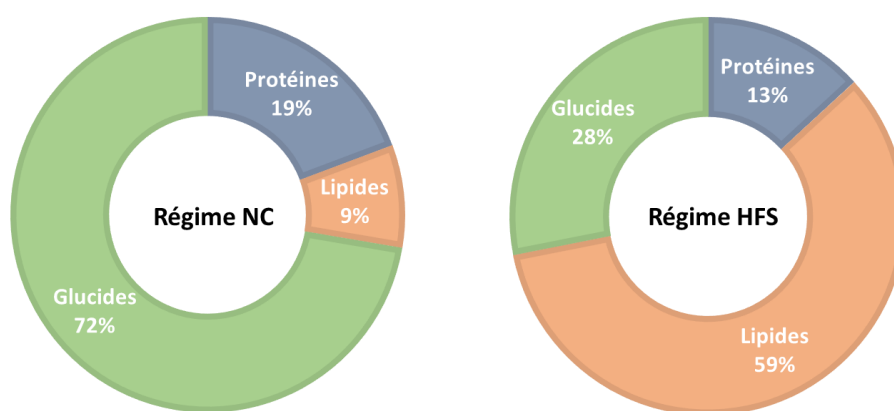


Figure 20 : Composition des différents régimes. NC : Normal Chow ; HFS : High Fat high Sucrose diet.

Ce régime obésogène a été appliqué durant 10 semaines afin d'induire un phénotype obèse chez les souris c57bl/6j. S'en est suivie, une randomisation des souris HFS dans différents groupes où la supplémentation en vitamine D et l'exercice physique vont être ajoutés à la nourriture HFS :

- Le groupe HFS supplémenté en vitamine D₃ (HFS+D) correspondant au régime HFS enrichie en VD à 15 000 UI/kg (SAFE Diets, Augy, France).
- Le groupe HFS+ex correspondant au régime HFS couplé à de l'exercice physique volontaire, où une roue a été installée dans la cage.
- Le groupe HFS+D+ex correspondant au régime HFS+D couplé à l'exercice physique volontaire.

2. Mesures longitudinales

Des mesures longitudinales de suivi des paramètres d'apport et de dépense énergétique ainsi que des paramètres morphologiques ont été réalisées tout au long du protocole.

2.1. Suivi des apports alimentaires

L'apport alimentaire, que ce soit de la nourriture ou de la consommation de boisson, a été évalué à chaque renouvellement dans les cages, à raison de 3 fois par semaine. Grâce aux mesures de la prise alimentaire, le contrôle de la supplémentation en vitamine D a pu être réalisé. Les résultats sont présentés en Annexe.

2.2. Mesure des distances parcourues

Les roues placées dans les cages des souris étaient munies d'un capteur, connectées à des compteurs permettant le relevé du nombre de tours effectués permettant d'évaluer quotidiennement la distance parcourue par les souris.

2.3. Suivi morphologique

Les animaux ont été pesés de manière hebdomadaire à partir du début du protocole (T0), à l'âge de 10 semaines et ce jusqu'à la fin du protocole (T25), à l'âge de 35 semaines afin d'avoir une évolution de leur masse corporelle au cours du protocole.

Les mesures du suivi de l'homéostasie glucidique et de la vitesse maximale aérobie ont été réalisées : avant la mise en place du régime obésogène (T0), avant la mise en place des supplémentations (T10), au milieu des supplémentations (T17) et à la fin du protocole (T24).

2.4. Suivi de l'homéostasie glucidique

Le suivi de l'homéostasie glucidique a été réalisé par le test de tolérance à l'insuline sur des souris mises à jeun 6 heures avant le début des mesures. Par une incision en bout de queue des animaux, les prélèvements sanguins ont pu être réalisés afin d'obtenir la glycémie avec le lecteur à bandelettes (CareSens N™, Dinno Santé,

Bussy Saint-Georges, France). Une fois la glycémie à jeun relevée, une injection intrapéritonéale d'insuline à 1 UI.kg^{-1} a été réalisée et de nouvelles mesures de glycémie ont été relevées à 10, 30, 60, 90 et 120 minutes post-injection.

Des mesures plasmatiques de glucose et d'insuline ont également été réalisées sur les échantillons de plasma recueillis après le sacrifice des animaux, à l'aide d'un test colorimétrique et d'un dosage immuno-enzymatique.

2.5. Mesure de la vitesse maximale aérobie

La vitesse maximale aérobie (VMA) a été réalisée sur des tapis de courses où les souris ont eu un échauffement de 6 minutes à une vitesse de 7 m.min^{-1} puis de niveaux croissants de 4 m.min^{-1} toutes les 1'30 minutes. La VMA est atteinte lorsque les souris n'étaient plus capables de suivre la vitesse du tapis. Le palier précédent est alors considéré comme maximal.

3. Sacrifice des animaux

A la fin des 25 semaines de protocole, les souris ont été mises à jeun d'environ 12 heures puis anesthésiées par inhalation d'un mélange à 4% d'isoflurane (IsoFlo™, Zoetis, Parsippany, Etats-Unis) afin de réaliser un prélèvement sanguin par ponction intracardiaque sur seringue héparinée (S-Monovette®, Sarsted, Nümbrecht, Allemagne). Après centrifugation, le plasma a été aliquoté et congelé à -80°C avant analyse.

Les souris ont ensuite été mises à mort par dislocation cervicale et les différents organes, cœur, foie, et rein ont été prélevés et pesés. L'ensemble des tissus adipeux épидидymal, sous-cutané, inguinal, périrénal et brun ont été prélevés et pesés. Les muscles soléaire et gastrocnémien ont également été prélevés. En guise d'indicateur, la rate a été prélevée et pesée afin d'évaluer le statut inflammatoire des souris. Si celui-ci est trop élevé, la souris est exclue.

Ces différents tissus ont été soit fixés dans la formaline puis rincés dans du tampon phosphate alcalin et conservés dans l'éthanol à 70% à $+4^\circ\text{C}$ pour analyse histologique soit congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C pour analyse biochimique et moléculaire.

4. Mesure des concentrations plasmatiques de vitamine D₃

Les échantillons de plasma ont été utilisés afin de mesurer les concentrations plasmatiques de cholécalférol et de vitamine D totale et de confirmer l'effet de la supplémentation en vitamine D₃. Ceci a été réalisé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) (Bonnet et al., 2019b).

5. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à partir de tissus congelés. Le tissu a tout d'abord été homogénéisé à l'aide d'un robot à billes (Retsch GmbH, Haan, Allemagne) dans 1 mL de TRI Reagent (Invitrogen) permettant la lyse des cellules tout en préservant l'intégrité des molécules d'ADN et d'ARN. Les échantillons ont ensuite été mélangés à 200 µL de chloroforme afin de solubiliser les lipides et centrifugés pendant 15 minutes à 1500g et à +4 °C. La solution triphasée obtenue a permis de différencier la phase organique (ADN, protéines) de la phase aqueuse contenant l'ARN délimitée par une interface. La phase supérieure a été transférée dans un nouveau tube en présence de 500 µL d'isopropanol afin de précipiter les ARN. Ce mélange a été incubé 30 minutes à -20 °C et ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 12000g et à +4 °C. Le surnageant obtenu a été éliminé puis le culot d'ARN est lavé deux fois avec 1 mL d'éthanol à 80% et centrifugés pendant 5 minutes à 7500g à +4 °C. Après évaporation complète, les culots ont été séchés avant d'être repris dans de l'eau RNase free. La quantité et la pureté des ARN extraits ont été mesurées par spectrophotométrie (BioDrop µLITE, Isogen Life Science, Utrecht, Pays-Bas).

6. Transcription inverse

La transcription inverse a été réalisée à partir d'1µg d'ARN totaux et dans un volume final ajusté en fonction des concentrations en ARN précédemment dosées. Les ARN ont été incubés avec un mix réactionnel préparé à partir du kit M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Invitrogen) et comprenant 4 µL de tampon 5X, 2 µL de dithiothréitol (0,1 M), 2 µL de dNTP (5 mM), 1 µL d'hexamères (0,3 µg/µL) et 1 µL de M-MLV RT (200 U/µL). La synthèse a été réalisée à 37 °C pendant 60 min puis les ADNc obtenus sont dilués dans l'eau bidistillée à 2,5 ng/mL et conservés à -20 °C jusqu'à utilisation.

7. PCR quantitative en temps réel

L'amplification des gènes d'intérêt a été réalisée avec 4 µL de la solution d'ADNc préalablement préparée dans un volume final de 10 µL contenant 5 µL de SYBR Green (Eurogentec, Liège, Belgique), 0,5 µL de chacun des deux amorces sens et antisens à 10 pmol/ µL. La réaction a été effectuée par le système AriaMx (Agilent Technologies, Santa Clara, Etats-Unis) et a débuté après 2 minutes à 50 °C puis 10 minutes à 95 °C. L'amplification a été effectuée en 40 cycles comprenant une étape de dénaturation de 15 secondes à 95 °C et une étape d'hybridation des amorces d'une minute à 60 °C. A chaque fin de cycle, la fluorescence a été mesurée et les résultats ont été exprimés par rapport à l'ARN ribosomal 18S, ayant une expression ubiquitaire quel que soient les conditions expérimentales.

8. Réalisation et coloration des coupes histologiques

Les échantillons préalablement fixés et conservés ont été déshydratés avant l'enrobage à la paraffine. Une fois les échantillons inclus, des coupes de 5 à 8µm des différents tissus (foie, tissus adipeux), ont été réalisées puis fixées sur lame/lamelle afin de procéder ensuite à l'étape de coloration. Les lames ont été plongées dans du xylène puis progressivement dans de l'éthanol 100% à 70%, s'en suivaient des bains d'eau distillée puis la coloration dans l'hématoxyline à 0,1%. Après rinçage à l'eau distillée, la coloration à l'éosine a été réalisée puis rincée. Ensuite, des bains successifs d'éthanol allant de 70% à 100% ont été réalisés. Une fois l'étape de séchage à température respectée, les lames ont été analysées au microscope Zeiss à l'objectif x10 et x40 et 15 à 20 images ont été prises sur chaque lame afin d'être finalement analysées sur le logiciel image J (Image J Software, NIH, USA).

9. Analyses statistiques

Dans cette étude, toutes les données ont été exprimées en moyenne \pm erreur standard à la moyenne (SEM). L'ensemble des données statistiques a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). La signification statistique a été déterminée par une analyse de variance (ANOVA) suivie d'une analyse post-ANOVA PLSD Fisher pour analyser les différences intergroupes. Concernant les différences entre deux groupes, l'évaluation statistique a été réalisée par le test t de Student.

Pour l'ensemble des analyses, une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

Résultats

1. Article n°1 :

Vitamin D supplementation improves adipose tissue inflammation and reduces hepatic steatosis on obese c57bl/6J mice

Marziou A, Philouze C, Couturier C, Astier J, Obert P, Landrier JF*, Riva C*.

Nutrients. 2020 Jan 28;12(2):342. doi: 10.3390/nu12020342.

1.1. But de l'étude

A ce jour, le rôle de la vitamine D dans les études interventionnelles du traitement de l'obésité ne semble pas clairement établi. Des études précliniques expérimentant la supplémentation en vitamine D en prévention primaire ont en revanche rapporté de nombreux effets bénéfiques avec notamment une limitation de la prise de poids et une restauration de l'homéostasie glucidique sur un modèle murin soumis à un régime riche en graisse et en sucre. Une supplémentation en vitamine D induit une amélioration du statut inflammatoire du tissu adipeux par la limitation d'expression de chimiokines et cytokines ainsi qu'une diminution de l'infiltration leucocytaire. De plus, il a été récemment démontré que la supplémentation en vitamine D a des effets protecteurs sur la stéatose hépatique. Ses effets en prévention tertiaire restent néanmoins très peu documentés. Notre objectif était donc d'étudier sur une longue durée les effets de la supplémentation en vitamine D en prévention tertiaire de l'obésité sur un modèle de souris obèse induit par la consommation d'un régime obésogène.

Préalablement rendues obèses grâce à un régime riche en graisse et en sucre durant 10 semaines, les souris ont été supplémentées en vitamine D durant 15 semaines. Nos objectifs principaux étaient d'évaluer 1/ les effets de cette supplémentation sur les paramètres morphologiques et la répartition des différents tissus adipeux, 2/ la sensibilité à l'insuline par un test de tolérance à l'insuline ainsi que des dosages plasmatiques ; de caractériser 3/ le tissu adipeux à l'échelle histologique et génique par l'analyse de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation et 4/ l'infiltration lipidique au niveau hépatique ainsi que le profil métabolique sur le plan génique.

1.2. Principaux résultats

Les 10 semaines de régime riche en graisse et en sucre ont conduit au développement de l'obésité dans un modèle de souris c57/bl6. Cette obésité est caractérisée par une augmentation de l'adiposité, une hypertrophie adipocytaire, une accumulation de lipides ectopiques au niveau hépatique ainsi qu'à la mise en place d'une résistance à l'insuline et de l'inflammation.

La supplémentation en vitamine D associée au régime riche en graisse et en sucre, durant 15 semaines, n'a pas permis de limiter la prise de masse, l'adiposité et de corriger l'insulino-résistance. Toutefois, même si la masse adipeuse reste inchangée et l'hypertrophie adipocytaire conservée, la vitamine D diminue significativement l'inflammation du tissu adipeux par la limitation d'expression des chimiokines. En outre, l'infiltration lipidique au niveau hépatique, retrouvée après les 10 semaines de régime obésogène, est diminuée par la supplémentation de 15 semaines en vitamine D. Celle-ci s'accompagne d'une baisse d'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse hépatique.

D'après nos résultats, 15 semaines de supplémentation ne semblent pas suffisantes pour induire une perte de poids chez les souris obèses. En revanche, la vitamine D permet d'améliorer le statut inflammatoire et joue un rôle considérable dans la réduction de la stéatose hépatique. Etant donné l'importance de la perte de poids dans l'amélioration du statut métabolique, il semblerait judicieux de coupler cette supplémentation en vitamine D à des programmes d'exercice physique.

1.3. Article



Vitamin D Supplementation Improves Adipose Tissue Inflammation and Reduces Hepatic Steatosis in Obese C57BL/6J Mice

Alexandra Marziou^{1,2}, Clothilde Philouze¹, Charlène Couturier², Julien Astier²,
Philippe Obert¹, Jean-François Landrier^{2*,†} and Catherine Riva^{2*,†}

¹ Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire (LAPEC), EA-4278, Avignon University, 84029 Avignon, France; alexandra.marziou@gmail.com (A.M.); clothilde.philouze@gmail.com (C.P.); philippe.obert@univ-avignon.fr (P.O.)

² Aix-Marseille Université, INSERM, INRAE, C2VN, 13000 Marseille, France; charlene.couturier@univ-amu.fr (C.C.); julien.astier@univ-amu.fr (J.A.)

* Correspondence: jean-francois.landrier@univ-amu.fr (J.-F.L.); catherine.riva@univ-avignon.fr (C.R.); Tel: +33-4-9132-4275 (J.-F.L.); +33-4-9016-2933 (C.R.)

† These authors shared author co-seniorship.

Received: 15 January 2020; Accepted: 27 January 2020; Published: 28 January 2020

Abstract: The beneficial effect of vitamin D (VD) supplementation on body weight gain limitation and inflammation has been highlighted in primary prevention mice models, but the long-term effect of VD supplementation in tertiary prevention has never been reported in obesity models. The curative effect of VD supplementation on obesity and associated disorders was evaluated in highfat- and high-sucrose (HFS)-fed mice. Morphological, histological, and molecular phenotype were characterized. The increased body mass and adiposity caused by HFS diet as well as fat cell hypertrophy and glucose homeostasis were not improved by VD supplementation. However, VD supplementation led to a decrease of HFS-induced inflammation in inguinal adipose tissue, characterized by a decreased expression of chemokine mRNA levels. Moreover, a protective effect of VD on HFS-induced hepatic steatosis was highlighted by a decrease of lipid droplets and a reduction of triglyceride accumulation in the liver. This result was associated with a significant decrease of gene expression coding for key enzymes involved in hepatic de novo lipogenesis and fatty acid oxidation. Altogether, our results show that VD supplementation could be of interest to blunt the adipose tissue inflammation and hepatic steatosis and could represent an interesting nutritional strategy to fight obesity-associated comorbidities.

Keywords: vitamin D; inflammation; obesity; adipose tissue; steatosis; tertiary prevention

1. Introduction

Obesity is a worldwide health issue. It increases cardiovascular morbidity and impairs quality of life and consequently represents one of the leading causes of mortality. Obesity, defined by an excessive fat accumulation in adipocytes, results from an imbalance between energy intake and energy expenditure. It is caused by changes in food consumption behaviors and lifestyle [1,2]. Nowadays, according to the World Health Organization (WHO), over 1.9 billion adults are overweight and among them 650 million are obese [3]. This pathology is strongly related to metabolic disorders such as arterial hypertension, chronic low-grade inflammation, and insulin resistance that could lead to type 2 diabetes [4,5]. Obesity is also strongly linked to ectopic fat accumulation, particularly in the liver, contributing to an emergence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [6].

Interestingly, from an epidemiologic standpoint obesity and NAFLD are commonly associated with low 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) plasma levels. Indeed, in prospective studies, low 25(OH)D plasma levels were associated with higher incidence of obesity in adults, children, and elderly women, it was also correlated to a higher five-year waist circumference [7]. Several cross-sectional studies have reported an inverse relationship between plasma concentrations of 25(OH)D and body mass index (BMI) [8–10]. However, the causality between these two parameters remains unclear [11,12]. Moreover, recent epidemiological data have also enabled the linkage of hypovitaminosis D with both obesity and NAFLD [13].

As of today, intervention studies have remained ambiguous, because some of them reported a beneficial effect on body weight management [14,15] and other studies observed no effect [16,17]. Nevertheless, preclinical studies on VD supplementation have demonstrated benefits for weight management in primary prevention in mice fed with a high-fat diet [18,19]. This was associated with the improvement of the inflammatory status in adipose tissue, characterized by a limitation of cytokines and chemokine expression by adipocytes [20], leukocyte infiltration in adipose tissue [21], and a reduction of the expression of pro-inflammatory miRNA in adipocytes and adipose tissue [22].

Nevertheless, the impact of VD supplementation on body weight reduction and associated pathologies remains poorly documented in obese mice models. A recent study reports that the body weight of obese mice was not affected by VD supplementation [23]. It is important to consider that the supplement was administered over a short period of time. The aim of this study is to evaluate the consequences of administering VD to obese mice over a longer period.

2. Materials and Methods

2.1. Animal, Diets, and Experiments

Six-week-old male C57BL/6J mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). They were kept in cages with an enriched environment maintaining controlled environmental conditions (20–23 °C; 40% humidity), and a 12-hour light/dark cycle. The mice were fed water and food ad libitum. All procedures were performed in accordance with the local research ethics committee (2017110611453051-RIVA) and the agreement of European and French Ministry of Agriculture about the care and use of laboratory animals 2010/63/EU (N°CEEA—00322.03). Mice (10-week-old age and weighing 41.55 ± 0.64 g) were randomly placed into two groups: a normal chow group (NC; $n = 20$) or a high-fat/high-sucrose diet group (HFS; $n = 60$). The NC group was fed a normal chow diet (A04, 3.1% fat, caloric value $3.339 \text{ kcal}\cdot\text{kg}^{-1}$, Safe, France) and water during the entire protocol of 25 weeks. The HFS group was fed a fat-enriched-dough (230HF, 60% kcal from fat with a caloric value of $5.317 \text{ kcal}\cdot\text{kg}^{-1}$, Safe, France) completed with drinking water containing 10% sucrose (D-Saccharose, Fisher Scientific, England) over a 10-week period to induce obesity and type 2 diabetes. After this 10-week period, the HFS group was divided in two subgroups. They were either fed with the same HFS diet or with an HFS diet supplemented with vitamin D (HFS + D; $15,000 \text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}$ cholecalciferol; customized HF230, SAFE Diet, Augy, France) over an additional 15-week period. During the experiment, body weight was measured once a week and dietary intake was assessed daily. Energy intake was calculated per cage from the amount of food and drink consumed by the animals and its caloric equivalence. At the end of the protocol, mice were fasted overnight. Animals were anesthetized, before the intracardiac puncture blood collection. The plasma was obtained by centrifuging at $3000\times g$ for 15 min at 4 °C, it was then stored at -80 °C. The animals, still under anesthesia, were then sacrificed by cervical dislocation. Liver and adipose deposits (epididymal, subcutaneous, perirenal, inguinal) were entirely collected, weighed, and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

2.2. Insulin Tolerance Test

Seven weeks and 12 weeks after starting VD supplementation, mice were subjected to an insulin tolerance test (ITT), after they had been fasted for 6 hours. Blood was collected (5 μL) using the tailclip method and fasting glycemia was measured using a commercially available glucometer (AccuCheck glucometer, Roche, Basel, Switzerland), in accordance with the manufacturer's instructions. ITT were then performed after an intraperitoneal injection of insulin solution ($1 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$), and blood glucose levels were measured from tail blood taken at the indicated times after injection: 10, 30, 60, 90, 120 minutes after the injection.

2.3. Biochemical Analysis

Plasma glucose and calcium (Ca²⁺) were analyzed using colorimetric methods (BIOLABO, Maizy, France) as non-esterified fatty acids (NEFA) (RANDOX, Crumlin, Co., Antrim, United Kingdom). Plasma insulin was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay ELISA (ALPCO Diagnostics, New Hampshire, USA) and adiponectin was quantified using the ELISA kit (R&D Development, Minneapolis, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Triglycerides (TG) were quantified both in plasma samples and in the liver using colorimetric methods (BIOLABO, Maizy, France). The Homeostasis Model Assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index was calculated according to the following formula: fasting insulin (microU·L⁻¹) × fasting glucose (mmol·L⁻¹)/22.5 [24].

2.4. 25(OH)D Quantification in Plasma

All quantifications were performed using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (Hypersil Gold® C18 column, Orbitrap™ Q Exactive™ Plus system and Xcalibur™ software, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) according to the protocol previously mentioned [25].

2.5. Histological Analysis

Paraffin-embedded tissue sections of liver and inguinal adipose tissue (iWAT) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) using standard protocols [26]. The images were captured by a light microscope (Zeiss Axio Imager, Oberkochen, Germany) and the adipocyte area (µm²) was determined using (Image J) software as previously described [24].

2.6. RNA Isolation and qPCR

Total RNA from liver and iWAT were extracted using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher, Courtaboeuf, France). One microgram of total RNA was used to synthesize cDNA in 20 µL using random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Thermo Fisher, Courtaboeuf, France). Real-time quantitative RT-PCR analyses were performed using the AriaMx System (Agilent, Santa Clara, USA) as previously described [27]. All PCR reactions were using a SYBR Green Master mix (PowerUp™ SYBR®, Thermo Fisher, Courtaboeuf, France). For each condition, expression was quantified in duplicate, and 18S rRNA was used as the endogenous control in the comparative cycle threshold (CT) method [28]. Data were expressed as a relative expression ratio. Primers sequences are presented in Supplementary Table S1.

2.7. Statistical Analysis

Data were expressed as the mean ± SEM. Significant differences between control and treated groups were determined using ANOVA, followed by the PLSD Fischer post hoc test using Prism6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Impact of High-Fat/High-Sucrose Diet and Vitamin D Supplementation on Morphological Parameters

After 10 weeks of high-fat/high-sucrose (HFS) diet, body weight of HFS mice was considerably increased compared with that of the NC group (Figure 1A). In fact, energy intake was higher in the HFS group compared with that in the control group (Figure 1B). In regard to body composition, HFS consumption significantly increased adipose tissues (peri-renal, epididymal, inguinal, and subcutaneous) absolute (Figure 1D) and relative masses (Supplementary Figure S1). The adiposity index calculated by the sum of all adipose tissues relative to total body mass was increased by a factor 2 in the HFS group compared with that in the NC group. To evaluate the metabolic impact of VD supplementation, half of the mice were fed with HFS diet supplemented with VD (15,000 UI·kg⁻¹ of food) (HFS + D), during an additional 15-week period. The other HFS-fed mice remained on the HFS diet. Mice that were on the HFS diet continued to gain body weight compared with those in the NC group. At the end of the 25-week protocol, the body weight as well as the adiposity index of mice supplemented with VD was not different from that of HFS-fed mice as shown in

Figure 1C,F. These results were consistent with the higher energy intake in the HFS or HFS + D groups compared with that in the NC group, and there was no difference between HFS and HFS + D groups (Figure 1B).

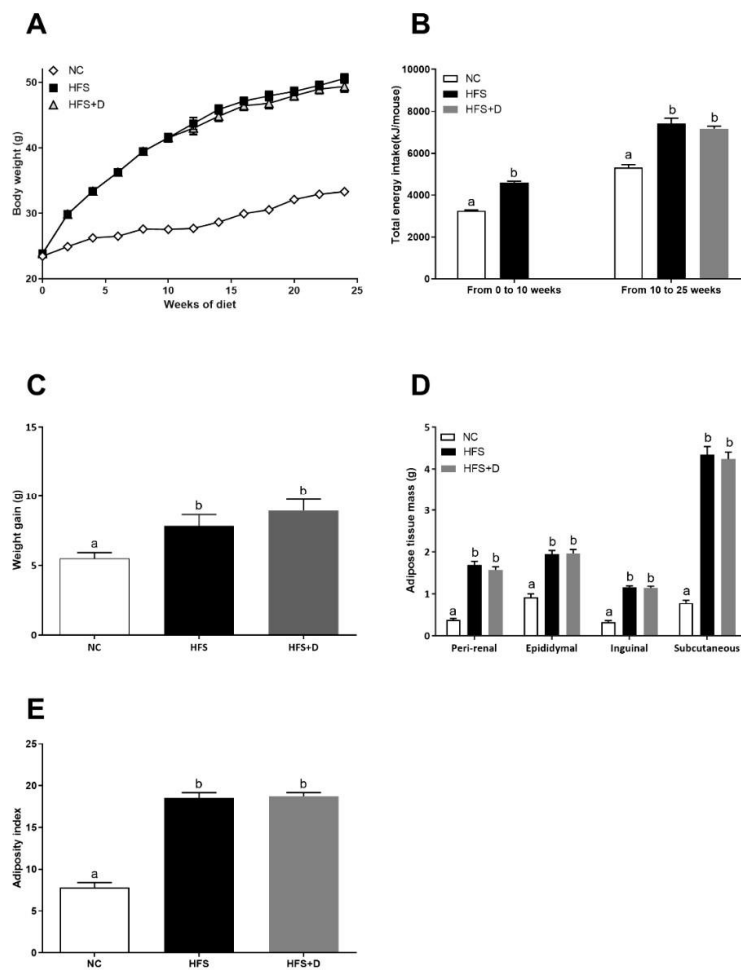


Figure 1. Morphological parameters of mice fed with high-fat/high-sucrose diet and vitamin D supplementation. (A) Body weight evolution curve of mice fed with a controlled diet (NC), highfat/high-sucrose diet (HFS) during the first 10 weeks and then supplemented with vitamin D over a 15-week period (HFS + D). (B) The energy intake was quantified by measuring food intake and sucrose water every day for a period of 25 weeks following respective diet consumption. (C) Animal weight gain was established; it corresponds to the difference between the body weight at end of the protocol (25th week) and the body weight at the end of the 10-week HFS diet. (D) During the sacrifice, adipose tissues were weighed, and body composition was expressed in terms of adipose tissues' absolute mass. (E) An adiposity index was calculated by calculating the ratio between the sum of perirenal, epididymal, inguinal, and subcutaneous adipose masses and body weight; values are presented as means \pm SEM; values not sharing the same letter were significantly different, $p < 0.05$.

3.2. Impact of High-Fat/High-Sucrose Diet and Vitamin D Supplementation on Glucose Homeostasis

Then, we evaluated the effect of VD supplementation on glucose homeostasis. At the beginning of VD supplementation, insulin resistance of mice was confirmed by ITT (Supplementary Figure S2). As expected, the HFS diet reduced insulin sensitivity (Figure 2A–D), increased glycaemia, insulinemia (Figure 2E), and HOMA-IR (Figure 2F). After 7 and 15 weeks of VD supplementation, no difference was observed in either the HFS or the HFS + D groups in terms of glycemic response. Quantification of plasma glucose and insulin at the end of the 25-week protocol (Figure 2E, Table 1) confirmed the fasting hyperglycemia and increased plasma insulin concentrations in both HFS and HFS + D groups compared with those in the NC group (Figure 2E) and HOMA-IR increased, in both HFS and HFS + D groups compared with that in the NC group (Figure 2F).

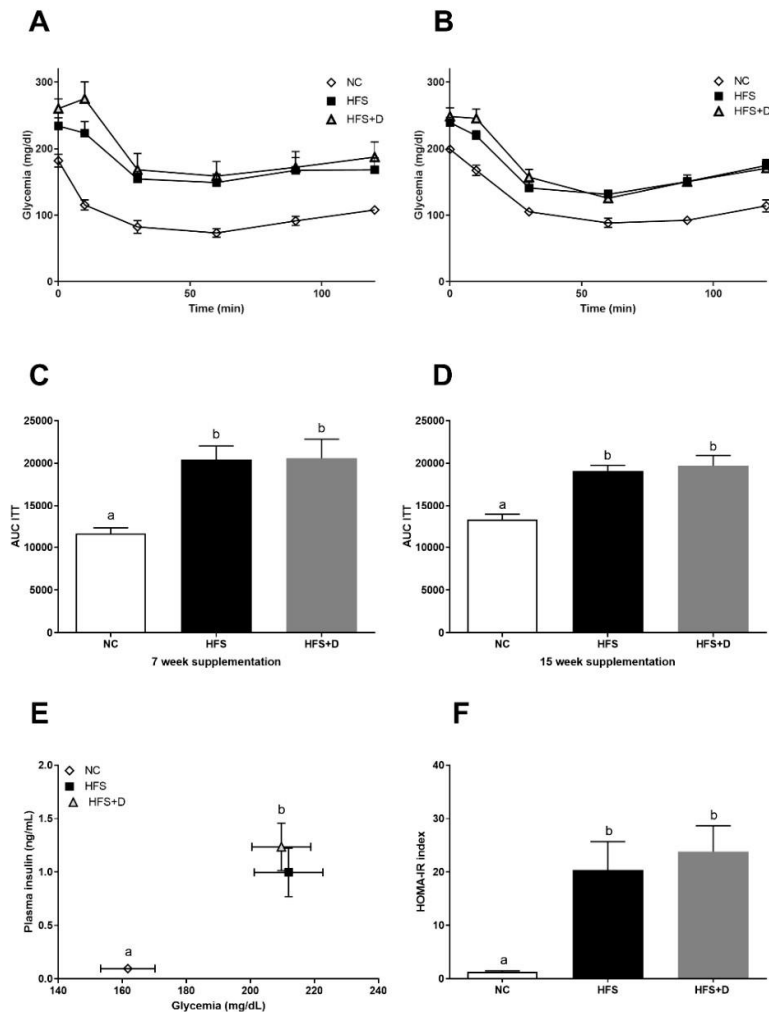


Figure 2. Effects of vitamin D (VD) supplementation on glucose homeostasis. (A) Glycemic response to insulin injection after 7 weeks of VD supplementation. (B) Glycemic response to insulin injection after 15 weeks of VD supplementation. (C) Area under the curve (AUC) calculated from the glycemic response curve after 7 weeks of VD supplementation. (D) AUC calculated from the glycemic response curve after 15 weeks of VD supplementation. (E) Quantification of plasma glucose and insulin at the end of the 25-week protocol. (F) HOMA-IR was calculated according to the following formula: (fasting insulin ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) \times fasting glucose ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)/22.5); insulin sensitivity was measured by ITT; values are presented as mean \pm SEM; values not sharing the same letter were significantly different, $p < 0.05$.

3.3. Impact of High-Fat/High-Sucrose Diet and Vitamin D Supplementation on Plasma Parameters

After 25 weeks, no modification of the triglyceride (TG) concentration was observed in the three groups (Table 1). The NEFA concentration was decreased in both HFS and HFS + D groups compared with that in the NC group. Adiponectin concentration had a predictable decrease in HFS-fed mice compared with that in NC-fed mice whereas unexpectedly HFS-fed mice supplemented with VD had a lower adiponectin level than both NC and HFS-fed mice. As expected, 15 weeks of VD supplementation significantly increased cholecalciferol and 25(OH)D plasma levels compared with the HFS and NC groups. Moreover, there was a slight increase of calcemia in HFS- and HFS + D-fed mice compared with that in the NC group.

Table 1. Effect of vitamin D on mice biological parameters.

Biological Parameters	NC	HFS	HFS + D
Triglycerides (mmol·L ⁻¹)	1.01 ± 0.05 ^a	1.02 ± 0.06 ^a	1.02 ± 0.08 ^a
Non-esterified fatty acid (mmol·L ⁻¹)	0.96 ± 0.05 ^a	0.70 ± 0.04 ^b	0.66 ± 0.04 ^b
Adiponectin (µg·mL ⁻¹)	6.44 ± 0.47 ^a	5.15 ± 0.28 ^b	1.54 ± 0.22 ^c
Calcium (mmol·L ⁻¹)	2.32 ± 0.07 ^a	2.49 ± 0.02 ^b	2.59 ± 0.07 ^b
Glucose (mmol·L ⁻¹)	8.98 ± 0.47 ^a	11.76 ± 0.60 ^b	11.64 ± 0.51 ^b
Insulin (mmol·L ⁻¹)	0.01 ± 0.01 ^a	1.00 ± 0.23 ^b	1.24 ± 0.22 ^b
Vitamin D ₃ (ng·mL ⁻¹)	0.71 ± 0.20 ^a	4.52 ± 0.81 ^a	77.64 ± 5.86 ^b
25(OH)D ₃ (ng·mL ⁻¹)	117.10 ± 3.43 ^a	154.10 ± 5.00 ^b	240.20 ± 12.56 ^c

NC: normal chow, HFS: high-fat/high-sucrose diet, HFS + D: high fat/high sucrose diet supplemented with vitamin D. Values are presented as mean ± SEM. Values not sharing the same letter were significantly different, $p < 0.05$.

3.4. Impact of High-Fat/High-Sucrose Diet and Vitamin D Supplementation on Inguinal White Adipose Tissue (iWAT) Biology

Histological analysis was performed to assess the effect of regimens on iWAT cellularity (Figure 3A). HFS diet induced significant enlargement of the adipocyte area compared with the NC group, while no significant change of cellularity was observed in HFS + D compared with the HFS-fed mice (Figure 3B). Furthermore, inflammatory status in iWAT evaluated by monocyte chemoattractant protein 1 (*Mcp1*) and chemokine C-C motif ligand 5 (*Ccl5*) mRNA levels revealed that their expressions were drastically increased by the HFS diet as compared with the NC group (Figure 3C), and VD supplementation significantly decreased *Mcp1* and *Ccl5* mRNA levels (41% and 36%, respectively).

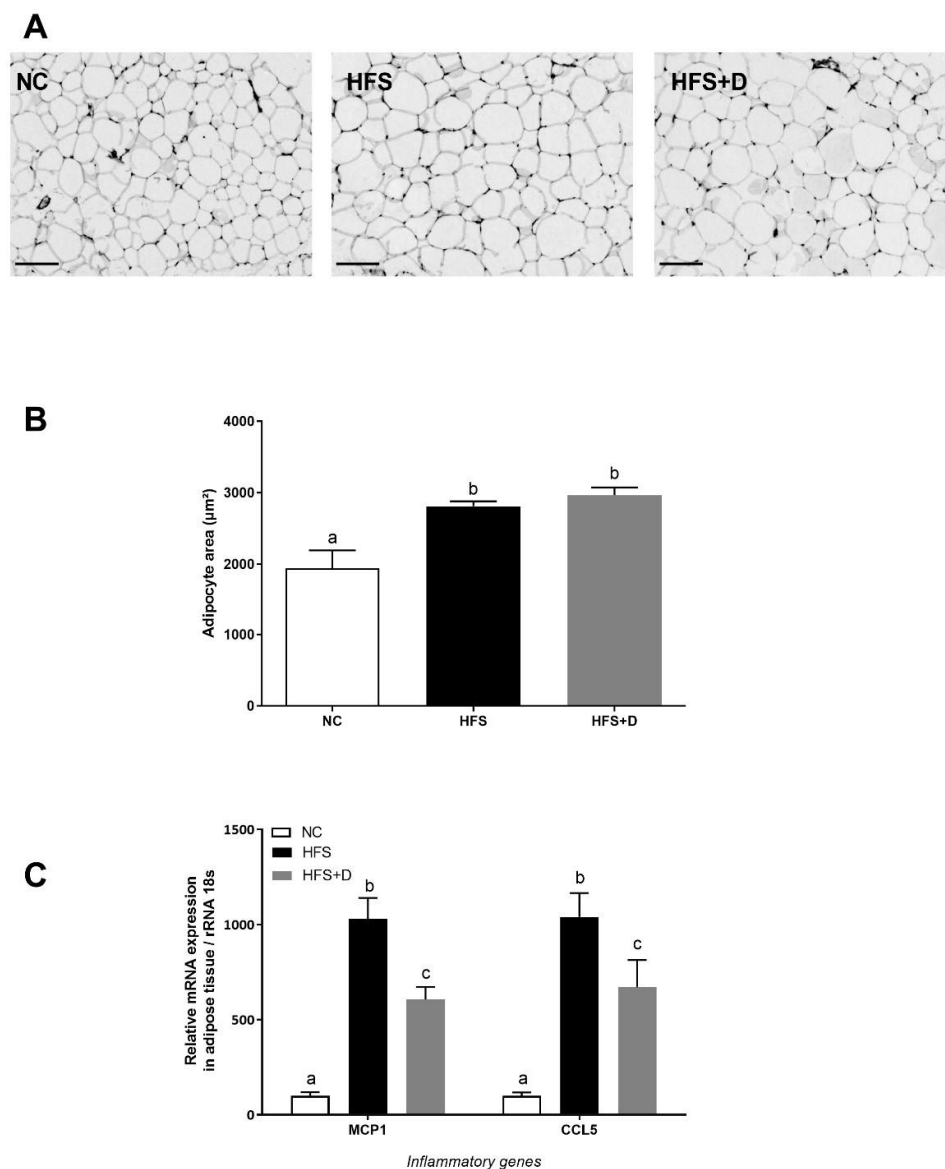


Figure 3. Effects of high-fat/high-sucrose diet and vitamin D supplementation on different parameters of inguinal adipose tissue. (A) Representative histological images of inguinal fat pads after H&E staining, taken at 40× magnification (scale bar represents 100 µm). NC: normal chow, HFS: highfat/high-sucrose diet, HFS + D: high-fat/high-sucrose diet supplemented with vitamin D. (B) Adipocyte area, determined using Image J software. (C) Relative expression of mRNA inflammatory genes measured through qPCR and expressed relative to 18S ribosomal RNA. Values are presented as mean ± SEM. Values not sharing the same letter were significantly different, $p < 0.05$.

3.5. Impact of High-Fat/High-Sucrose Diet and Vitamin D Supplementation on the Liver

Triglycerides (TGs) were quantified in the liver to estimate hepatic lipid accumulation. Our results showed that the HFS diet significantly increased TGs compared with the NC diet and that VD supplementation limited TG accumulation in the liver by 33% (Figure 4A). Histological sections stained by (H&E) confirmed this result by a reduction of visible lipid droplets in VD-supplemented mice compared with that in the HFS-fed mice (Figure 4B).

The effect of VD supplementation on hepatic lipid metabolism was also studied at the molecular level. In particular, the hepatic de novo lipogenesis was evaluated by the mRNA expression of the fatty acid synthase (*Fasn*) and acetyl-coA carboxylase 1 (*Acaca*) genes (Figure 4C). Their mRNA levels were significantly increased in the HFS mice, whereas VD supplementation induced a significant decrease, by 30% and 35% for

Fasn and *Acaca* respectively in comparison with the HFS mice. Moreover, gene expression involved in fatty acid oxidation such as the acetyl-coA oxidase (*Acox*) gene was not modified in the HFS mice whereas this level was downregulated in VD-supplemented mice (Figure 4D), while carnitine palmitoyl transferase (*Cpt1*) mRNA level was equally decreased in the HFS group and in the HFS + D group in comparison with that in NC mice.

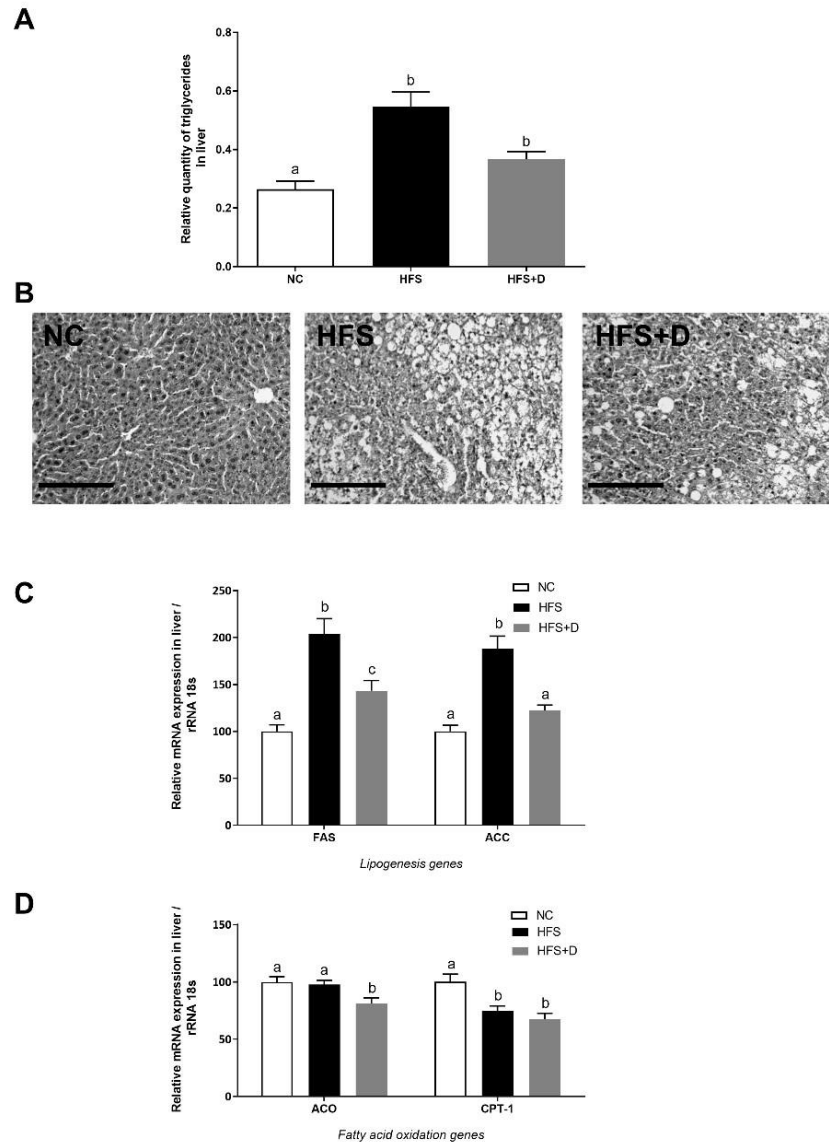


Figure 4. Effects of high-fat/high-sucrose diet and vitamin D supplementation on different parameters in the liver. (A) Quantification of triglycerides in liver tissue, related to liver mass. (B) Representative histological images of liver tissue after H&E staining, taken at 40 \times magnification (scale bar represents 200 μ m). NC: normal chow, HFS: high-fat/high-sucrose diet, HFS + D: high-fat/high-sucrose diet supplemented with vitamin D. (C) Relative expression of mRNA genes related to lipogenesis and (D) fatty acid oxidation measured through qPCR and expressed relative to 18S ribosomal RNA. Values are presented as mean \pm SEM. Values not sharing the same letter were significantly different, $p < 0.05$.

4. Discussion

In the present study, we investigated the effect of VD supplementation for 15 weeks on obese C57BL/6J mice. The mice were obese as a result of an imposed high-fat/high-sucrose diet over a 10week period prior to being given VD supplementation. We highlighted that VD supplementation did not modify the obese phenotype, adiposity, and insulin resistance in the HFS mice, but exerted an anti-inflammatory effect on iWAT and an improvement of hepatic steatosis.

The protocol implemented to generate obesity was a 10-week HFS diet, which led to a significant increase in the total body mass and adiposity index of mice and as expected was associated with hyperglycemia and insulin resistance. This diet-induced obesity and diabetes model was preferred to transgenic models for its comparison with the etiology of insulin resistance and its associated risk factors in a more physiological process. In these obese mice, 15 weeks of VD supplementation did not improve disrupted glucose homeostasis and had no impact on obesity. This observation was consistent with a recently published study that did not find evidence that body weight could be managed in obese mice via VD supplementation [23]. This is also in accordance with several clinical trials that did not report beneficial effects of VD on weight loss for overweight or obese subjects [16,29,30] and was recently meta-analyzed [31,32]. However, it is noteworthy that a study, performed on obese mice injected with 1,25(OH)₂D reported a limited weight gain compared with control obese mice [33]. Such discrepancy could be due to the impact of diet-induced obesity on VD metabolism [34]; the direct administration of 1,25(OH)₂D, could bypass the metabolization of cholecalciferol, and therefore be more efficient. As stated previously, it has recently been reported that obesity in humans reduced the effect of VD supplementation [35]. In the present study, we did not measure adipose tissue concentration of 1,25(OH)₂D, but based on our previously reported data [34], we can speculate that this metabolite is present at a lower concentration in obese mice compared with the levels in the NC-fed mice. We can also speculate that the VD supplementation was not sufficient to reach a 1,25(OH)₂D concentration able to modulate fatty acid oxidation, which is considered as a major driving force of weight loss [18,36,37].

As increased adiposity contributes to insulin resistance, insulin sensitivity was evaluated during the 25-week protocol and as expected the HFS diet induced a decreased sensitivity. Glucose metabolism parameters (glycemia, insulinemia, and HOMA-IR) also highlighted negative effects of the HFS diet, corresponding to an insulin-resistant profile [38,39]. No improvement of those parameters as well as insulin sensitivity were observed under VD supplementation. Such observation could appear to be in contradiction with other studies that demonstrate the beneficial effects of VD supplementation in patients with insulin-resistance and low VD plasma levels [40]. Indeed, the beneficial effects of VD supplementation were mainly obtained on a population with a clear disruption of glucose homeostasis on one hand [15], and on the other hand a population with VD insufficiency [40]. We have to keep in mind that our mice were not deficient in VD, as highlighted by the 25(OH)D plasma level. Thus, it is not surprising that no beneficial effects of VD supplementation were observed on glucose homeostasis parameters.

The role of adipose tissue is now not only considered as a storage site for triglycerides but also as a major endocrine organ via adipokine secretion [41]. In case of obesity, adipocyte biology is deeply modified and characterized by hypertrophy and adipokine secretion profile modification, resulting in a pro-inflammatory environment [4,42]. In agreement, our results showed that the HFS diet induced hypertrophy of adipocytes and increased mRNA levels coding for pro-inflammatory chemokines. If the VD supplementation had no effect on adipocytes morphology, it is noteworthy that VD supplementation improved the inflammatory status within the adipose tissue. Indeed, the rise of inflammatory markers (*Mcp1* and *Ccl5* mRNA levels) induced by HFS diet consumption, was reduced by VD supplementation. Such observation is clearly in line with previous demonstrations of the anti-inflammatory effect of VD, particularly at the chemokine level [20,21,43–45]. Even though the molecular mechanism has not been investigated in the present study, based on our previous results, we can easily hypothesize that NF- κ B and/or p38 MAPK signaling are disrupted by the VD supplementation [20,21].

Interestingly, adipose MCP-1 overexpression has been reported to be associated with hepatic steatosis [46], thus special attention was given to the effect of VD on lipid accumulation and metabolism in the liver. Our results showed a protective effect of VD on HFS-induced hepatic steatosis, highlighted by a decrease of lipid droplets in the liver and a reduction of TG content. At a molecular level, VD supplementation decreased the expression of genes (*Acaca* and *Fasn*) coding for key proteins involved in hepatic de novo lipogenesis, that were induced by the HFS diet. In addition, we have also reported an induction of gene coding for proteins involved in fatty acid oxidation (*Acox*). Taken together, such modulations of genes expression could explain the limitation of TG accumulation observed in VD-supplemented mice. Similarly, a recent study depicted the role of VD supplementation on liver steatosis in a mouse model of obesity [23] and demonstrated that VD intervention significantly reduced hepatic steatosis. No effect on lipogenesis was reported in this study, and

the origin of such a discrepancy is not understood at this time but could be related to the duration of the intervention.

In the human population, the role of VD in non-alcoholic fatty liver disease has recently emerged. Several observational studies reported a link between low 25(OH)D plasma levels and fatty liver diseases [13,47–49]. If the causality is still not clearly demonstrated in humans [50], observations on animal models, including the present study, tend to confirm such an assumption.

To conclude, even though VD supplementation did not improve body weight and insulin sensitivity, interesting data were generated in regard to the impact of VD supplementation on hepatic steatosis and adipose tissue inflammation. It is highly probable that these two occurrences are strongly linked, based on the role of adipose MCP-1 [46]. Such an assumption will require further investigations to be established. Nevertheless, VD supplementation could represent an interesting therapeutic strategy to blunt non-alcoholic fatty liver diseases.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Adipose tissue relative mass after 25-weeks protocol; Figure S2: AUC insulin tolerance test (ITT) values of mice fed with 10 weeks of high-fat/high-sucrose diet; Table S1: Primers sequences.

Author Contributions: A.M. conceived the experiments/researched data/wrote/edited manuscript; C.P., C.C. and J.A., researched data, P.O. edited the manuscript; J.F.L. and C.R. conceived the experiments/researched data/wrote/edited manuscript and are guarantors of this work and, as such, have full access to all the study data and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by a grant from the Federative Research Structure TERSYS, France; the Provence Alpes Côte d'Azur Region, France; Laboratoire Vita-API (La Seyne sur Mer, France), INRA, INSERM and AMU, France.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References.

1. Mozaffarian, D.; Hao, T.; Rimm, E.B.; Willett, W.C.; Hu, F.B. Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 2392–2404.
2. Ezzati, M.; Riboli, E. Behavioral and dietary risk factors for noncommunicable diseases. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 954–964.
3. OMS: 10 facts on obesity Available online: <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/fr/> (accessed on 12 Jan 2020).
4. Gregor, M.F.; Hotamisligil, G.S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.* **2011**, *29*, 415–445.
5. Vranić, L.; Mikolašević, I.; Milić, S. Vitamin D Deficiency: Consequence or cause of obesity? *Medicina* **2019**, *55*, E541.
6. Koo, S.-H. Nonalcoholic fatty liver disease: Molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin. Mol. Hepatol.* **2013**, *19*, 210–215.
7. Landrier, J.-F.; Karkeni, E.; Marcotorchino, J.; Bonnet, L.; Tourniaire, F. Vitamin D modulates adipose tissue biology: Possible consequences for obesity? *Proc. Nutr. Soc.* **2016**, *75*, 38–46.
8. Liel, Y.; Ulmer, E.; Shary, J.; Hollis, B.W.; Bell, N.H. Low circulating vitamin D in obesity. *Calcif. Tissue Int.* **1988**, *43*, 199–201.
9. Wortsman, J.; Matsuoaka, L.Y.; Chen, T.C.; Lu, Z.; Holick, M.F. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, 690–693.
10. Garcia, M.; Seelaender, M.; Sotiropoulos, A.; Coletti, D.; Lancha, A.H. Vitamin D, muscle recovery, sarcopenia, cachexia, and muscle atrophy. *Nutrition* **2019**, *60*, 66–69.
11. Dix, C.F.; Barclay, J.L.; Wright, O.R.L. The role of vitamin D in adipogenesis. *Nutr. Rev.* **2018**, *76*, 47–59.
12. Vimalaswaran, K.S.; Cavadino, A.; Berry, D.J.; Genetic Investigation of Anthropometric Traits (GIANT) Consortium; Whittaker, J.C.; Power, C.; Järvelin, M.-R.; Hyppönen, E. Genetic association analysis of vitamin D pathway with obesity traits. *Int. J. Obes.* **2013**, *37*, 1399–1406.
13. Cimini, F.A.; Barchetta, I.; Carotti, S.; Bertocini, L.; Baroni, M.G.; Vespasiani-Gentilucci, U.; Cavallo, M.G.; Morini, S. Relationship between adipose tissue dysfunction, vitamin D deficiency and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 3407–3417.
14. Hanafy, A.S.; Elkatawy, H.A. Beneficial Effects of vitamin D on insulin sensitivity, blood pressure, abdominal subcutaneous fat thickness, and weight loss in refractory obesity. *Clin. Diabetes* **2018**, *36*, 217–225.
15. Seida, J.C.; Mitri, J.; Colmers, I.N.; Majumdar, S.R.; Davidson, M.B.; Edwards, A.L.; Hanley, D.A.; Pittas, A.G.; Tjosvold, L.; Johnson, J.A. Effect of vitamin D3 supplementation on improving glucose homeostasis and preventing diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, 3551–3560.

16. Wamberg, L.; Kampmann, U.; Stødkilde-Jørgensen, H.; Rejnmark, L.; Pedersen, S.B.; Richelsen, B. Effects of vitamin D supplementation on body fat accumulation, inflammation, and metabolic risk factors in obese adults with low vitamin D levels—Results from a randomized trial. *Eur. J. Intern. Med.* **2013**, *24*, 644–649.
17. Tang, H.; Li, D.; Li, Y.; Zhang, X.; Song, Y.; Li, X. Effects of Vitamin D Supplementation on Glucose and Insulin Homeostasis and incident diabetes among nondiabetic adults: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Int. J. Endocrinol.* **2018**, 7908764.
18. Marcotorchino, J.; Tourniaire, F.; Astier, J.; Karkeni, E.; Canault, M.; Amiot, M.-J.; Bendahan, D.; Bernard, M.; Martin, J.-C.; Giannesini, B.; Landrier, J.-F. Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. *J. Nutr. Biochem.* **2014**, *25*, 1077–1083.
19. Sergeev, I.N.; Song, Q. High vitamin D and calcium intakes reduce diet-induced obesity in mice by increasing adipose tissue apoptosis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 1342–1348.
20. Marcotorchino, J.; Gouranton, E.; Romier, B.; Tourniaire, F.; Astier, J.; Malezet, C.; Amiot, M.-J.; Landrier, J.-F. Vitamin D reduces the inflammatory response and restores glucose uptake in adipocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 1771–1782.
21. Karkeni, E.; Marcotorchino, J.; Tourniaire, F.; Astier, J.; Peiretti, F.; Darmon, P.; Landrier, J.-F. Vitamin D limits chemokine expression in adipocytes and macrophage migration in vitro and in male mice. *Endocrinology* **2015**, *156*, 1782–1793.
22. Karkeni, E.; Bonnet, L.; Marcotorchino, J.; Tourniaire, F.; Astier, J.; Ye, J.; Landrier, J.-F. Vitamin D limits inflammation-linked microRNA expression in adipocytes in vitro and in vivo: A new mechanism for the regulation of inflammation by vitamin D. *Epigenetics* **2018**, *13*, 156–162.
23. Jahn, D.; Dorbath, D.; Kircher, S.; Nier, A.; Bergheim, I.; Lenaerts, K.; Hermanns, H.M.; Geier, A. Beneficial effects of vitamin D treatment in an obese mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Nutrients* **2019**, *11*, E77.
24. Fenni, S.; Hammou, H.; Astier, J.; Bonnet, L.; Karkeni, E.; Couturier, C.; Tourniaire, F.; Landrier, J.-F. Lycopene and tomato powder supplementation similarly inhibit high-fat diet induced obesity, inflammatory response, and associated metabolic disorders. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*, 1601083.
25. Bonnet, L.; Karkeni, E.; Couturier, C.; Astier, J.; Dalifard, J.; Defoort, C.; Svilar, L.; Martin, J.-C.; Tourniaire, F.; Landrier, J.-F. Gene expression pattern in response to cholecalciferol supplementation highlights cubilin as a major protein of 25(OH)D uptake in adipocytes and male mice white adipose tissue. *Endocrinology* **2018**, *159*, 957–966.
26. Tourniaire, F.; Musinovic, H.; Gouranton, E.; Astier, J.; Marcotorchino, J.; Arreguin, A.; Bernot, D.; Palou, A.; Bonet, M.L.; Ribot, J.; Landrier, J.-F. All-trans retinoic acid induces oxidative phosphorylation and mitochondria biogenesis in adipocytes. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 1100–1109.
27. Fenni, S.; Astier, J.; Bonnet, L.; Karkeni, E.; Gouranton, E.; Mounien, L.; Couturier, C.; Tourniaire, F.; Böhm, V.; Hammou, H.; Landrier, J.-F. (all-E)- and (5Z)-Lycopene display similar biological effects on adipocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* **2019**, *63*, 1800788.
28. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408.
29. Sneve, M.; Figenschau, Y.; Jorde, R. Supplementation with cholecalciferol does not result in weight reduction in overweight and obese subjects. *Eur. J. Endocrinol.* **2008**, *159*, 675–684.
30. Zittermann, A.; Frisch, S.; Berthold, H.K.; Götting, C.; Kuhn, J.; Kleesiek, K.; Stehle, P.; Koertke, H.; Koerfer, R. Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 1321–1327.
31. Golzarand, M.; Hollis, B.W.; Mirmiran, P.; Wagner, C.L.; Shab-Bidar, S. Vitamin D supplementation and body fat mass: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2018**, *72*, 1345–1357.
32. Perna, S. Is Vitamin D Supplementation Useful for Weight Loss Programs? A systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *Medicina (Mex.)* **2019**, *55*, E368.
33. Benetti, E.; Mastrocola, R.; Chiazza, F.; Nigro, D.; D'Antona, G.; Bordano, V.; Fantozzi, R.; Aragno, M.; Collino, M.; Minetto, M.A. Effects of vitamin D on insulin resistance and myosteatosis in diet-induced obese mice. *PLoS ONE* **2018**, *13*, E0189707.
34. Bonnet, L.; Hachemi, M.A.; Karkeni, E.; Couturier, C.; Astier, J.; Defoort, C.; Svilar, L.; Martin, J.-C.; Tourniaire, F.; Landrier, J.-F. Diet induced obesity modifies vitamin D metabolism and adipose tissue storage in mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *185*, 39–46.
35. de Oliveira, L.F.; de Azevedo, L.G.; da Mota Santana, J.; de Sales, L.P.C.; Pereira-Santos, M. Obesity and overweight decreases the effect of vitamin D supplementation in adults: Systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2019**, doi:10.1007/s11154-019-09527-7.
36. Peng, X.; Shang, G.; Wang, W.; Chen, X.; Lou, Q.; Zhai, G.; Li, D.; Du, Z.; Ye, Y.; Jin, X.; He, J.; Zhang, Y.; Yin, Z. Fatty acid oxidation in zebrafish adipose tissue is promoted by 1 α ,25(OH)₂D₃. *Cell Rep.* **2017**, *19*, 1444–1455.
37. Larrick, B.M.; Kim, K.-H.; Donkin, S.S.; Teegarden, D. 1,25-Dihydroxyvitamin D regulates lipid metabolism and glucose utilization in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Nutr. Res.* **2018**, *58*, 72–83.

38. Surwit, R.S.; Kuhn, C.M.; Cochrane, C.; McCubbin, J.A.; Feinglos, M.N. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* **1988**, *37*, 1163–1167.
39. Chaar, L.J.; Coelho, A.; Silva, N.M.; Festuccia, W.L.; Antunes, V.R. High-fat diet-induced hypertension and autonomic imbalance are associated with an upregulation of CART in the dorsomedial hypothalamus of mice. *Physiol. Rep.* **2016**, *4*, E12811.
40. Mirhosseini, N.; Vatanparast, H.; Mazidi, M.; Kimball, S.M. The effect of improved serum 25Hydroxyvitamin D status on glycemic control in diabetic patients: A meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2017**, *102*, 3097–3110.
41. Poitou, C.; Dalmás, E.; Clément, K. Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux. *Physiol. Physiopathol. Tissu Adipeux* **2013**, 289–301.
42. Tourniaire, F.; Romier-Crouzet, B.; Lee, J.H.; Marcotorchino, J.; Gouranton, E.; Salles, J.; Malezet, C.; Astier, J.; Darmon, P.; Blouin, E.; Walrand, S.; Jianping, Y.; Landrier, J.-F. Chemokine expression in inflamed adipose tissue is mainly mediated by NF- κ B. *PLoS ONE* **2013**, *8*, E66515.
43. Ding, C.; Wilding, J.P.H.; Bing, C. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ protects against macrophage-induced activation of NF κ B and MAPK signalling and chemokine release in human adipocytes. *PLoS ONE* **2013**, *8*, E61707.
44. Gao, D.; Trayhurn, P.; Bing, C. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits the cytokine-induced secretion of MCP-1 and reduces monocyte recruitment by human preadipocytes. *Int. J. Obes. 2005* **2013**, *37*, 357–365.
45. Lorente-Cebrián, S.; Eriksson, A.; Dunlop, T.; Mejhert, N.; Dahlman, I.; Åström, G.; Sjölin, E.; Wåhlén, K.; Carlberg, C.; Laurencikienė, J.; Hedén, P.; Arner, P.; Rydén, M. Differential effects of 1 α ,25dihydroxycholecalciferol on MCP-1 and adiponectin production in human white adipocytes. *Eur. J. Nutr.* **2012**, *51*, 335–342.
46. Kanda, H.; Tateya, S.; Tamori, Y.; Kotani, K.; Hiasa, K.; Kitazawa, R.; Kitazawa, S.; Miyachi, H.; Maeda, S.; Egashira, K.; Kasuga, M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1494–1505.
47. Eliades, M.; Spyrou, E. Vitamin D: A new player in non-alcoholic fatty liver disease? *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 1718–1727.
48. Sangouni, A.A.; Ghavamzadeh, S.; Jamalzahi, A. A narrative review on effects of vitamin D on main risk factors and severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2019**, *13*, 2260–2265.
49. Liu, S.; Liu, Y.; Wan, B.; Zhang, H.; Wu, S.; Zhu, Z.; Lin, Y.; Wang, M.; Zhang, N.; Lin, S.; Zhu, Y. Association between vitamin D status and non-alcoholic fatty liver disease: A population-based study. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **2019**, *65*, 303–308.
50. Barchetta, I.; Cimini, F.A.; Cavallo, M.G. Vitamin D supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: Present and future. *Nutrients* **2017**, *9*, E1015.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Table S1. Primers sequences.

Gene		Primer sequences
m18S	Forward	CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT
	Reverse	CATTCCTGGCAAATGCTTTCG
mMCP1	Forward	FCATCCACGTGTTGGCTCA
	Reverse	RGATCATCTTGCTGGTGAATGAGT
mCCL5	Forward	TGCAGAGGACTCTGAGACAGC
	Reverse	GAGTGGTGTCCGAGCCATA
mFAS	Forward	CATGACCTCGTGATGAACGTGT
	Reverse	TCGGGTGAGGACGTTTACAAA
mACC	Forward	GGAGTGGATGATGGTCTGA
	Reverse	GGCCTTGATCATCACTGGAT
mACO	Forward	GCTGGCCGTGCCATAGC
	Reverse	TTATCCGTGGGTCCAAACTGA
mCPT1a	Forward	TGCCTTACATCGTCTCAA
	Reverse	GGCTCCAGGGTTCAGAAAGT

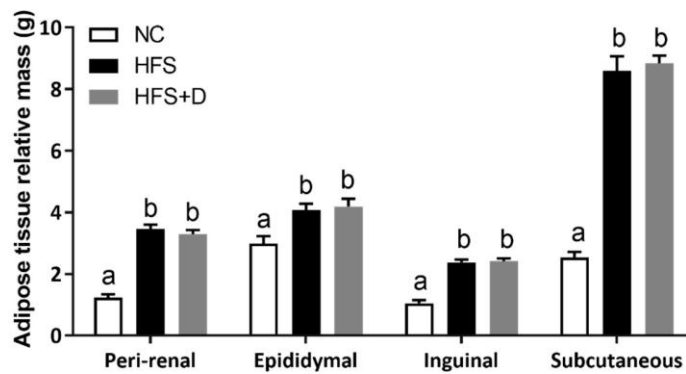


Figure S1. Adipose tissue relative mass after 25-weeks protocol. Values are presented as mean \pm SEM. Values not sharing the same letter were significantly different, $p < 0.05$.

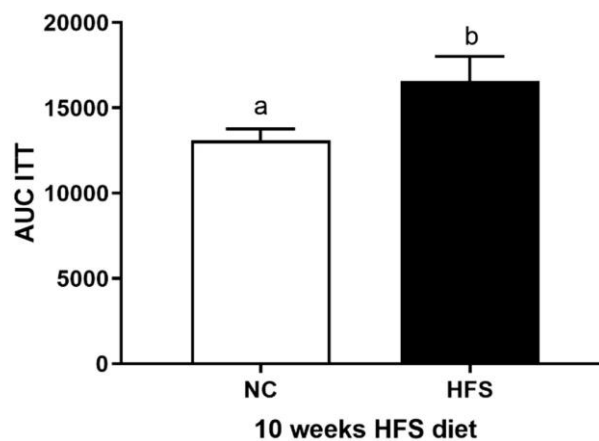


Figure S2: AUC ITT values of mice fed with 10 weeks of high fat/high sucrose diet. Values are presented as mean \pm SEM. Values not sharing the same letter were significantly different, $p < 0.05$.

2. Article n°2 :

Combined effect of voluntary physical exercise and vitamin D supplementation on diet obese C57BL/6J mice

Marziou A, Aubert B, Couturier C, Astier J, Philouze C, Obert P, Landrier JF*,
Riva C*.

Soumis à *Medicine & Science in Sports & Exercise*

2.1. But de l'étude

L'accumulation et l'expansion de la masse adipeuse, caractérisant l'obésité, sont possibles grâce à des modifications structurales du tissu adipeux dont font partie les phénomènes d'hypertrophie. Lorsque les capacités de stockage sont atteintes, ceci va provoquer l'apparition de dépôts ectopiques. Dans la prise en charge de l'obésité, il est clairement établi que l'exercice physique joue un rôle majeur dans la perte de poids et la réduction de la masse grasse. Ainsi, comme notre précédente étude (Article n°1) a rapporté des effets bénéfiques de la vitamine D sur les paramètres inflammatoires du tissu adipeux et du foie, nous nous sommes intéressés à l'effet combiné de l'exercice physique volontaire et de la supplémentation en vitamine D en prévention tertiaire de l'obésité chez des souris soumises à un régime riche en graisse et en sucre.

Dans cette étude, nos objectifs étaient d'évaluer dans ce modèle de souris c57/bl6 obèses les effets de l'exercice physique volontaire combiné à une supplémentation en vitamine D, 1/ sur les paramètres morphologiques, l'adiposité et l'homéostasie glucidique, 2/ l'hypertrophie et l'inflammation du tissu adipeux induites par le régime obésogène et 3/ la stéatose hépatique caractérisée par l'infiltration hépatique et la modification du métabolisme hépatique.

2.2. Principaux résultats

L'exercice physique appliqué à ce modèle de souris c57/bl6 durant 15 semaines induit une limitation significative de la prise de poids et une réduction de l'adiposité qui n'étaient pas retrouvées par la seule supplémentation en vitamine D. De plus, l'insulino-résistance induite par le régime obésogène est conservée lorsque l'exercice

physique et la supplémentation en vitamine D sont administrés seuls. Par contre, de façon intéressante, on observe une restauration de la sensibilité à l'insuline dès lors que les deux stratégies sont associées.

Lorsque l'on s'intéresse au tissu adipeux inguinal, l'exercice physique aboutit à une réduction de la taille des adipocytes et coïncide avec la réduction de masse adipeuse observée. Ces observations s'accompagnent d'une baisse de l'inflammation médiée par la diminution d'expression des chimiokines, également retrouvée par la supplémentation en vitamine D. De plus, la vitamine D vient potentialiser les effets de l'exercice physique sur certains médiateurs inflammatoires (*Ccl5*, *Tgfb*).

Le régime obésogène induit non seulement une augmentation de la masse adipeuse mais également de la masse hépatique. Les 15 semaines d'exercice physique ont engendré une diminution importante de la masse du foie, qui n'est pas observée par la seule supplémentation en vitamine D. Cette diminution s'explique par une réduction de l'infiltration lipidique au niveau hépatique, attestée par histologie et mesurée par dosage des triglycérides. Cette baisse d'infiltration est d'autant plus importante lorsque l'exercice physique est associé à la vitamine D. En parallèle, l'analyse de l'expression génique montre une baisse significative de la lipogenèse par l'exercice physique et la vitamine D avec un retour à la normale lorsque les deux stratégies sont combinées. De plus, le profil inflammatoire hépatique montre une potentialisation des effets de l'exercice physique et de la vitamine D sur l'infiltration macrophagique.

Au vu des résultats bénéfiques obtenus par le couplage exercice physique/supplémentation en vitamine D, il semble pertinent et judicieux de l'appliquer dans les programmes de prise en charge de l'obésité afin d'observer des effets notables au niveau de la perte de poids ainsi qu'une réduction significative de la stéatose hépatique.

2.3. Article

Combined effect of voluntary physical exercise and vitamin D supplementation on diet obese C57BL/6J mice

Alexandra Marziou^{1,2}, Benjamin Aubert¹, Charlène Couturier², Julien Astier², Clothilde Philouze¹, Philippe Obert¹, Jean-François Landrier^{2*}, Catherine Riva^{1*}

¹ LAPEC EA-4278, Avignon Université, 84000 Avignon

² Aix-Marseille Université, C2VN, INRAE, INSERM, 13000 Marseille

* These 2 authors equally contributed to this work.

Corresponding author: Catherine Riva, EA4278 Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire, Université d'Avignon, 74 Rue Louis Pasteur, 84029 Avignon; Tel: +33-4-9016-2933; E-mail: catherine.riva@univ-avignon.fr.

Words count: 4166 words

Total number of figures and tables: 5 figures and 2 tables

Extra folders: 1 supplemental digital content

Abstract

Purpose: The beneficial effect of association of physical exercise (PE) and nutritional approaches are widely plebiscited to improve metabolic health. Here we took advantage of voluntary PE together with a vitamin D (VD) supplementation, which has already displayed beneficial effects in primary and secondary prevention in obese mice model, to study their combining effects regarding body weight management, glucose homeostasis, metabolic inflammation and liver steatosis, as key markers of metabolic health.

Methods: 10-week-old male C57BL/6J mice were fed with HFS diet during 10 weeks. Then, they were assigned to different conditions for a 15-week period with PE, VD supplementation or both PE and VD supplementation. Morphological, histological, and molecular phenotype were characterized.

Results: The increase body mass, adiposity and adipocyte hypertrophy induced by HFS diet were improved by PE, but not by VD supplementation. HFS-induced inflammation (highlighted by chemokines mRNA levels) in inguinal adipose tissue was decreased by PE and VD supplementation. Interestingly, the intervention combining PE and VD displayed additive effects on insulin sensitivity restoration and limitation of hepatic steatosis, as demonstrated through a normalization of lipid droplets number and size and triglycerides content in the liver. At the molecular level, this result was accompanied by a significant decrease of gene expression coding for key enzymes involved in hepatic de novo lipogenesis.

Conclusion: Taken together, our data show for the first-time beneficial effects of combining PE and VD supplementation on obesity-associated comorbidities such as insulin resistance and hepatic disease. Such strategy could therefore be of particular interest in obesity management programs.

Keywords: obesity, voluntary exercise, vitamin D, tertiary prevention

Introduction

The fundamental cause of obesity and subsequent type 2 diabetes is an energy imbalance. This is classically associated to unhealthy diet (1), characterized by an increased intake of energy-dense foods rich in fat and sugars but poor in micronutrients and a sedentary lifestyle (2).

Obesity, characterised by increased fat accumulation, *i.e.* adiposity, is associated to metabolic and physiological modifications (3) leading to adipocyte structural modifications including increased size (hypertrophy) or increased number (hyperplasia). In this context, many factors including adipokines, cytokines, chemokines and miRNA can be released by adipose tissue (AT), leading to systemic low-grade inflammation and insulin resistance (4–6). In addition, when the maximum capacity of AT expansion is reached, large amount of lipids is stored in ectopic deposit, and notably in the liver (7).

Physical exercise (PE) is known to provide beneficial effects in terms of body weight gain and adiposity (8), and reduction of cardiovascular diseases incidence (9,10). PE also reduces type 2 diabetes associated inflammation (11,12). Indeed, exercise training blunts the systemic inflammation through a downregulation of pro-inflammatory cytokine production in several tissues, including muscles, AT and immune cells (13).

In experimental studies, we and others have previously shown that exercise training reduced subcutaneous and visceral AT masses (14) and prevented the HFS (high fat/ sucrose)-mediated decrease of phospho-AKT / total AKT in the subcutaneous AT (15). Voluntary exercise also reduced hepatic steatosis induced by HFS diet consumption (16) and hepatic inflammation (17). Altogether, it is classically admitted that PE represents evidence-based strategy to promote health.

On the other hand, in murine experimental models, we demonstrated the beneficial impact of vitamin D (VD) supplementation on body weight management, glucose homeostasis, AT and systemic inflammation (cytokines, chemokines and miRNA), and hepatic steatosis (18–23).

Physical activity and nutritional supplementation have been investigated in several interventional studies, but not in the context of obesity. Therefore, we hypothesized that a double intervention combining PE and VD supplementation may potentiate benefits on weight gain, metabolic parameters, inflammation and ectopic fat deposition on obese mice.

Materials and methods

Animal, diets and experiments

Six-week-old male C57BL/6J mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France), housed in cages with an enriched environment and maintained in controlled environment conditions (20-23°C; 40% humidity), and on 12 hours light/dark cycle. The mice were fed with water and food *ad libitum*. All procedures were performed in accordance with the local research ethics committee (2017110611453051-RIVA) and the agreement of European and French Ministry of Agriculture about the care and use of laboratory animals 2010/63/EU (N°CEEA-00322.03). Mice (10-week-of age and weighing $23,85 \pm 5,91$ g) were randomly assigned into 2 groups: a normal chow group (NC; n=20), a high fat/sucrose diet group (HFS; n=90). The NC group received a normal chow diet (A04, 3.1% Fat, caloric value 3.339 kcal.kg⁻¹, Safe, France) and water during the entire protocol of 25 weeks. The HFS group was fed with a fat-enriched-dough (230HF, 60% kcal as fat with caloric value 5.317 kcal.kg⁻¹, Safe, France) completed with drink water containing 10% sucrose (D-Saccharose, Fisher Scientific, England) during 10 weeks. After this 10-week period, the HFS group was divided in 4 subgroups, fed with the same HFS diet or HFS supplemented with vitamin D (HFS+D; 15 000 UI.kg⁻¹ cholecalciferol; customized HF230, SAFE Diet, Augy, France) randomly assigned to a sedentary subgroup (HFS and HFS+D, n=60) or voluntary physical exercise (HFS+ex and HFS+D+ex, n=30) up to 15-weeks. Voluntary exercise was introduced with a wheel in cages, connected to a sensor.

During the entire protocol, body weight was measured once a week and dietary intake was assessed daily. Energy intake was calculated per cage from the amount of food and drink consumed by the animals and its caloric equivalence. Exercise was measured by daily record of the number of laps being executed in each cage.

At the end of the protocol, mice were fasted overnight and were all kept sedentary. Animals were firstly anesthetized, and blood was collected by intracardiac puncture and plasma was obtained by centrifuging at 3000g for 15 min at 4°C, and stored at -80°C. The animals, under anesthesia, were sacrificed by cervical dislocation and liver, and adipose deposits (epididymal, subcutaneous, retroperitoneal, inguinal) were entirely collected then weighted and snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The adiposity index was calculated by the sum of all adipose tissues (epididymal, subcutaneous, retroperitoneal, inguinal) relative to total body mass.

Evaluation of physical exercise

PE of mice was monitored, first by daily record of the number of laps being executed in each cage during the entire protocol, and second by the maximum aerobic speed (MAS) evaluation. MAS was measured at the beginning of the protocol (T0) and after the 10-week HFS diet. Then, it was evaluated during the exercise protocol at T17 and T24. It consisted on a 6 min treadmill training session at a velocity of 7 m.min⁻¹ and increased levels of 4 m.min⁻¹ every 1'30 minutes. The MAS was reached when mice were not able to keep up with treadmill speed.

Insulin tolerance test

Mice were subjected to Insulin Tolerance Test (ITT) and were fasted for 6 hours before assessments. Collection of blood (5µl) was realized by using the tail-clip method and fasting glycemia was measured using commercially available glucometer (Accu-Check glucometer, Roche), according to the manufacturer's instructions. Then, ITT were performed after an i.p. injection of insulin solution (1U.kg⁻¹), and blood glucose levels were measured from tail blood taken at the indicated times after injection: 10, 30, 60, 90, 120 minutes after injection. ITT was realized at T0, T10, T17 and T24.

Biochemical analysis

Adiponectin, calcium (Ca^{2+}), insulin, glucose, non-esterified fatty acids and triglycerides were quantified according to the manufacturer's instructions as previously described (24).

The HOMA-IR index was calculated according to the following formula: fasting insulin (microU.L^{-1}) x fasting glucose (mmol.L^{-1})/22.5 (25).

25(OH)D quantification in plasma

All quantifications were performed using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (Hypersil Gold® C18 column, Orbitrap™ Q Exactive™ Plus system and Xcalibur™ software, Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States) according to the protocol previously reported (18,26,27).

Histological analysis

Paraffin embedded tissue sections of liver and inguinal AT (iWAT) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) using standard protocols. The images were captured by a light microscope (Zeiss Axio Imager, Germany) and adipocyte area (μm^2) was determined using (Image J) software as previously described (24,28,29).

RNA isolation and qPCR

Total RNA from liver, iWAT and epididymal AT (eWAT) were extracted using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher, Courtaboeuf, France). One μg of total RNA was used to synthesize cDNA in 20 μl using random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Thermo Fisher, Courtaboeuf, France). Real Time Quantitative RT-PCR analyses were performed using the AriaMx System (Agilent, Santa Clara, United States) as previously described (30). All PCR reactions were using a Sybr Green Master

mix (PowerUp™SYBR®, Thermo Fisher, Courtaboeuf, France). For each condition, expression was quantified in duplicate, and 18S rRNA was used as the endogenous control in the comparative cycle threshold (CT) method (31). Primer sequences were used for qPCR determination (see Supplemental Digital Content 1, which lists primer sequences). Data were expressed as relative expression ratio.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean \pm SEM. Significant differences between control and treated groups were determined using ANOVA, followed by the PLSD Fischer post hoc test using Prism6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Correlations between two variables were performed using Prism6 by calculating Pearson correlation coefficient. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Voluntary PE associated to VD limited weight gain

After 10 weeks of HFS diet, mice displayed a significant increased body weight compared with the NC group due to a higher energy intake in the HFS group. In order to assess the effect of a long-term PE and VD supplementation on obese mice, we compared HFS-fed group of mice remained on the HFS diet to 3 other subgroups assigned either to voluntary PE (HFS+ex), VD supplementation (15 000 IU/kg of food) (HFS+D), or both of them (HFS+D+ex) for 15 additional weeks. At the end of the 25-week period, HFS mice continued to gain weight and their final body weight was 1.5-fold higher than NC mice (Figure 1A). Mice assigned to 15 weeks of voluntary exercise alone or together VD supplementation reduced their weight gain (-15%) compared with HFS and HFS+D mice.

Voluntary PE associated to VD supplementation limited adipose tissue mass

HFS diet consumption increased adiposity after 25 weeks (Figure 1B) with a 2.4-fold increase of adiposity index. The adiposity of HFS+D+ex group was reduced (-23%) compared with the HFS and HFS+D groups and was similar to the HFS+ex group. Each AT deposit mass has been measured, in order to estimate AT distribution (Figure 1C). In the HFS group, retroperitoneal, epididymal, inguinal and subcutaneous masses were respectively 4, 2, 3 and 5 times higher compared to NC mice. These masses were significantly reduced in HFS+D+ex and HFS+ex mice (-42% retroperitoneal, -16% epididymal, -31% inguinal and 41% subcutaneous) compared to HFS and HFS+D mice.

Adipocyte morphology of inguinal AT was studied (Figure 1D). Histological analysis showed adipocyte hypertrophy in the HFS group (mean adipocyte area 30% higher) compared to the NC group. In the HFS+D+ex group, adipocyte mean size was significantly reduced by 11%

compared to the HFS group (Figure 1E) and by 16% compared to the HFS+D group. However, no difference was observed between HFS+D+ex and HFS+ex groups.

Voluntary PE associated to VD improved physical performances on obese c57bl6/J mice fed with an HFS diet

Mice in the HFS+ex group and the HFS+D+ex group ran similar distance with respectively 1,314 and 1,429 meters/day (Figure 2A). Cumulative running achieved a total of 11,937 and 10,683 meters in the HFS+ex and HFS+D+ex groups, without any difference between these groups (Figure 2B).

To check if voluntary PE improved physical performances, maximum aerobic speed (MAS) was measured at different time points during the protocol. No modification in MAS was observed between the NC and HFS groups after 10 weeks of protocol. Then, a significant increase in MAS at the middle (17 weeks) as well as at the end (24 weeks) of the protocol was observed in both HFS+ex mice (+40%) and HFS+D+ex (+35%) mice compared to sedentary (NC, HFS and HFS+D) groups of mice (Figure 2C). Moreover, modification observed in MAS was not altered by age because the NC group exhibited same values between the different measures.

Voluntary exercise associated to vitamin D supplementation improved glucose homeostasis and insulin sensitivity

As reported before (Marziou et al. 2020), the 10-week HFS diet protocol induced an insulin resistant pattern in mice. Furthermore, at the end of the 25-week protocol, insulin sensitivity, evaluated by insulin tolerance test (ITT), was 1.5-fold reduced compared to NC mice (Figure 3B). In terms of glycemic response to a single dose of insulin, no difference was observed

between the HFS group and HFS+D or HFS+ex groups. However, in HFS+D+ex group, glycemic response was similar to the NC group (Figure 3A). In addition, calculation of AUC displayed same pattern in HFS+D+ex and NC groups (Figure 3B). Plasma insulin and glucose quantification (Figure 3C) showed that HFS and HFS+D groups displayed hyperglycemia and hyperinsulinemia, while in HFS+D+ex and HFS+ex groups. HOMA-IR also revealed similar response profile (Figure 3D).

Impact of voluntary PE and vitamin D supplementation on plasma parameters

HFS diet supplemented or not with VD for 25 weeks did not modify plasma triglycerides (TG) concentration in comparison to NC diet (Table 1), while PE induced a significant decrease in triglycerides levels in HFS+ex and HFS+D+ex groups compared to HFS and NC groups. Concerning non-esterified fatty acid (NEFA) concentration, a decrease was observed for all HFS groups in comparison with the NC group (Table 1). Adiponectin concentration was slightly increased in the HFS group compared to the NC group and no difference between HFS, HFS+D groups and the NC group was observed. The HFS+ex group showed a decreased adiponectin level in comparison to the HFS group and the HFS+D+ex group showed a significant decreased adiponectin concentration compared with the other HFS+D, HFS+ex and HFS groups.

As expected, 15 weeks of VD supplementation significantly increased cholecalciferol and 25(OH)D plasma levels compared with the HFS and NC groups (Table 1), and resulted in a slight increase of calcemia in HFS and HFS+D fed mice compared with the NC group. Furthermore, in trained mice, a slight but significant decrease of 12% in 25(OH)D level was observed in the HFS+D+ex group as compared with HFS+D (Table 1) and significant decrease of calcemia in comparison to HFS+D, HFS groups but calcemia was similar to HFS+ex group.

Voluntary PE associated to VD supplementation improved inflammatory status mediated by HFS diet on adipose tissue

As voluntary PE coupled to VD supplementation induced significant decrease in iWAT accretion, gene expression analysis was performed to examine consequences on AT inflammatory related genes (Figure 4A). *Mcp1* mRNA level was significantly increased in the HFS group compared with the NC group. VD supplementation (HFS+D) decreased significantly *Mcp1* level in comparison with the HFS group. PE induced a slight but not significant decrease of *Mcp1* mRNA levels in HFS+D+ex and HFS+ex groups, compared to HFS group. The expression of the *Ccl5* mRNA was also increased in the HFS group compared with the NC group, and *Ccl5* mRNA expression was decreased in HFS+D and HFS+ex groups compared to HFS group. The decrease in HFS+D+ex group was more pronounced than in the HFS+D and HFS+ex groups. *Tgfb1* mRNA levels showed an increased expression in the HFS group compared with the NC group, and no major difference was observed between HFS+D and HFS+ex groups compared with the HFS group. However, the HFS+D+ex group showed a significant decrease of *Tgfb1* mRNA expression (-45%) compared with the HFS group. Other cytokines expression such as *Il6*, *Il10* and *Tnfa* expressions were measured and no difference was observed between the HFS group and HFS+D, HFS+ex and HFS+D+ex groups (data not shown).

Visceral and epididymal AT deposits were also studied in terms of gene expression coding for inflammatory proteins. Among the studied chemokines (data not shown), *Ccl5* was 5-fold increase by HS diet in comparison with the NC group and no change was observed in HFS+D and HFS+ex groups. However, in the HFS+D+ex, *Ccl5* mRNA levels were decreased compared with the HFS group.

Voluntary PE improved energetic metabolism in inguinal adipose tissue

mRNA coding for proteins related to metabolic (peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 α (*Pgc1a*) and carnitine palmitoyltransferase-1 (*Cpt1*) and thermogenic uncoupling protein 1 (*Ucp1*), activities were assessed on iWAT (Figure 4B). HFS diet induced a decrease in *Cpt1* expression on iWAT in comparison with NC diet. This decrease was also observed in all groups (Figure 4B). *Ucp1* mRNA expression was found to be significantly increased (3-fold) in the HFS group compared with the NC group, and significantly decreased in HFS+D+ex and HFS+D but not in HFS+ex group, in comparison with the HFS group.

Pgc1a mRNA levels were significantly decreased in the HFS group as well as in the HFS+D group compared to the NC group, while PE induced a 2-fold increase of *Pgc1a* in HFS+ex and HFS+D+ex groups as compared to HFS group and reached values similar to the NC group.

Voluntary PE associated with VD supplementation decreased ectopic fat liver deposition and inflammatory gene expression

HFS diet induced a significant liver mass increase (2-fold) compared with the NC group (Figure 5A). While VD supplementation did not modify liver mass, exercise reduced it by -32% and -38% in HFS+ex and HFS+D+ex groups respectively in comparison to the HFS group. Moreover, liver mass of HFS+D+ex group was similar to the NC group.

To evaluate hepatic lipid accumulation, intrahepatic triglycerides (TG) were quantified. TG in the HFS group were significantly increased compared to the NC group. In the HFS+D+ex group, a drastic decrease of TG (-70%) was shown compared to the HFS group and a decrease (-37%) compared to the NC group. In HFS+ex and HFS+D groups TG decreased by almost 33% compared to the HFS group and no difference compared to the NC group (Figure 5C). In

agreement with these results, histological sections stained by (H&E) confirmed a reduction of visible lipid droplets (Figure 5B).

At the molecular levels, key genes expression of fat metabolism (de novo lipogenesis versus fatty acid oxidation) were measured in the liver. The evaluation of hepatic de novo lipogenesis through the mRNA expression of Fatty acid synthase (*Fasn*) and Acetyl-CoA carboxylase (*Acaca*) genes was assessed (Figure 5D). As expected de novo lipogenesis was significantly enhanced by HFS diet. In fact, *Fasn* and *Acaca* expression were significantly increased by 2 and 1.8-fold respectively, in the HFS group compared to the NC group. On the contrary, as PE or VD supplementation exerted an inhibitory effect of *Fasn* and *Acaca* gene expression, the association of both, limited significantly the *Fasn* and *Acaca* expression in HFS+D+ex group.

Fatty acid oxidation was measured by gene expression of acyl-CoA oxidase (*Acox*) and carnitine palmitoyltransferase-1 (*Cpt1*) (Figure 5D). No difference of *Acox* mRNA levels was observed between HFS, HFS+ex and NC groups whereas groups supplemented with VD (HFS+D and HFS+D+ex groups) showed a significant decrease compared to the HFS group. On the other hand, groups fed with HFS diet (HFS, HFS+D, HFS+ex and HFS+D+ex) induced a significant decrease of *Cpt1* expression compared to the NC group.

The ratio between lipogenesis and lipolysis was also determined and compared with other parameters (Table 2). We observed that this ratio was 3-fold increase in the HFS group compared to the NC group. It was positively correlated with higher liver TG and adiposity index. In HFS+D+ex group, this lipogenic activity was significantly diminished and was associated to decreased liver TG and adiposity index. Coefficient correlation of lipogenesis/lipolysis ratio with liver TG and adiposity index were respectively 0,83 and 0,75.

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*Ppara* and *Pparg*) expression was measured in the liver (Figure 5E). *Pparg* expression was significantly increased in the HFS group compared to the NC group. On the contrary, with exercise and VD supplementation (HFS+D+ex), *Pparg* mRNA levels were decreased by 38% compared with the HFS group. A decrease was also observed in the HFS+D group (-7%) and in the HFS+ex (-27%) compared to the HFS group. On the other hand, *Ppara* mRNA levels was not affected by any diet or intervention.

Inflammation was also studied in the liver. While *Tnfa* expression was 3-fold increase in the HFS group compared to NC group, no improvement was observed after VD supplementation or PE (Figure 5F). The expression of *Mcp1* mRNA was induced in HFS, HFS+D and HFS+ex compared to the NC group, whereas its expression was decreased in HFS+D+ex group.

Discussion

The aim of this work was to investigate the effects of an intervention associating voluntary PE and VD supplementation during 15 weeks on obesity and metabolic disorders on diet-induced obese male C57bl6/J mouse model.

We implemented a 10-week HFS diet to generate obesity and insulin-resistance in mice, as previously described (24). Interestingly, after the obesity induction, a strategy based on 15-weeks of PE in obese mice resulted in a significant weight limitation gain as reported under shorter PE period (7 weeks; (29)), while VD supplementation alone did not limit HFS-induced weight gain, in accordance with previous data (16,24). The combination of PE with VD supplementation did not enhance the effect obtained with PE alone in terms of limitation of weight gain. Concerning adiposity, only PE alone or in combination with VD improved it significantly. No effect of VD alone was observed. Similar results were observed in the different deposits of AT in visceral (epididymal, inguinal or retroperitoneal) as well as subcutaneous AT, *i.e.* a decrease under PE effect, as previously reported by others (14,32,33). It is noteworthy that histological analysis suggested that increased adiposity was associated to adipocyte hypertrophy under HFS diet. Interestingly, PE not only reduced fat accretion but also limited the adipocyte hypertrophy as previously reported (14).

We evaluated the effect of voluntary PE on HFS-fed mice performance (measured by MAS), and observed that this parameter was improved compared to sedentary mice, while no change was obtained after VD supplementation.

It is well established that increased adiposity promotes a low-grade inflammatory status (4,6), notably characterized by an increase of chemokines expression in AT (34). Whereas HFS diet induced *Mcp1* and *Ccl5* expression in AT, interestingly the combination of PE and VD supplementation significantly reduced the expression of chemokines. VD alone also reduced

such expression whereas it did not modify adiposity, suggesting that VD alone display a specific inhibition of chemokines expression, whereas in the case of PE, the decrease of chemokines expression is not dissociable from the decrease of adiposity. Observations related to the effect of VD are fully consistent with previous reports in several *in vitro* and *in vivo* models, where VD limited cytokines and chemokines expression by adipocytes (22) and leucocyte infiltration in adipose tissue via a deactivation of the NF- κ B signaling pathway (19).

Furthermore, a significant decreased in *Tgfb1* in inguinal AT after the combination of PE with VD supplementation was noted, which is in agreement with the correlation between adiposity and TGF- β reported by Yadav and colleagues (35). Indeed, TGF- β has been reported to regulate the differentiation of multipotent stem cells towards adipogenic pathways (36). Moreover, TGF- β is involved in hyperplastic AT expandability, which is related to adipocyte precursor proliferation (37). Thus, our results suggest that reduced *Tgfb1* expression could participate to the reduced adipocyte formation and consequently reduced adiposity.

Adiposity and subsequent AT low-grade inflammation have a major role in systemic insulin resistance development. While, a decreased sensitivity to insulin was observed in HFS fed mice at the end of the protocol, neither PE alone nor VD supplementation improved it. Indeed, insulin sensitivity was similar to NC mice when obese mice were subjected to the combination of PE and VD supplementation. Similar results related to the lack of effect on insulin sensitivity after PE has already been reported by Gehrke et al. (16). In addition, we previously reported that VD supplementation alone was inefficient in similar protocol regarding insulin sensitivity (24). Nevertheless, a major highlight of the present study is the improvement of insulin sensitivity after combining PE and VD supplementation, which normalized insulin sensitivity compared to NC mice. The molecular mechanism involved is presently not identified but will require further investigations.

Aside from exerting beneficial effects on weight loss and cardiovascular system, PE had been shown to improve hepatic disease such as NAFLD (38,39) and is highly recommended by the Clinical Practice Guidelines (40). In our study, 15 weeks of PE reduced significantly liver mass and lipid accumulation, evaluated by TG quantification and histology. Interestingly, when VD supplementation was combined to PE, parameters related to the liver were completely normalized compared to NC group. In order to explain these observations, we evaluated the gene expression profile related to lipogenesis and fatty acid oxidation. We observed that the different strategies decreased the expression of genes coding for key proteins involved in hepatic de novo lipogenesis (*Fasn* and *Acaca*) but did not modify fatty acid oxidation. Therefore, the lipogenesis/lipolysis ratio, which was induced by HFS diet, was reduced under PE and/or VD supplementation. Interestingly, this ratio, which is assumed to play an important role in metabolic homeostasis (41) was positively correlated with both liver TG content and adiposity index. Indeed, HFS diet consumption results in an imbalance between lipid acquisition (*i.e.* de novo lipogenesis) and removal (*i.e.* fatty acid oxidation) and is in favour of lipogenesis which could explain the increased TG accumulation in the liver. Hence, lipogenesis appears as a key event in the development of steatosis (42). Our data demonstrated that lipogenesis/lipolysis ratio was reduced by VD supplementation and PE. Interestingly, such reduction was mainly due to the limitation of lipogenesis, which might explain the liver profile improvement and adiposity.

We next evaluated hepatic inflammation and notably chemokines expression since MCP1 has been reported to be associated with hepatic steatosis (43). Moreover, chemokine expression has been shown to be positively correlated with insulin resistance and visceral obesity (44). Interestingly, *Mcp1* expression was strongly decreased by PE and VD supplementation. Such decrease was associated to the improvement of insulin sensibility in mice, suggesting that this reduced expression of *Mcp1* could have a role in the restoration of insulin sensitivity in HFS+D+ex. Indeed, the contribution of *Mcp1* to insulin resistance had been studied in mice fed

with a high fat/sucrose diet supplemented with an inhibitor of the *Mcp1* receptor, CCR2. The blockage of CCR2 had led to decreased pro-inflammatory macrophage infiltration which both ameliorate insulin resistance and hepatic steatosis (45). Further validations are required to validate that assumption in our study.

To conclude, we reported for the first time a combined effect of PE and VD supplementation. Not all parameters tested were improved by this strategy, but key parameters such as insulin sensitivity and liver TG accumulations were beneficially affected, and the effect of combination was stronger than the effect of PE or VD supplementation alone. Such strategy could therefore be of particular interest to fight obesity and its comorbidities.

Acknowledgements:

This research was supported by a grant from the Federative Research Structure TERSYS, the Provence Alpes Côte d'Azur Region, Laboratoire Vita-Api (La Seyne sur Mer), INRAE, INSERM and AMU.

A.M. conceived the experiments/researched data/wrote/edited manuscript, B.A, C.C, J.A, C.P. researched data, P.O. edited manuscript; J.F.L and C.R. conceived the experiments/researched data/wrote/edited manuscript and are guarantors of this work and, as such, have full access to all the study data and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Conflict of interest:

The authors have nothing to disclose.

The results of the present study do not constitute endorsement by the American College of Sports Medicine. The results of the study are presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification, or inappropriate data manipulation.

References

1. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet*. 2011 Aug 27;378(9793):804–14.
2. Ng SW, Popkin BM. Time use and physical activity: a shift away from movement across the globe. *Obes Rev*. 2012;13(8):659–80.
3. Bays H, Blonde L, Rosenson R. Adiposopathy: how do diet, exercise and weight loss drug therapies improve metabolic disease in overweight patients? *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2006 Nov 1;4(6):871–95.
4. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29(1):415–45.
5. Landrier J-F, Derghal A, Mounien L. MicroRNAs in Obesity and Related Metabolic Disorders. *Cells*. 2019 Aug;8(8):859.
6. Tourniaire F, Romier-Crouzet B, Lee JH, et al. Chemokine Expression in Inflamed Adipose Tissue Is Mainly Mediated by NF- κ B. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 Jun 18 [cited 2019 Jun 19];8(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3688928/>
7. Gray SL, Vidal-Puig AJ. Adipose Tissue Expandability in the Maintenance of Metabolic Homeostasis. *Nutr Rev*. 2007 Jun 1;65(suppl_1):S7–12.
8. Sepa-Kishi DM, Ceddia RB. Exercise-Mediated Effects on White and Brown Adipose Tissue Plasticity and Metabolism. *Exerc Sport Sci Rev*. 2016 Jan;44(1):37–44.
9. Hamer M, Stamatakis E. Low-Dose Physical Activity Attenuates Cardiovascular Disease Mortality in Men and Women With Clustered Metabolic Risk Factors. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2012 Jul 1;5(4):494–9.
10. Tanasescu M, Leitzmann MF, Rimm EB, Hu FB. Physical Activity in Relation to Cardiovascular Disease and Total Mortality Among Men With Type 2 Diabetes. *Circulation*. 2003 May 20;107(19):2435–9.
11. Karstoft K, Pedersen BK. Exercise and type 2 diabetes: focus on metabolism and inflammation. *Immunol Cell Biol*. 2016;94(2):146–50.
12. Pedersen BK. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest*. 2017 Aug 1;47(8):600–11.
13. You T, Arsenis NC, Disanzo BL, Lamonte MJ. Effects of exercise training on chronic inflammation in obesity: current evidence and potential mechanisms. *Sports Med Auckl NZ*. 2013 Apr;43(4):243–56.
14. Gollisch KSC, Brandauer J, Jessen N, et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2009 Aug;297(2): E495–504.

15. Américo ALV, Muller CR, Vecchiatto B, Martucci LF, Fonseca-Alaniz MH, Evangelista FS. Aerobic exercise training prevents obesity and insulin resistance independent of the renin angiotensin system modulation in the subcutaneous white adipose tissue. *PLoS ONE* [Internet]. 2019 Apr 25 [cited 2020 May 19];14(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6483229/>
16. Gehrke N, Biedenbach J, Huber Y, et al. Voluntary exercise in mice fed an obesogenic diet alters the hepatic immune phenotype and improves metabolic parameters – an animal model of life style intervention in NAFLD. *Sci Rep*. 2019 Mar 8;9(1):1–13.
17. Kawanishi N, Yano H, Mizokami T, Takahashi M, Oyanagi E, Suzuki K. Exercise training attenuates hepatic inflammation, fibrosis and macrophage infiltration during diet induced-obesity in mice. *Brain Behav Immun*. 2012 Aug 1;26(6):931–41.
18. Bonnet L, Karkeni E, Couturier C, et al. Gene Expression Pattern in Response to Cholecalciferol Supplementation Highlights Cubilin as a Major Protein of 25(OH)D Uptake in Adipocytes and Male Mice White Adipose Tissue. *Endocrinology*. 2018 Feb 1;159(2):957–66.
19. Karkeni E, Marcotorchino J, Tourniaire F, et al. Vitamin D Limits Chemokine Expression in Adipocytes and Macrophage Migration In Vitro and in Male Mice. *Endocrinology*. 2015 May;156(5):1782–93.
20. Karkeni E, Bonnet L, Marcotorchino J, et al. Vitamin D limits inflammation-linked microRNA expression in adipocytes in vitro and in vivo: A new mechanism for the regulation of inflammation by vitamin D. *Epigenetics*. 2018 Mar 7;13(2):156–62.
21. Landrier J-F, Karkeni E, Marcotorchino J, Bonnet L, Tourniaire F. Vitamin D modulates adipose tissue biology: possible consequences for obesity? *Proc Nutr Soc*. 2016 Feb;75(1):38–46.
22. Marcotorchino J, Gouranton E, Romier B, et al. Vitamin D reduces the inflammatory response and restores glucose uptake in adipocytes. *Mol Nutr Food Res*. 2012 Dec;56(12):1771–82.
23. Marcotorchino J, Tourniaire F, Astier J, et al. Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. *J Nutr Biochem*. 2014 Oct 1;25(10):1077–83.
24. Marziou A, Philouze C, Couturier C, et al. Vitamin D Supplementation Improves Adipose Tissue Inflammation and Reduces Hepatic Steatosis in Obese C57BL/6J Mice. *Nutrients*. 2020 Feb;12(2):342.
25. Fenni S, Hammou H, Astier J, et al. Lycopene and tomato powder supplementation similarly inhibit high-fat diet induced obesity, inflammatory response, and associated metabolic disorders. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(9):1601083.
26. Bonnet L, Hachemi MA, Karkeni E, et al. Diet induced obesity modifies vitamin D metabolism and adipose tissue storage in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2019 Jan 1;185:39–46.
27. Bonnet L, Margier M, Svilar L, et al. Simple Fast Quantification of Cholecalciferol, 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D in Adipose Tissue Using LC-

- HRMS/MS. *Nutrients* [Internet]. 2019 Aug 22 [cited 2020 Jan 6];11(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6770531/>
28. Tourniaire F, Musinovic H, Gouranton E, et al. All-trans retinoic acid induces oxidative phosphorylation and mitochondria biogenesis in adipocytes. *J Lipid Res.* 2015 Jun;56(6):1100–9.
 29. Loustau T, Coudiere E, Karkeni E, Landrier J-F, Jover B, Riva C. Murine double minute-2 mediates exercise-induced angiogenesis in adipose tissue of diet-induced obese mice. *Microvasc Res.* 2020 Jul 1;130:104003.
 30. Fenni S, Astier J, Bonnet L, et al. (all-E)- and (5Z)-Lycopene Display Similar Biological Effects on Adipocytes. *Mol Nutr Food Res.* 2019;63(5):1800788.
 31. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* 2001 Dec 1;25(4):402–8.
 32. Wu MV, Bikopoulos G, Hung S, Ceddia RB. Thermogenic Capacity Is Antagonistically Regulated in Classical Brown and White Subcutaneous Fat Depots by High Fat Diet and Endurance Training in Rats. *J Biol Chem.* 2014 Dec 5;289(49):34129–40.
 33. Zhang Y, Wan J, Xu Z, Hua T, Sun Q. Exercise ameliorates insulin resistance via regulating TGF β -activated kinase 1 (TAK1)-mediated insulin signaling in liver of high-fat diet-induced obese rats. *J Cell Physiol.* 2019 May;234(5):7467–74.
 34. van der Heijden RA, Sheedfar F, Morrison MC, et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging.* 2015 Apr 23;7(4):256–67.
 35. Yadav H, Quijano C, Kamaraju AK, et al. Protection from Obesity and Diabetes by Blockade of TGF- β /Smad3 Signaling. *Cell Metab.* 2011 Jul 6;14(1):67–79.
 36. Huang H, Song T-J, Li X, et al. BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(31):12670–12675.
 37. Petrus P, Mejhert N, Corrales P, et al. Transforming Growth Factor- β 3 Regulates Adipocyte Number in Subcutaneous White Adipose Tissue. *Cell Rep.* 2018 Oct 16;25(3):551–560.e5.
 38. Keating SE, Hackett DA, George J, Johnson NA. Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2012;57(1):157–166.
 39. Thoma C, Day CP, Trenell MI. Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adults: A systematic review. *J Hepatol.* 2012 Jan 1;56(1):255–66.
 40. Day CP, Dufour J-F, Canbay A, et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016;64:1388–1402.
 41. Saponaro C, Gaggini M, Carli F, Gastaldelli A. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients.* 2015 Nov 13;7(11):9453–74.

42. Nakamuta M, Kohjima M, Morizono S, et al. Evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med*. 2005 Oct 1;16(4):631–5.
43. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. 2006 Jun 1;116(6):1494–505.
44. Dali-Youcef N, Ricci R. Signalling Networks Governing Metabolic Inflammation *Handb Exp. Pharmacol*. 2016 233:195-220
45. Tamura Y, Sugimoto M, Murayama T, et al. C-C Chemokine Receptor 2 Inhibitor Improves Diet-Induced Development of Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in Mice. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17(3):219–28.

Figures captions

Figure 1: 15 weeks of PE induced a decrease of body weight, adiposity index and adipose tissue masses.

(A) Body weight evolution curve of mice fed with control diet (NC), high fat/sucrose diet (HFS) during the first 10 weeks and then supplemented with VD (HFS+D), PE (HFS+ex) and PE associated to VD supplementation (HFS+D+ex) during 15 weeks (B) An adiposity index was calculated by the ratio between the sum of retroperitoneal, epididymal, inguinal and subcutaneous adipose masses over the body weight of animal. (C) AT masses weighed at sacrifice and body composition were expressed in terms of AT absolute mass. (D) Representative histological images of inguinal fat pads after H&E staining, taken at 40X magnification (scale bar represents 100 μ m). (E) Mean adipocyte area, determined using Image J software. Values are presented as means \pm SEM. Values not sharing the same letter were significantly different, $p < 0.05$.

Figure 2: Enhancement of physical performances in trained mice.

(A) Sensor connected to wheel in cages provided a follow-up of mice activity during the 15 week-protocol. Running distance was expressed as meters per day and per mice in HFS+ex and HFS+D+ex groups. (B) Cumulative running distance in meters through the entire protocol in HFS+ex and HFS+D+ex groups. (C) Evaluation of maximum aerobic speed by treadmill sessions on trained mice at the beginning (T0), after 10 weeks of HFS diet (T10), at the middle of the different supplementations (T17) and at the end of the protocol (T24) for all group of animals, NC, HFS, HFS+D, HFS+ex and HFS+D+ex. Values are presented as means \pm SEM. Values not sharing the same letter were significantly different, $p < 0.05$.

Figure 3: PE associated to VD supplementation improved glucose homeostasis and insulin sensitivity.

Insulin Test Tolerance (ITT) was performed to measure insulin sensitivity in all group of animals, NC, HFS, HFS+D, HFS+ex and HFS+D+ex. (A) Glycaemic response to insulin injection after completion of the 25-week protocol. (B) AUC calculated by glycemic response curve after completion of the 25-week protocol. (C) Quantification of plasma glucose and insulin at the end of 25 weeks protocol; and (D) HOMA-IR was calculated according to the formula mentioned in Materials and Methods. Values are presented as mean \pm SEM. Values not sharing the same letter were significantly different, $p < 0.05$.

Figure 4: PE and VD supplementation decreased HFS-induced hypertrophy and inflammation in inguinal adipose tissue.

(A) Relative expression of mRNA genes involved in inflammation (*Mcp1*, *Ccl5*, *Tgfb*) in iWAT of in all group of animals, NC, HFS, HFS+D, HFS+ex and HFS+D+ex after completion of the 25-week protocol. (B) Relative expression of mRNA genes implicated in metabolism (*Cpt1*, *Ucp1*, *Pgc1a*) in iWAT of in all group of animals, NC, HFS, HFS+D, HFS+ex and HFS+D+ex after completion of the 25-week protocol. Values are presented as mean \pm SEM. Values not sharing the same letter were significantly different, $p < 0.05$.

Figure 5: PE associated to VD supplementation restored normal hepatic profile on mice fed with HFS diet.

(A) Liver masses of mice in the different groups: NC: normal chow, HFS: high fat/sucrose diet, HFS+D: HFS diet supplemented with VD, HFS+ex: HFS assigned to PE and HFS+D+ex: HFS supplemented with VD and PE after completion of the 25-week protocol. (B) Representative

histological images of liver tissue after H&E staining, taken at 40X magnification (scale bar represents 200 μ m). (C) Quantification of triglycerides in liver tissue, related to liver mass in all group of animals, NC, HFS, HFS+D, HFS+ex and HFS+D+ex. (D) Relative expression of mRNA genes related to lipogenesis (*Fasn*, *Acaca*) and to fatty acid oxidation (*Acox*, *Cpt1*) in liver tissue from all group of animals, NC, HFS, HFS+D, HFS+ex and HFS+D+ex. (E) Relative expression of mRNA genes related to nuclear receptors (*Ppara*, *Pparg*) in liver tissue from all group of animals, NC, HFS, HFS+D, HFS+ex and HFS+D+ex.. (F) Relative expression of mRNA genes related to inflammation (*Tnfa*, *Mcp1*) in liver tissue from all group of animals, NC, HFS, HFS+D, HFS+ex and HFS+D+ex. Values are presented as mean \pm SEM. Values not sharing the same letter were significantly different, $p < 0.05$.

Listing of Supplemental digital content

Supplemental digital content 1.docx

Gene	Primer sequence	
m18S	Forward	CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT
	Reverse	CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG
mMCP1(CCL2)	Forward	FCATCCACGTGTTGGCTCA
	Reverse	RGATCATCTTGCTGGTGAATGAGT
mRANTES(CCL5)	Forward	TGCAGAGGACTCTGAGACAGC
	Reverse	GAGTGGTGTCCGAGCCATA
mFAS	Forward	CATGACCTCGTGATGAACGTGT
	Reverse	TCGGGTGAGGACGTTTACAAA
mACC	Forward	GGAGTGGATGATGGTCTGA
	Reverse	GGCCTTGATCATCACTGGAT
mACO	Forward	GCTGGCCGTGTCCATAGC
	Reverse	TTATCCGTGGGTCCAAACTGA
mUCP1	Forward	CCTGCCTCTCTCGGAAACAA
	Reverse	TGTAGGCTGCCCAATGAACA
mCPT1a	Forward	TGCCTTTACATCGTCTCCAA
	Reverse	GGCTCCAGGGTTCAGAAAGT
mCPT1b	Forward	GCTGTCAAAGATACCGTGAGC
	Reverse	TCTCCCTCCTTCATCAGTGG
mCXCL10	Forward	GCTGCCGTCATTTTCTGC
	Reverse	TCTCACTGGCCCGTCATC
mTGFβ	Forward	TGGAGCAACATGTGGA ACTC
	Reverse	GTCAGCAGCCGGTTACCA
mPGC1α	Forward	GTAATCACACGGCGCTCTT
	Reverse	GAAAGGGCCAAACAGAGAGA
mTNFα	Forward	CATCTTCTCAA AATTCGAGTGACAA
	Reverse	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC

Supplemental digital content 1 : Primer sequences.

	NC	HFS	HFS+D	HFS+ex	HFS+D+ex
Triglyceride (mmol.L⁻¹)	1.01 ± 0.05 ^a	1.02 ± 0.06 ^a	1.02 ± 0.08 ^a	0.68 ± 0.05 ^b	0.75 ± 0.07 ^b
Non-esterified fatty acid (mmol.L⁻¹)	0.96 ± 0.05 ^a	0.70 ± 0.04 ^b	0.66 ± 0.04 ^b	0.73 ± 0.04 ^b	0.76 ± 0.06 ^b
Adiponectin (µg.L⁻¹)	8.89 ± 0.38 ^{a,b}	9.54 ± 1.35 ^b	9.21 ± 0.75 ^{a,b}	7 ± 0.63 ^a	4.69 ± 0.31 ^c
Calcium (mmol.L⁻¹)	2.32 ± 0.07 ^a	2.49 ± 0.02 ^{b,c}	2.59 ± 0.07 ^c	2,41 ± 0,03 ^{a,b}	2,42 ± 0,04 ^{a,b,c}
Glucose (mmol.L⁻¹)	8.98 ± 0.47 ^a	11.76 ± 0.60 ^b	11.64 ± 0.51 ^b	10,27 ± 0,78 ^{a,b}	9,99 ± 1,26 ^{a,b}
Insulin (mmol.L⁻¹)	0.01 ± 0.01 ^a	1.00 ± 0.23 ^{b,c}	1.24 ± 0.22 ^c	0.42 ± 0.08 ^{a,b}	0.45 ± 0.15 ^{a,b}
Cholecalciferol (ng.L⁻¹)	0.71 ± 0.20 ^a	4.52 ± 0.81 ^a	77.64 ± 5.86 ^b	4.65 ± 1.06 ^a	44.71 ± 4.25 ^c
25(OH)D (ng.L⁻¹)	117.10 ± 3.43 ^a	154.10 ± 5.00 ^b	240.20 ± 12.56 ^c	137.73 ± 10.63 ^b	210.4 ± 12.92 ^d

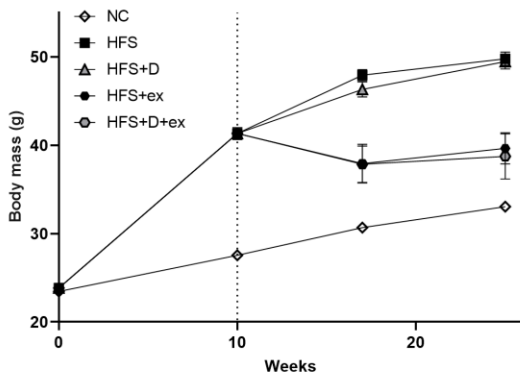
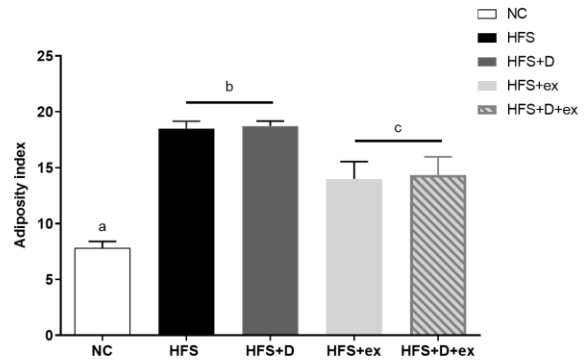
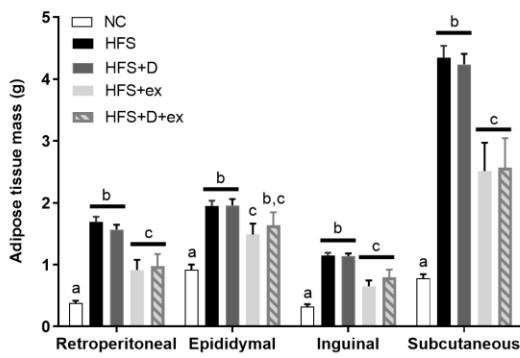
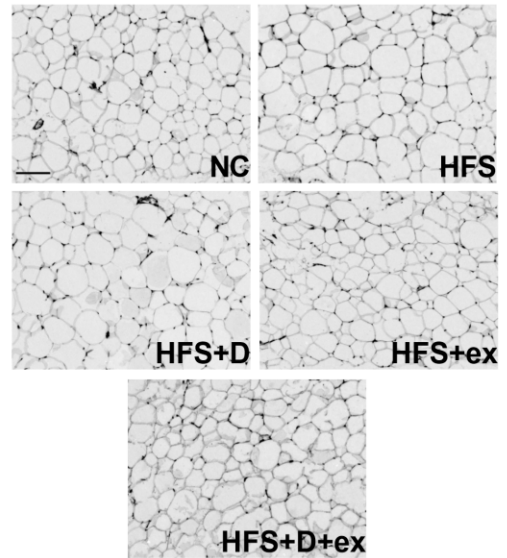
Table 1: Mice biological parameters after 15 weeks of VD supplementation, PE or both.

NC: normal chow, HFS: high fat/sucrose diet, HFS+D: HFS diet supplemented with VD, HFS+ex: HFS assigned to PE and HFS+D+ex: HFS supplemented with VD and PE. Values are presented as mean ± SEM. Values not sharing the same letter were significantly different, p<0.05.

	Lipogenesis/lipolysis ratio	Relative quantity of liver triglycerides	Adiposity index
NC	1,04 ^a	0,26±0.03 ^a	7,81±0.59 ^a
HFS	3,26 ^b	0,55±0.05 ^b	18,50±0.66 ^b
HFS+D	1,89 ^a	0,37±0.02 ^a	18,73±0.44 ^b
HFS+ex	1,44 ^a	0,36±0.07 ^a	14,00±1.55 ^c
HFS+D+ex	1,39 ^a	0,17±0.05 ^c	14,35±1.62 ^c
Correlation (r²)		0,83	0,75

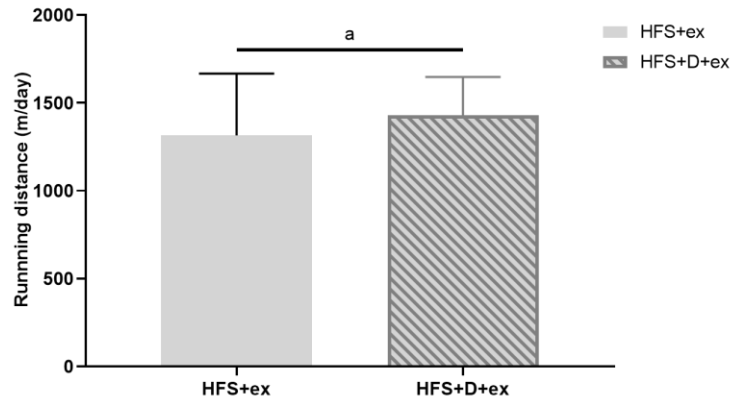
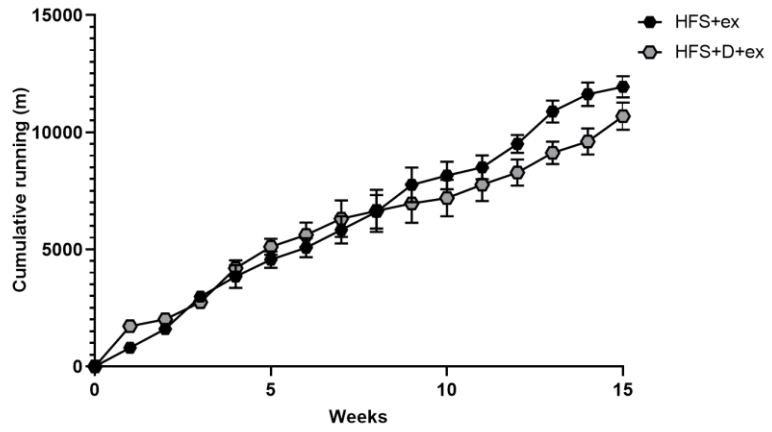
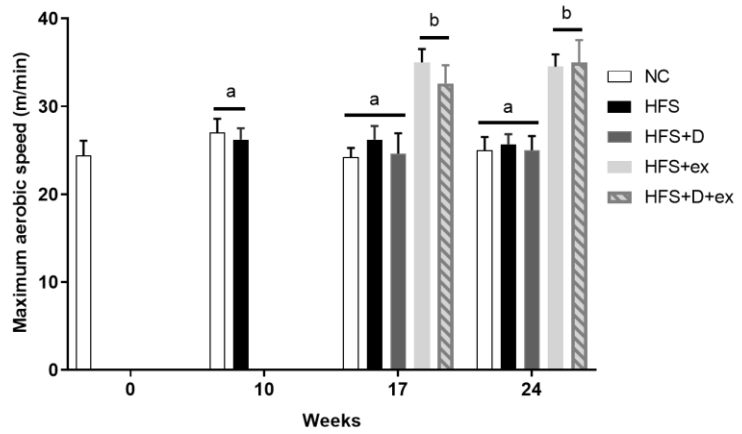
Table 2: Relation between lipogenesis/lipolysis ratio and others parameters.

Lipogenesis/lipolysis ratio was calculated by the ratio of genes expression involved in lipogenesis over lipolysis. Relative quantity of liver triglycerides and adiposity index values were similar to those presented in others figures and Pearson correlations were calculated between lipogenesis/lipolysis ratio and liver triglycerides and adiposity index. NC: normal chow, HFS: high fat/sucrose diet, HFS+D: HFS diet supplemented with VD, HFS+ex: HFS assigned to PE and HFS+D+ex: HFS supplemented with VD and PE. Values are presented as mean ± SEM. Values not sharing the same letter were significantly different, p<0.05.

A**B****C****D****E**

	Adipocyte area (μm^2)
NC	2173 \pm 253 ^a
HFS	2828 \pm 67 ^b
HFS+D	2846 \pm 119 ^b
HFS+ex	2594 \pm 253 ^c
HFS+D+ex	2656 \pm 108 ^c

Figure 1

A**B****C****Figure 2**

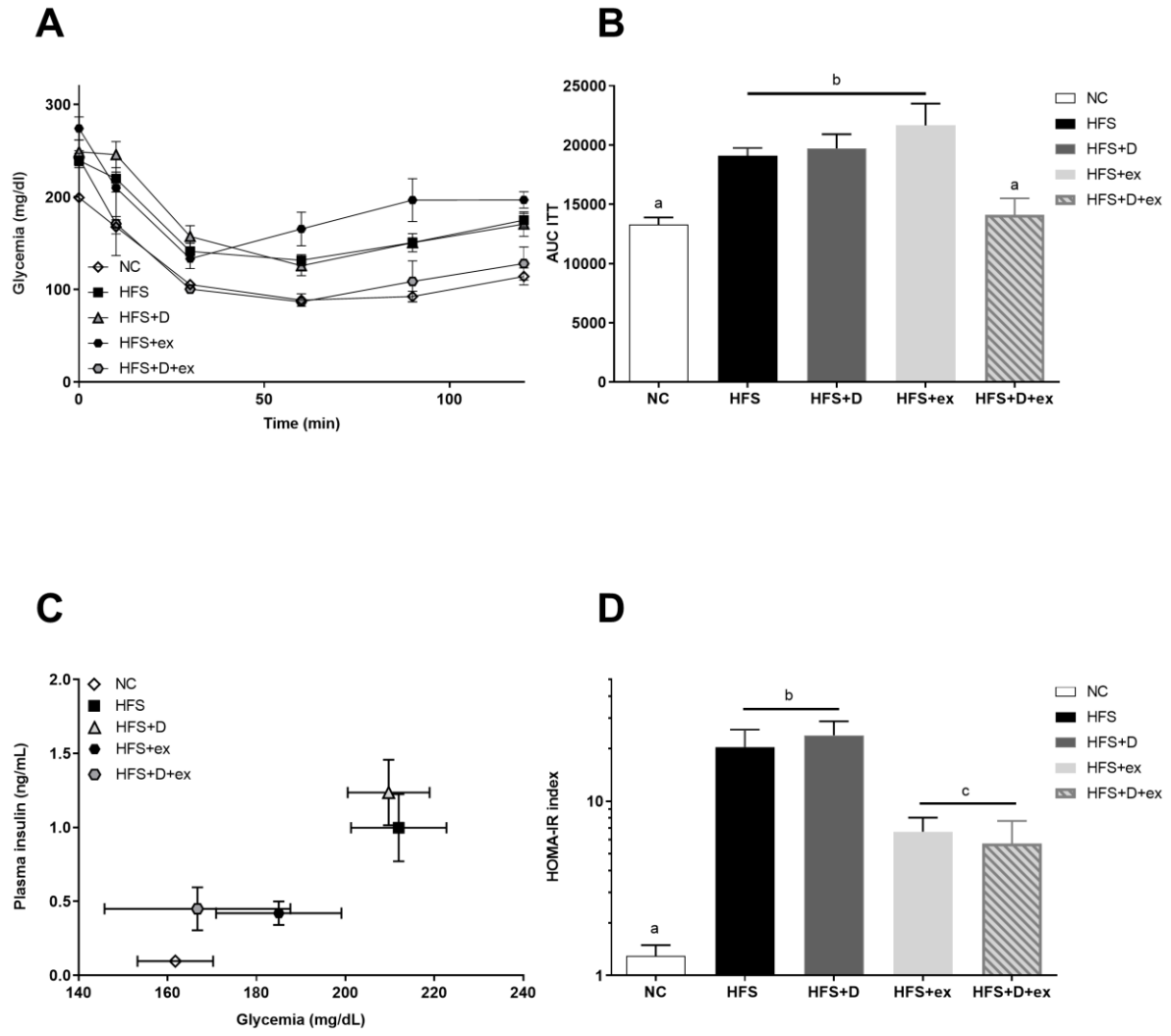
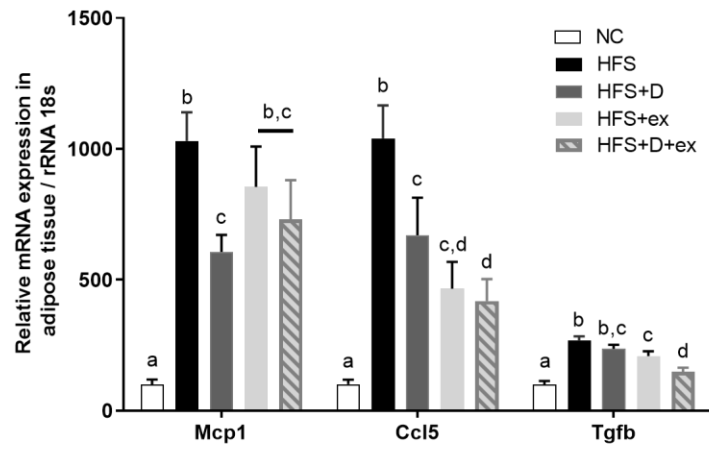
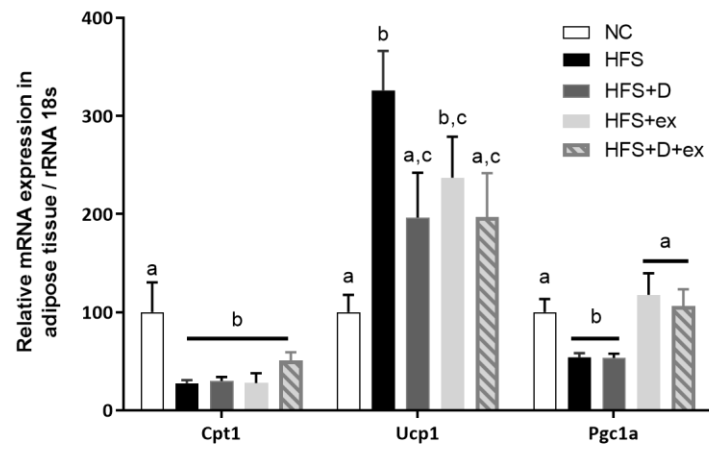


Figure 3

A**B****Figure 4**

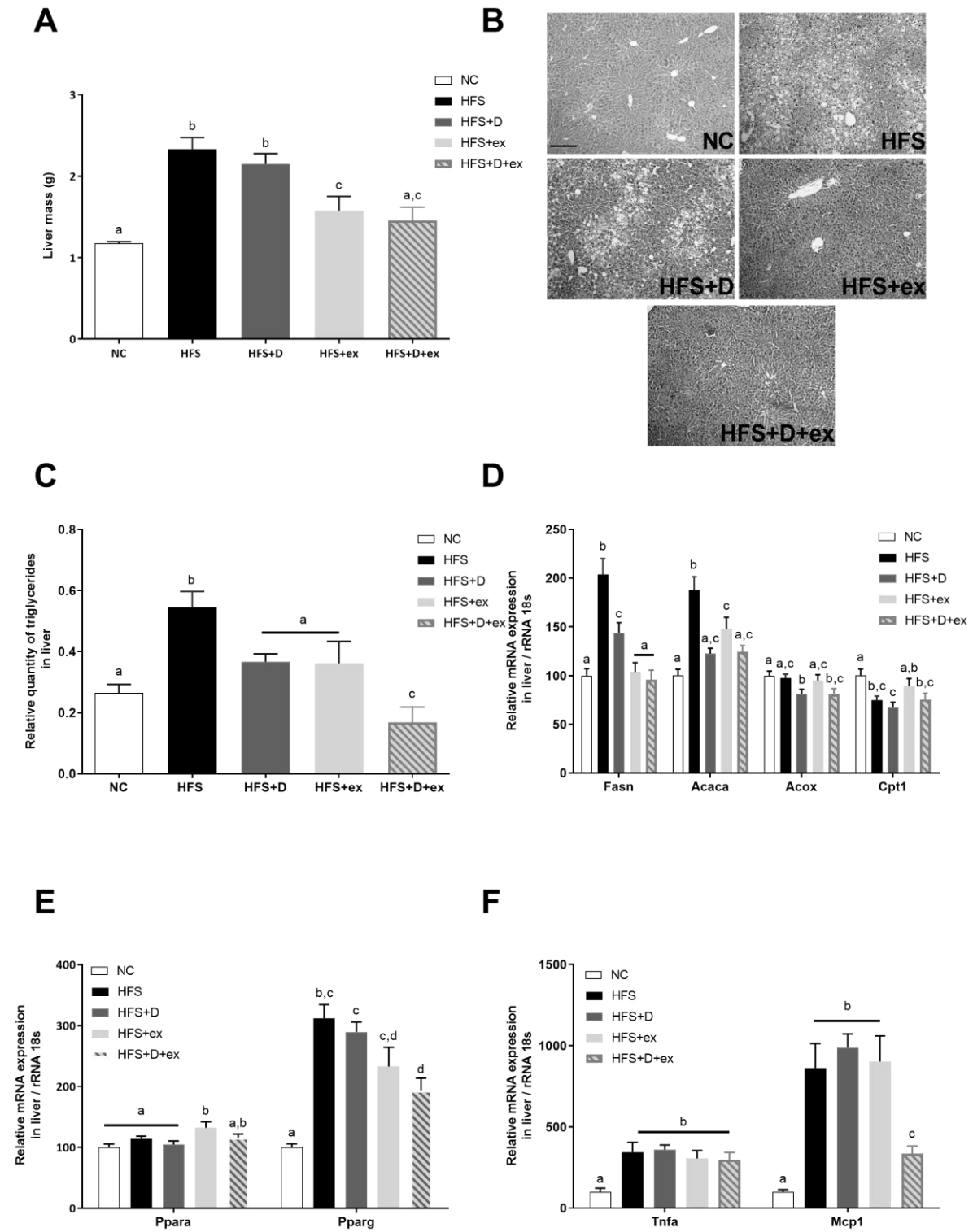


Figure 5

Discussion générale

Depuis des décennies, la prévalence de l'obésité a fortement augmenté. Elle résulte d'une plus grande consommation d'aliments riches en graisse et en sucre mais pauvres en micronutriments et d'une augmentation de l'inactivité physique. Cet excès d'apports caloriques associé à l'obésité surcharge les mécanismes adipocytaires aboutissant à une dérégulation de la sécrétion d'adipokines et finalement à un état pro-inflammatoire (Andrade-Oliveira 2015). Les adipocytes ainsi hypertrophiés incitent davantage au recrutement macrophagique au niveau tissulaire, provoquant l'inflammation chronique de bas-grade (Cheng 2020). Ce remodelage pathologique du tissu adipeux provoque des altérations locales favorisant l'apparition de désordres métaboliques systémiques tels que la résistance à l'insuline, la stéatose hépatique ou encore des dysfonctions cardiaques. Il semble donc primordial d'améliorer nos connaissances quant aux mécanismes biologiques impliqués dans l'obésité afin de pouvoir prévenir son développement ou si son phénotype est déjà bien établi, de pouvoir proposer un traitement efficace sur le long terme. Dans de précédents travaux, l'exercice physique ou la vitamine D ont rapporté des effets bénéfiques sur le contrôle de la prise de poids, l'homéostasie glucidique et l'inflammation systémique (Loustau et al., 2020; Marcotorchino et al., 2012; Sergeev and Song, 2014). Cependant, la combinaison de l'exercice physique et de la supplémentation nutritionnelle en vitamine D n'a jamais été rapportée dans les études interventionnelles.

Dans ce contexte, ce travail de thèse visait à approfondir nos connaissances sur les modifications induites par l'obésité et à étudier les effets d'une supplémentation en vitamine D associée à l'exercice physique sur l'obésité et désordres métaboliques associés.

Avant toute initiation des différents protocoles, il a fallu caractériser notre modèle d'obésité. Nous avons choisi le régime riche en sucre et en graisse (HFS) pour induire l'obésité et favoriser l'installation de l'état pré-diabétique chez les souris c57bl/6J. Ce modèle animal est pertinent et favorable au développement de l'obésité par des interventions nutritionnelles (Fraulob et al., 2010; Loustau et al., 2020; Petro et al., 2000). En effet, la consommation de ce régime a entraîné une augmentation considérable de la masse corporelle accompagnée d'une accumulation importante de lipides au niveau des différents tissus adipeux sous-cutanés et viscéraux. Cette accumulation de lipides adipocytaire est rendue possible par des changements

morphologiques et notamment par une augmentation de la taille des adipocytes, à savoir l'hypertrophie (Spalding et al., 2008). Il est bien établi que ce phénomène est associé à une dysfonction du tissu adipeux qui est propice à l'infiltration de cellules immunitaires et d'une altération de la sécrétion d'adipokines (Goossens, 2017). Dans notre étude, la consommation du régime HFS durant 25 semaines a bien induit une augmentation de l'inflammation au niveau du tissu adipeux, notamment des chimiokines impliquées dans le recrutement macrophagique (*Mcp1*, *Ccl5*). La surexpression de MCP-1 dans le tissu adipeux a été rapportée pour être associée à la stéatose hépatique (Kanda et al., 2006). En lien avec cette observation, nous avons également mis en évidence une augmentation de messagers codant des protéines potentiellement impliquées dans l'infiltration macrophagique (*Mcp1*) au niveau hépatique ainsi qu'une augmentation de la masse du foie qui semble être corrélée à l'accumulation lipidique hépatique. Ces événements contribuent à l'installation d'un état inflammatoire chronique de faible intensité qui joue un rôle central dans l'insulino-résistance. Sur ce fil, nos souris obèses présentent un profil insulino-résistant marqué par l'augmentation de l'HOMA-IR et la baisse de sensibilité à l'insuline malgré la présence d'une hyperinsulinémie.

Dans le cadre de l'insulino-résistance, il a été montré que l'activation de macrophages, retrouvée à la fois dans le tissu adipeux et le foie, découlait de l'altération du métabolisme lipidique (Rosso et al., 2019). Ces altérations comprennent notamment une augmentation des taux circulants d'acides gras libres, de la lipolyse et du degré de l'insulino-résistance présent au sein du tissu adipeux (Rosso et al., 2019). Ainsi, chez nos souris, nous avons pu observer au niveau moléculaire, une augmentation de la lipogénèse hépatique via la surexpression des gènes clés impliqués dans la lipogénèse *de novo* (*Fasn*, *Acaca*). L'équipe d'Oosterveer avait également établi un lien entre l'augmentation des triglycérides hépatiques et l'induction de la lipogénèse chez des rats soumis à un régime HFS (Oosterveer et al., 2009). En effet, la consommation de ce régime génère un afflux d'acides gras qui provoque des adaptations physiologiques voire pathologiques. De plus, lorsqu'une baisse de sensibilité à l'insuline est présente au niveau systémique, ce flux d'acides gras peut être augmenté en raison de la diminution de l'activité anti-lipolytique que l'insuline exerce sur le tissu adipeux (Azzu et al., 2020).

Par ailleurs, de nombreuses études observationnelles ont montré que chez les

individus obèses, les taux sériques en 25(OH)D, forme circulante de la vitamine D, étaient généralement plus bas que ceux d'individus normo-pondérés, suggérant une relation forte entre la déficience en vitamine D et l'obésité mais sans pour autant démontrer de causalité (Gallagher et al., 2013; Landrier et al., 2016). Il a été montré que la vitamine D est impliquée dans de nombreux processus physiologiques, elle exerce notamment des effets anti-inflammatoires au sein du tissu adipeux et des effets métaboliques par la régulation de certains facteurs impliqués dans l'adipogenèse (Karkeni et al., 2015b, 2018; Landrier et al., 2016). Ces observations ont été mises en évidence en prévention primaire de l'obésité et demeurent, à ce jour, insuffisantes concernant la prévention tertiaire. Par ailleurs, le premier objectif majeur de cette thèse a été d'évaluer les effets de la vitamine D sur l'obésité dans un modèle murin, à savoir si elle allait permettre de réverser le phénotype obèse préalablement validé et ses conséquences métaboliques. En effet, si l'effet d'une supplémentation chez le sujet obèse a largement été rapporté, son impact sur un modèle murin n'a pas été étudié à ce jour.

Notre étude a utilisé le cholécalciférol pour la supplémentation en vitamine D (**Article 1**). Une récente méta-analyse a rapporté une meilleure efficacité de l'injection de cholécalciférol sur l'augmentation des concentrations en 25(OH)D (Frag et al., 2018). En effet, dans notre modèle de souris c57/bl6J, la supplémentation en vitamine D a augmenté significativement les concentrations plasmatiques de 25(OH)D, permettant de confirmer les effets de la supplémentation et les résultats déjà obtenus précédemment (Marcotorchino et al., 2014).

Les 15 semaines de supplémentation en vitamine D n'ont pas montré d'effets bénéfiques sur la prise de masse et l'adiposité dans notre modèle de souris obèses. Ces données sont en accord avec les études cliniques récemment méta-analysées (Perna, 2019). De plus, la perturbation de l'homéostasie glucidique n'était pas affectée par la vitamine D alors que dans une récente étude chez les diabétiques de type 2, la vitamine D améliorait la sensibilité à l'insuline (Mirhosseini et al., 2017). Ceci pourrait être lié à une moins bonne efficacité de la supplémentation chez les personnes obèses (de Oliveira et al., 2019) et aussi la nécessité d'une déficience en vitamine D pour pouvoir observer des effets notables sur le contrôle glycémique. Effectivement, les effets bénéfiques de la supplémentation en vitamine D sont visibles principalement en situation de déficience, or nos animaux n'étaient pas déficients lors de l'initiation de

la supplémentation. L'augmentation d'adiposité, induite par la consommation du régime riche en graisse et en sucre, était caractérisée par une hypertrophie adipocytaire et un environnement pro-inflammatoire (Tourniaire et al., 2013). Même si la vitamine D n'a pas permis de limiter l'adiposité et de réduire l'hypertrophie, elle a induit une baisse de l'inflammation au sein du tissu adipeux. Ce résultat a mis en évidence l'implication des chimiokines dans la réponse inflammatoire et avait été précédemment rapportée pour être régulée par la voie de signalisation NF- κ B aussi bien dans un modèle *in vitro* qu'*in vivo* (Karkeni et al., 2015b; Marcotorchino et al., 2012).

Nous avons également montré que la supplémentation en vitamine D permettait une réduction de l'infiltration de triglycérides dans le foie accompagnée d'une baisse d'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la lipogenèse *de novo*. La durée de la supplémentation a probablement été la clef de la réussite de cette supplémentation puisqu'une autre étude, conduite sur une durée plus courte (4 semaines), n'avait pas rapporté d'effet de la vitamine D sur la lipogenèse (Jahn et al., 2019). Récemment, l'association entre de faibles niveaux plasmatiques de 25(OH)D et les maladies hépatiques a été rapportée chez l'Homme (Cimini et al., 2017; Liu et al., 2019). Cependant, cette association n'a pas été clairement établie dans toutes les études cliniques (Sangouni et al., 2019). La communauté scientifique semble être plus en accord concernant les études précliniques chez l'animal et notre étude vient ainsi confirmer l'importance de la vitamine D dans la limitation de la stéatose hépatique.

En parallèle de cette étude, des investigations sur les effets de la supplémentation en vitamine D sur la fonction cardiaque ont été menées au sein du laboratoire (**Annexe 1**). La consommation du régime HFS durant 25 semaines a induit une hypertrophie concentrique et une dysfonction régionale myocardique avec fraction d'éjection préservée ainsi qu'une augmentation des céramides et diacylglycérols intramyocardiques. Ces altérations cardiaques étaient diminuées grâce à la vitamine D, à savoir dans un premier temps une baisse de la masse ventriculaire et une suppression du phénotype concentrique. Il y avait donc une préservation voire une amélioration des paramètres fonctionnels par la supplémentation en vitamine D. De plus, il a été observé une normalisation des céramides et diacylglycérols suggérant des effets cardioprotecteurs de la vitamine D par la modulation des taux intramyocardiques d'espèces lipotoxiques.

Dans les programmes de prise en charge de l'obésité, la perte de poids est un élément essentiel à l'amélioration de la santé cardiométabolique. Comme la vitamine D à elle seule n'a pas permis d'améliorer les paramètres anthropométriques des souris obèses, nous nous sommes intéressés aux effets de l'activité physique (**Article 2**). Précédemment, les effets de l'exercice physique pendant 7 semaines avaient été étudiés dans notre laboratoire et sur le même modèle animal (Loustau et al., 2020). Quelle que soit la durée d'entraînement (7 ou 15 semaines), l'activité physique a induit une réduction importante de la prise de masse corporelle et de l'adiposité malgré la consommation du régime HFS. Ce résultat est notamment associé à une réduction de l'hypertrophie adipocytaire au sein du tissu adipeux inguinal, accompagnée d'une baisse de l'inflammation principalement médiée par les chimiokines. Dans les tissus adipeux obèses, la surexpression de MCP-1 entraîne un recrutement de cellules immunitaires et l'infiltration de macrophages, qui une fois infiltrés vont interagir avec les adipocytes en augmentant la production d'adipokines pro-inflammatoires. Cette boucle de régulation entre les adipocytes et les macrophages maintient de manière constante un statut chronique inflammatoire conduisant à l'installation de l'insulino-résistance (Bai and Sun, 2015; Kamei et al., 2006).

L'amélioration de l'inflammation était également accompagnée d'une augmentation de l'activité thermogénique au sein des adipocytes, caractérisée par l'augmentation de *Pgc1a* et qui avait précédemment été observée dans le tissu adipeux blanc de rats entraînés pendant quatre semaines avec un protocole de nage (Sutherland et al., 2009). L'ensemble de ces améliorations observées au sein du tissu adipeux de nos souris entraînées a finalement permis d'améliorer l'homéostasie lipidique et glucidique. Effectivement, l'exercice physique a induit une réduction significative de l'infiltration de graisse ectopique dans le foie qui était accompagnée d'une baisse de la lipogenèse, en accord avec des données pré-existantes chez la souris (Gehrke et al., 2019). Cette étude vient compléter nos observations, en ayant mis en évidence l'implication de l'AMPk et Akt par l'exercice physique. En effet, l'activation de cette voie a permis de protéger le foie de la stéatose mais également de la résistance à l'insuline hépatique. Néanmoins, sur le plan systémique, aucune modification n'avait été observée. Nous venons ainsi ajouter des données novatrices sur l'effet de l'exercice physique puisque nous avons rapporté une baisse de la résistance à l'insuline évaluée par l'HOMA-IR. Néanmoins, par le test de sensibilité à l'insuline, nous n'avons pas observé d'effets de l'activité physique.

Le deuxième objectif de cette thèse était donc d'étudier l'effet de l'exercice physique combiné à la supplémentation en vitamine D afin de mettre en évidence une potentialisation des effets de l'exercice physique par la vitamine D (**Article 2**). Concernant les paramètres morphométriques, la vitamine D n'a pas eu d'effet synergique avec l'exercice physique sur la limitation de la prise de masse corporelle, l'adiposité, et la répartition des tissus adipeux viscéraux et sous-cutanés. Ces résultats avaient été précédemment observés dans d'autres études chez le rat entraîné (Wu et al., 2014; Zhang et al., 2019).

Sous l'effet de l'exercice physique, nous avons observé que la réduction d'adiposité résultait d'une baisse de l'hypertrophie des adipocytes présents au sein du tissu adipeux inguinal et nous n'avons pas rapporté d'effet additionnel par la supplémentation en vitamine D. Cette observation n'était pas surprenante puisque lorsqu'elle est administrée seule, aucune modification n'était observée sur l'adiposité. Bien que sur les paramètres morphométriques la supplémentation en vitamine D n'améliorait pas les effets observés par l'exercice physique, le statut inflammatoire du tissu adipeux était quant à lui nettement amélioré. Un effet majoré par la double intervention a notamment été observé pour certains paramètres comme *Ccl5*, une chimiokine permettant le recrutement leucocytaire et *Tgfb*, un facteur de croissance impliqué dans l'expansion du tissu adipeux (Petrus et al., 2018).

Sous l'effet de l'exercice physique et de la supplémentation en vitamine D, nous avons mis en évidence une restauration de la sensibilité à l'insuline. De façon concomitante, l'hyperglycémie à jeun était normalisée. Ces effets pourraient être expliqués par la modulation de la translocation de GLUT4, permettant l'entrée du glucose dans les cellules cibles de l'insuline (muscle, tissu adipeux). Il a été montré que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exerçait un effet direct sur la translocation de GLUT4 (augmentation) dans un modèle *in vitro* d'adipocytes 3T3-L1 (Manna and Jain, 2012). En effet, un traitement à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dans des adipocytes humains et des 3T3-L1 induisait une augmentation de l'absorption du glucose par des adipocytes humains ou des 3T3-L1 (Marcotorchino et al., 2012). Ceci a également été retrouvé dans les cellules musculaires et où l'amélioration de l'homéostasie glucidique était médiée par l'activation de la cascade de signalisation SIRT1/IRS1/GLUT4 (Manna et al., 2018). De plus, l'exercice physique a été rapporté pour augmenter l'expression de GLUT4 dans les membranes de cellules insulino-dépendantes (Yaribeygi et al., 2019). On

pourrait ainsi supposer que nos observations sur la restauration de l'insulino-sensibilité proviendrait d'une meilleure absorption du glucose par l'exercice physique et la vitamine D ; et également d'une baisse de l'inflammation connue pour interagir avec la signalisation de l'insuline en modulant le niveau de phosphorylation d'IRS1, protéine substrat essentielle à la transmission du signal insulinique (Tanti and Jager, 2009).

Récemment, une étude clinique conduite sur 8 semaines chez des femmes âgées atteintes de NAFLD et de déficience en vitamine D ont montré un effet synergique de la combinaison de l'exercice physique aérobie et de la supplémentation en vitamine D (Hoseini et al., 2020). Notamment, ils ont observé une plus grande diminution de la résistance à l'insuline, de la glycémie à jeun, des enzymes hépatiques (transaminases ALAT, ASAT) et de la quantité de lipides intrahépatiques que lorsque l'exercice physique ou la supplémentation en vitamine D étaient réalisés seuls.

Dans notre étude, l'exercice physique associé à la supplémentation en vitamine D a induit une baisse significative de la masse hépatique, de manière identique à celle observée par l'exercice physique. Ceci était corrélé à une totale abolition de l'infiltration de triglycérides intrahépatiques induites par le régime obésogène, mettant en évidence l'intérêt de combiner l'exercice physique à la supplémentation en vitamine D dans le traitement de la stéatose hépatique. De plus, nous pouvons penser que comme la sensibilité à l'insuline était restaurée, l'afflux d'acides gras libres dirigés vers le foie était diminué et ainsi le métabolisme hépatique amélioré (Rosso et al., 2019). En effet, sur le plan génique, l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse (*Fasn*, *Acaca*) était diminuée sans pour autant moduler la beta-oxydation. Ces résultats étaient identiques à ceux observés par l'exercice physique.

Dans des conditions pathologiques, l'activation des macrophages dans le foie stéatosé et dans le tissu adipeux provient d'une altération du métabolisme lipidique. Or, sous l'effet de l'exercice physique et de la supplémentation en vitamine D nous avons montré que l'expression de *Mcp1* était fortement diminuée. Cette diminution était en lien avec l'annulation de l'infiltration lipidique intrahépatique et de la restauration de la sensibilité à l'insuline, mettant en lumière le rôle de l'infiltration macrophagique dans l'apparition de la résistance à l'insuline (Kamei et al., 2006; Kanda et al., 2006). En effet, la contribution de *Mcp1* dans la résistance à l'insuline a été étudiée dans un modèle murin soumis à un régime riche en graisse et en sucre

supplémenté avec un inhibiteur du récepteur au Mcp1, le CCR2. Ce blocage au niveau du récepteur avait induit une baisse de l'infiltration macrophagique qui, à la fois réduisait la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique (Tamura et al., 2010).

Cet effet remarquable de l'exercice physique associé à la vitamine D sur la baisse d'infiltration macrophagique peut clairement expliquer la restauration de la sensibilité à l'insuline. Evidemment, il serait intéressant d'étudier les mécanismes sous-jacents afin de caractériser au mieux les effets observés sur ce dialogue inter-organes entre le tissu adipeux et le foie afin de pouvoir à terme, proposer cette double intervention dans les stratégies thérapeutiques du traitement contre l'obésité et des complications métaboliques associées.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse sont récapitulés, sous forme schématique, dans la figure 21.

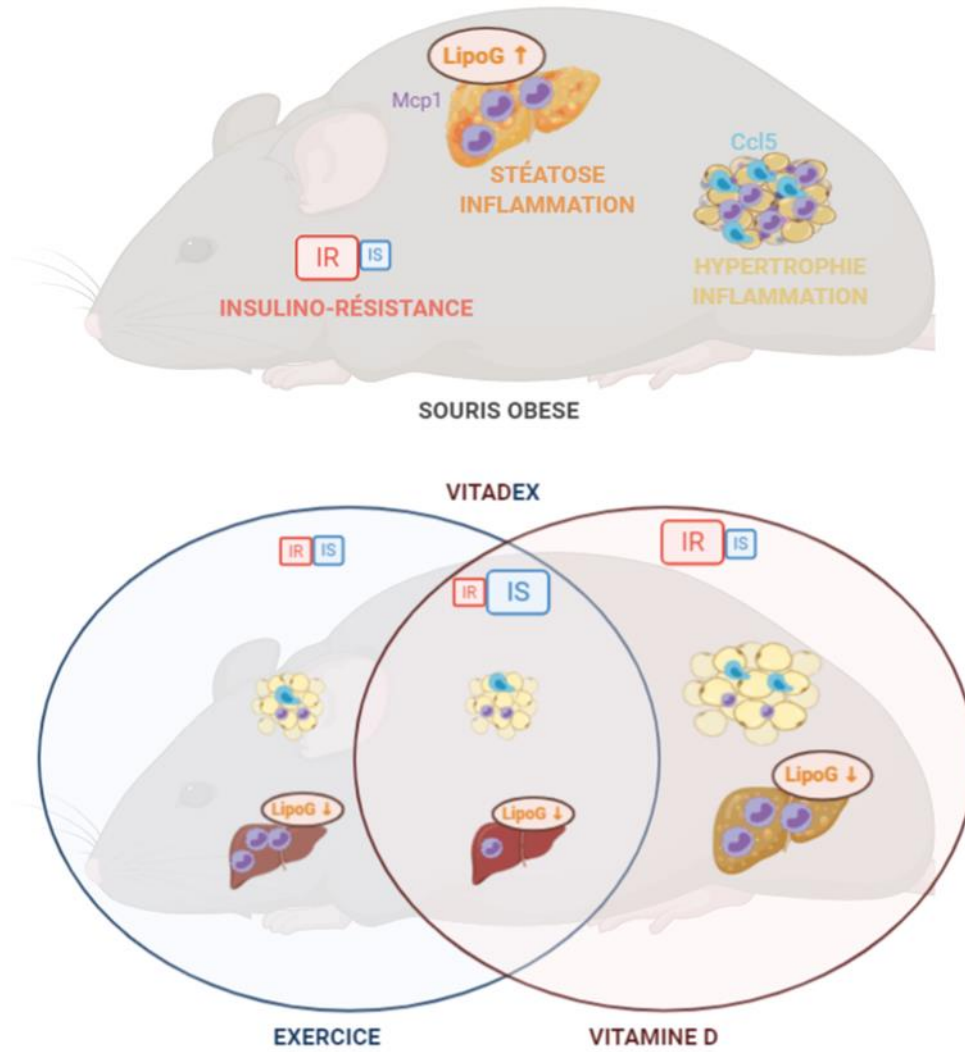


Figure 21 : Schéma récapitulatif. Modulation des paramètres observés au cours de l'obésité par l'exercice et la vitamine D. **IR** : insulino-résistance ; **IS** : insulino-sensibilité ; **LipoG** : lipogenèse.

Conclusion et Perspectives

Conclusion générale

En conclusion, les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis de générer de nouvelles connaissances et approches relatives au traitement de l'obésité et des désordres métaboliques associés. En effet, nous avons étudié pour la première fois l'effet combiné de l'exercice physique volontaire associé à une supplémentation en vitamine D dans un modèle expérimental de souris obèses. Nous avons confirmé dans un premier temps les propriétés anti-inflammatoires de la vitamine D sur le tissu adipeux et l'effet protecteur de la vitamine D sur la stéatose hépatique, récemment identifié dans la littérature. Nous avons ensuite mis en évidence l'importance d'effectuer un exercice physique régulier dans la perte de poids, la répartition de l'adiposité et la résistance à l'insuline. Enfin, nous avons montré que la combinaison de l'exercice physique et la vitamine D était bénéfique quant à la restauration de la sensibilité à l'insuline et la totale abolition de la stéatose hépatique dans notre modèle de souris obèse.

Perspectives

Les résultats obtenus au cours de cette thèse étaient principalement centrés sur la prévention tertiaire de l'obésité. En outre, nous avons également mis en place un protocole de prévention primaire. Les résultats n'ont pas pu être exploités davantage en raison de problèmes techniques. Certains animaux n'ont pas répondu positivement au régime obésogène et de ce fait, le nombre d'animaux pour certains groupes était relativement faible. Il serait intéressant de réitérer ce protocole avec un nombre d'animaux suffisant afin de pouvoir comparer les effets combinés de l'exercice physique et de la supplémentation en vitamine D obtenus en prévention tertiaire avec ces nouvelles données de prévention primaire. Ceci permettrait d'approfondir nos connaissances sur la prévention de l'apparition de l'obésité et de l'appliquer, à terme, chez des personnes à risque.

Lors de ce travail de thèse, nous avons également obtenus des données d'échocardiographie à différents temps du protocole combinant l'exercice physique et la supplémentation en vitamine D. L'exploitation de ces données reposera sur la caractérisation de la fonction cardiaque (fonctions systolique, diastolique) en évaluant différents paramètres (fractions de raccourcissement et d'éjection, diamètre

ventriculaire, épaisseurs des parois etc.) et en analysant les déformations circonférentielles et longitudinales. De plus, des informations complémentaires seront obtenues avec la réalisation de coupes histologiques de cœur permettant d'obtenir des informations sur la morphologie des cardiomyocytes et sur la fibrose cardiaque. Ainsi, ces résultats viendront compléter les données obtenues dans le protocole de supplémentation en vitamine D associée à un régime riche en graisse et en sucre (Annexe 1). Ceci nous permettra de montrer une potentielle amélioration de la fonction cardiaque par la combinaison de l'exercice physique et de la vitamine D.

Les études réalisées au cours de cette thèse ont été axées principalement sur le tissu adipeux et le foie, qui sont des organes majeurs impliqués dans les désordres métaboliques associés à l'obésité, dont notamment l'installation de la résistance à l'insuline. Nous avons également prélevé les muscles, gastrocnémien (métabolisme glycolytique) et soléaire (métabolisme oxydatif). Il serait intéressant d'étudier au sein de ces organes si des dépôts ectopiques sont présents. De plus, il a été mis en évidence une communication entre les adipokines et les myokines ce qui induit une perturbation de la signalisation à l'insuline ainsi que le captage du glucose (Graf and Ferrari, 2019). Des expérimentations visant à mettre en évidence des modifications du métabolisme glucidique et de l'inflammation dans les muscles permettraient ainsi de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance à l'insuline.

Afin de mieux comprendre les mécanismes responsables des effets que l'on a observé, il serait intéressant de compléter ces études *in vivo* par des études *in vitro*. Des cultures cellulaires pourraient être réalisées sur des adipocytes 3T3-L1 en utilisant la 1,25(OH)₂D₃ pour la supplémentation en vitamine D et l'AICAR, un agent activateur de la voie de l'AMPK, pour les effets de l'exercice physique. Ces modèles pourraient permettre d'étudier l'implication des voies de signalisation NF-KB et JNK dans la modulation de l'inflammation observée dans notre modèle d'obésité. De plus, des co-cultures d'hépatocytes et de macrophages pourraient être réalisées afin d'étudier plus en détails l'effet de nos traitements.

Références

~ A ~

Aatsinki, S.-M., Elkhwanky, M.-S., Kummu, O., Karpale, M., Buler, M., Viitala, P., Rinne, V., Mutikainen, M., Tavi, P., Franko, A., et al. (2019). Fasting-Induced Transcription Factors Repress Vitamin D Bioactivation, a Mechanism for Vitamin D Deficiency in Diabetes. *Diabetes* 68, 918–931.

Alberti, K.G.M.M., and Zimmet, P.Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabet. Med.* 15, 539–553.

Al-Daghri, N.M., Rahman, S., Sabico, S., Amer, O.E., Wani, K., Al-Attas, O.S., and Alokail, M.S. (2016). Impact of vitamin D correction on circulating irisin: a 12-month interventional study. *Int J Clin Exp Med* 9, 13086–92.

Aldiss, P., Betts, J., Sale, C., Pope, M., Budge, H., and Symonds, M.E. (2018). Exercise-induced ‘browning’ of adipose tissues. *Metabolism* 81, 63–70.

Alemzadeh, R., Kichler, J., Babar, G., and Calhoun, M. (2008). Hypovitaminosis D in obese children and adolescents: relationship with adiposity, insulin sensitivity, ethnicity, and season. *Metabolism* 57, 183–191.

Alvarez, J.A., and Ashraf, A. (2010). Role of Vitamin D in Insulin Secretion and Insulin Sensitivity for Glucose Homeostasis. *Int. J. Endocrinol.* 2010, 1–18.

Andrade-Oliveira, V., Câmara, N.O.S., and Moraes-Vieira, P.M. (2015). Adipokines as Drug Targets in Diabetes and Underlying Disturbances. *J. Diabetes Res.* Vol. 2015. Article ID 681612, 1 - 11.

Apostolopoulos, V., Courten, M.P.J. de, Stojanovska, L., Blatch, G.L., Tangalakis, K., and Courten, B. de (2016). The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 43–57.

Arterburn, D.E., Telem, D.A., Kushner, R.F., and Courcoulas, A.P. (2020). Benefits and Risks of Bariatric Surgery in Adults: A Review. *JAMA* 324, 879–887.

Audran, M., and Briot, K. (2010). Critical reappraisal of vitamin D deficiency. *Joint Bone Spine* 77, 115–119.

Azzu, V., Vacca, M., Virtue, S., Allison, M., and Vidal-Puig, A. (2020). Adipose

Tissue-Liver Cross Talk in the Control of Whole-Body Metabolism: Implications in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 158, 1899–1912.

~ B ~

Bai, Y., and Sun, Q. (2015). Macrophage recruitment in obese adipose tissue. *Obes. Rev.* 16, 127–136.

Bal, B.S., Finelli, F.C., Shope, T.R., and Koch, T.R. (2012). Nutritional deficiencies after bariatric surgery. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 544–556.

Ballinger, A., and Peikin, S.R. (2002). Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. *Eur. J. Pharmacol.* 440, 109–117.

Bansal, A.B., and Al Khalili, Y. (2020). Orlistat. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Barchetta, I., Angelico, F., Ben, M.D., Baroni, M.G., Pozzilli, P., Morini, S., and Cavallo, M.G. (2011). Strong association between non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. *BMC Med.* 9, 85.

Barchetta, I., Del Ben, M., Angelico, F., Di Martino, M., Fraioli, A., La Torre, G., Saule, R., Perri, L., Morini, S., Tiberti, C., et al. (2016). No effects of oral vitamin D supplementation on non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Med.* 14, 92.

Barchetta, I., Cimini, F.A., and Cavallo, M.G. (2017). Vitamin D Supplementation and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Present and Future. *Nutrients* 9, 1015.

Baron David, M., Clerte, M., Brouckaert, P., Raheer Michael, J., Flynn Aidan, F.A., Zhang, H., Carter Edward, A., Picard Michael, H., Bloch Kenneth, D., Buys Emmanuel, S., et al. (2012). In Vivo Noninvasive Characterization of Brown Adipose Tissue Blood Flow by Contrast Ultrasound in Mice. *Circ. Cardiovasc. Imaging* 5, 652–659.

Bartelt, A., and Heeren, J. (2013). Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, nrendo.2013.204.

Bastard, J.-P., and Fève, B. (2012). *Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue* (Springer Science & Business Media).

Battault, S., Whiting, S.J., Peltier, S.L., Sadrin, S., Gerber, G., and Maixent, J.M.

(2013). Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *Eur. J. Nutr.* 52, 429–441.

Beckman, L.M., Earthman, C.P., Thomas, W., Compher, C.W., Muniz, J., Horst, R.L., Ikramuddin, S., Kellogg, T.A., and Sibley, S.D. (2013). Serum 25(OH) Vitamin D Concentration Changes After Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery. *Obesity* 21, E599–E606.

Bell, L.M., Watts, K., Siafarikas, A., Thompson, A., Ratnam, N., Bulsara, M., Finn, J., O'Driscoll, G., Green, D.J., Jones, T.W., et al. (2007). Exercise Alone Reduces Insulin Resistance in Obese Children Independently of Changes in Body Composition. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 4230–4235.

Benaich, S., Mehdad, S., Andaloussi, Z., Boutayeb, S., Alamy, M., Aguenou, H., and Taghzouti, K. (2020). Weight status, dietary habits, physical activity, screen time and sleep duration among university students. *Nutr. Health* 0260106020960863.

Biddle, S.J.H., Bengoechea García, E., Pedisic, Z., Bennie, J., Vergeer, I., and Wiesner, G. (2017). Screen Time, Other Sedentary Behaviours, and Obesity Risk in Adults: A Review of Reviews. *Curr. Obes. Rep.* 6, 134–147.

Bikle, D., Bouillon, R., Thadhani, R., and Schoenmakers, I. (2017). Vitamin D metabolites in captivity? Should we measure free or total 25(OH)D to assess vitamin D status? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 173, 105–116.

Bikle, D.D., Gee, E., Halloran, B., Kowalski, M.A., Ryzen, E., and Haddad, J.G. (1986). Assessment of the Free Fraction of 25-Hydroxyvitamin D in Serum and Its Regulation by Albumin and the Vitamin D-Binding Protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63, 954–959.

Billat, L.V. (2001). Interval Training for Performance: A Scientific and Empirical Practice. *Sports Med.* 31, 13–31.

Bonet, M.L., Oliver, P., and Palou, A. (2013). Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1831, 969–985.

Bonnet, L., Karkeni, E., Couturier, C., Astier, J., Dalifard, J., Defoort, C., Svilar, L., Martin, J.-C., Tourniaire, F., and Landrier, J.-F. (2018). Gene Expression Pattern in Response to Cholecalciferol Supplementation Highlights Cubilin as a Major Protein of

25(OH)D Uptake in Adipocytes and Male Mice White Adipose Tissue. *Endocrinology* 159, 957–966.

Bonnet, L., Hachemi, M.A., Karkeni, E., Couturier, C., Astier, J., Defoort, C., Svilar, L., Martin, J.-C., Tourniaire, F., and Landrier, J.-F. (2019a). Diet induced obesity modifies vitamin D metabolism and adipose tissue storage in mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 185, 39–46.

Bonnet, L., Margier, M., Svilar, L., Couturier, C., Reboul, E., Martin, J.-C., Landrier, J.-F., and Defoort, C. (2019b). Simple Fast Quantification of Cholecalciferol, 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D in Adipose Tissue Using LC-HRMS/MS. *Nutrients* 11, 1977.

Bonnet, L., Karkeni, E., Couturier, C., Astier, J., Defoort, C., Svilar, L., Tourniaire, F., Mounien, L., and Landrier, J.F. (2020). 4-days high fat diet modulates vitamin D metabolites levels and enzymes in mice. *J. Endocrinol.* 1.

Bouchard, D.R., Soucy, L., Sénéchal, M., Dionne, I.J., and Brochu, M. (2009). Impact of resistance training with or without caloric restriction on physical capacity in obese older women. *Menopause* 16, 66–72.

Bouillon, R. (2016). Free or Total 25OHD as Marker for Vitamin D Status? *J. Bone Miner. Res.* 31, 1124–1127.

Bouillon, R. (2017). Comparative analysis of nutritional guidelines for vitamin D. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 466–479.

Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H.F., Lieben, L., Mathieu, C., and Demay, M. (2008). Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. *Endocr. Rev.* 29, 726–776.

Britton, K.A., and Fox, C.. (2011). Ectopic Fat Depots and Cardiovascular Disease. *Circulation* 124, e837–e841.

~ C ~

Cade, C., and Norman, A.W. (1987). Rapid Normalization/Stimulation by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ of Insulin Secretion and Glucose Tolerance in the Vitamin D-Deficient Rat. *Endocrinology* 120, 1490–1497.

Calder, P.C., Ahluwalia, N., Brouns, F., Buetler, T., Clement, K., Cunningham, K.,

Esposito, K., Jönsson, L.S., Kolb, H., Lansink, M., et al. (2011). Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br. J. Nutr.* 106, S1–S78.

Capeau, J. (2003). Voies de signalisation de l'insuline : mécanismes affectés dans l'insulino-résistance. *Médecine/Sciences* 19, 834–839.

Capel F., Rieusset J., Morio B. (2013). Lipotoxicité hépatique au cours du diabète. Rôle des dysfonctions mitochondriales. *Diabète et Obésité*. Février 2013. Vol 8. 66.

Casanueva, F.F., Castellana, M., Bellido, D., Trimboli, P., Castro, A.I., Sajoux, I., Rodriguez-Carnero, G., Gomez-Arbelaez, D., Crujeiras, A.B., and Martinez-Olmos, M.A. (2020). Ketogenic diets as treatment of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 21, 381–397.

Ceylan-Isık, A., Hünkar, T., Aşan, E., Kaymaz, F., Arı, N., Söylemezoğlu, T., Renda, N., Soncul, H., Bali, M., and Karasu, Ç. (2007). Cod liver oil supplementation improves cardiovascular and metabolic abnormalities in streptozotocin diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 1629–1641.

Chagas, C.E.A., Borges, M.C., Martini, L.A., and Rogero, M.M. (2012). Focus on Vitamin D, Inflammation and Type 2 Diabetes. *Nutrients* 4, 52–67.

Chanet, A., Salles, J., Guillet, C., Giraudet, C., Berry, A., Patrac, V., Domingues-Faria, C., Tagliaferri, C., Bouton, K., Bertrand-Michel, J., et al. (2017). Vitamin D supplementation restores the blunted muscle protein synthesis response in deficient old rats through an impact on ectopic fat deposition. *J. Nutr. Biochem.* 46, 30–38.

Cheng, S., Massaro, J.M., Fox, C.S., Larson, M.G., Keyes, M.J., McCabe, E.L., Robins, S.J., O'Donnell, C.J., Hoffmann, U., Jacques, P.F., et al. (2010). Adiposity, Cardiometabolic Risk, and Vitamin D Status: The Framingham Heart Study. *Diabetes* 59, 242–248.

Cheng, Z. (2020). *Nutritional Signaling Pathway Activities in Obesity and Diabetes* (Royal Society of Chemistry).

Chin, K., Zhao, D., Tibuakuu, M., Martin, S.S., Ndumele, C.E., Florido, R., Windham, B.G., Guallar, E., Lutsey, P.L., and Michos, E.D. (2017). Physical Activity, Vitamin D, and Incident Atherosclerotic Cardiovascular Disease in Whites and Blacks: The ARIC Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 102, 1227–1236.

Chin, S.-H., Kahathuduwa, C.N., and Binks, M. (2016). Physical activity and

obesity: what we know and what we need to know*. *Obes. Rev.* 17, 1226–1244.

Ching, S., Kashinkunti, S., Niehaus, M.D., and Zinser, G.M. (2011). Mammary adipocytes bioactivate 25-hydroxyvitamin D3 and signal via vitamin D3 receptor, modulating mammary epithelial cell growth. *J. Cell. Biochem.* 112, 3393–3405.

Chiu, K.C., Chu, A., Go, V.L.W., and Saad, M.F. (2004). Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and β cell dysfunction. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 820–825.

Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., and Carmeliet, G. (2015). Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol. Rev.* 96, 365–408.

Chylikova, J., Dvorackova, J., Tauber, Z., and Kamarad, V. (2018). M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. *Biomed. Pap.* 162, 79–82.

Cimini, F.A., Barchetta, I., Carotti, S., Bertocchini, L., Baroni, M.G., Vespasiani-Gentilucci, U., Cavallo, M.-G., and Morini, S. (2017). Relationship between adipose tissue dysfunction, vitamin D deficiency and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 23, 3407–3417.

Cinti, S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 297, E977–E986.

Cohen, P., and Spiegelman, B.M. (2016). Cell biology of fat storage. *Mol. Biol. Cell* 27, 2523–2527.

Crovesy, L., Masterson, D., and Rosado, E.L. (2020). Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. *Eur. J. Clin. Nutr.* 74, 1251–1262.

Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.-H., Doria, A., et al. (2009). Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N. Engl. J. Med.* 360, 1509–1517.

~ D ~

Damms-Machado, A., Weser, G., and Bischoff, S.C. (2012). Micronutrient deficiency in obese subjects undergoing low calorie diet. *Nutr. J.* 11, 34.

Deanfield John E., Halcox Julian P., and Rabelink Ton J. (2007). Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation* 115, 1285–1295.

Depiesse, F., Grillon, J.-L., and Coste, O. (2016). *Prescriptions des Activités Physiques: En Prévention et en Thérapeutique* (Elsevier Health Sciences).

Després, J.-P., and Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* *444*, 881–887.

Ding, C., Gao, D., Wilding, J., Trayhurn, P., and Bing, C. (2012). Vitamin D signalling in adipose tissue. *Br. J. Nutr.* *108*, 1915–1923.

Donnelly, J.E., Blair, S.N., Jakicic, J.M., Manore, M.M., Rankin, J.W., and Smith, B.K. (2009). Appropriate Physical Activity Intervention Strategies for Weight Loss and Prevention of Weight Regain for Adults: *Med. Sci. Sports Exerc.* *41*, 459–471.

Dowman, J.K., Tomlinson, J.W., and Newsome, P.N. (2010). Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM Int. J. Med.* *103*, 71–83.

Dragano, N.R.V., Fernø, J., Diéguez, C., López, M., and Milbank, E. (2020). Reprint of: Recent Updates on Obesity Treatments: Available Drugs and Future Directions. *Neuroscience* *447*, 191–215.

Drincic, A.T., Armas, L.A.G., Diest, E.E. van, and Heaney, R.P. (2012). Volumetric Dilution, Rather Than Sequestration Best Explains the Low Vitamin D Status of Obesity. *Obesity* *20*, 1444–1448.

Dusso, A.S., Brown, A.J., and Slatopolsky, E. (2005). Vitamin D. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* *289*, F8–F28.

Dutheil, F., Lac, G., Lesourd, B., Chapier, R., Walther, G., Vinet, A., Sapin, V., Verney, J., Ouchchane, L., Duclos, M., et al. (2013). Different modalities of exercise to reduce visceral fat mass and cardiovascular risk in metabolic syndrome: the RESOLVE* randomized trial. *Int. J. Cardiol.* *168*, 3634–3642.

~ E ~

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2016). Dietary reference values for vitamin D. *EFSA J.* *14*, e04547.

Eliades, M., Spyrou, E., Agrawal, N., Lazo, M., Brancati, F.L., Potter, J.J., Koteish, A.A., Clark, J.M., Guallar, E., and Hernaez, R. (2013). Meta-analysis: vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *38*, 246–254.

Elseweidy, M.M., Amin, R.S., Atteia, H.H., and Ali, M.A. (2017). Vitamin D3 intake

as regulator of insulin degrading enzyme and insulin receptor phosphorylation in diabetic rats. *Biomed. Pharmacother.* 85, 155–159.

~ F ~

Fang, J., and Tang, M. (2017). Exercise improves high fat diet-impaired vascular function. *Biomed. Rep.* 7, 337–342.

Farag, H.A.M., Hosseinzadeh-Attar, M.J., Muhammad, B.A., Esmailzadeh, A., and Bilbeisi, A.H.E. (2018). Comparative effects of vitamin D and vitamin C supplementations with and without endurance physical activity on metabolic syndrome patients: a randomized controlled trial. *Diabetol. Metab. Syndr.* 10, 80.

Farhangi, M.A., Mesgari-Abbasi, M., Hajiluian, G., Nameni, G., and Shahabi, P. (2017). Adipose Tissue Inflammation and Oxidative Stress: the Ameliorative Effects of Vitamin D. *Inflammation* 40, 1688–1697.

Ferrara, D., Montecucco, F., Dallegri, F., and Carbone, F. (2019). Impact of different ectopic fat depots on cardiovascular and metabolic diseases. *J. Cell. Physiol.* 234, 21630–21641.

Ferrari, N., Schmitz, L., Schmidt, N., Mahabir, E., Van de Vondel, P., Merz, W.M., Lehmacher, W., Stock, S., Brockmeier, K., Ensenauer, R., et al. (2020). A lifestyle intervention during pregnancy to reduce obesity in early childhood: the study protocol of ADEBAR – a randomized controlled trial. *BMC Sports Sci. Med. Rehabil.* 12, 55.

Fisher, G., Brown, A.W., Brown, M.M.B., Alcorn, A., Noles, C., Winwood, L., Resuehr, H., George, B., Jeansonne, M.M., and Allison, D.B. (2015). High Intensity Interval- vs Moderate Intensity- Training for Improving Cardiometabolic Health in Overweight or Obese Males: A Randomized Controlled Trial. *PLOS ONE* 10, e0138853.

Fraulob, J.C., Ogg-Diamantino, R., Fernandes-Santos, C., Aguila, M.B., and Mandarim-de-Lacerda, C.A. (2010). A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 212–223.

Fu, B., Wang, H., Wang, J., Barouhas, I., Liu, W., Shuboy, A., Bushinsky, D.A., Zhou, D., and Favus, M.J. (2013). Epigenetic Regulation of BMP2 by 1,25-dihydroxyvitamin D3 through DNA Methylation and Histone Modification. *PLoS ONE* 8, e61423.

~ G ~

Gabel, K., and Varady, K.A. (2020). Current research: effect of time restricted eating on weight and cardiometabolic health. *J. Physiol.*

Gaborit, B., Abdesselam, I., and Dutour, A. (2013). Epicardial fat: more than just an “epi” phenomenon. *Horm Metab Res* 45, 991–1001.

Gallagher, J.C., Yalamanchili, V., and Smith, L.M. (2013). The effect of vitamin D supplementation on serum 25OHD in thin and obese women. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 136, 195–200.

Gao, Y.-J. (2007). Dual modulation of vascular function by perivascular adipose tissue and its potential correlation with adiposity/lipoatrophy-related vascular dysfunction. *Curr. Pharm. Des.* 13, 2185–2192.

Gao, D., Trayhurn, P., and Bing, C. (2013). 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits the cytokine-induced secretion of MCP-1 and reduces monocyte recruitment by human preadipocytes. *Int. J. Obes.* 2005 37, 357–365.

Gao, Z., Hwang, D., Bataille, F., Lefevre, M., York, D., Quon, M.J., and Ye, J. (2002). Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 by Inhibitor κ B Kinase Complex. *J. Biol. Chem.* 277, 48115–48121.

García, O.P., Long, K.Z., and Rosado, J.L. (2009). Impact of micronutrient deficiencies on obesity. *Nutr. Rev.* 67, 559–572.

Garcia, M., Seelaender, M., Sotiropoulos, A., Coletti, D., and Lancha, A.H. (2019). Vitamin D, muscle recovery, sarcopenia, cachexia, and muscle atrophy. *Nutrition* 60, 66–69.

García-Hermoso, A., Izquierdo, M., Alonso-Martínez, A.M., Faigenbaum, A., Olloquequi, J., and Ramírez-Vélez, R. (2020). Association between Exercise-Induced Changes in Cardiorespiratory Fitness and Adiposity among Overweight and Obese Youth: A Meta-Analysis and Meta-Regression Analysis. *Children* 7, 147.

Gastaldelli, A., Gaggini, M., and DeFronzo, R.A. (2017). Role of Adipose Tissue Insulin Resistance in the Natural History of Type 2 Diabetes: Results From the San Antonio Metabolism Study. *Diabetes* 66, 815–822.

Gehrke, N., Biedenbach, J., Huber, Y., Straub, B.K., Galle, P.R., Simon, P., and Schattenberg, J.M. (2019). Voluntary exercise in mice fed an obesogenic diet alters the hepatic immune phenotype and improves metabolic parameters – an animal model of life style intervention in NAFLD. *Sci. Rep.* 9, 1–13.

Giblin, R.J., Bennett, E.J., Zosky, G.R., and Dwyer, R.M. (2017). The Impact of Sex and 25(OH)D Deficiency on Metabolic Function in Mice. *Nutrients* 9, 985.

Girgis, C.M., Clifton-Bligh, R.J., Hamrick, M.W., Holick, M.F., and Gunton, J.E. (2013). The Roles of Vitamin D in Skeletal Muscle: Form, Function, and Metabolism. *Endocr. Rev.* 34, 33–83.

Gollisch, K.S.C., Brandauer, J., Jessen, N., Toyoda, T., Nayer, A., Hirshman, M.F., and Goodyear, L.J. (2009). Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 297, E495–E504.

Goossens, G.H. (2017). The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obes. Facts* 10, 207–215.

Graf, C., and Ferrari, N. (2019). Metabolic Health—The Role of Adipo-Myokines. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 6159.

Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 415–445.

Greulich, S., Maxhera, B., Vandenplas, G., de Wiza Daniella, H., Smiris, K., Mueller, H., Heinrichs, J., Blumensatt, M., Cuvelier, C., Akhyari, P., et al. (2012). Secretory Products From Epicardial Adipose Tissue of Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Induce Cardiomyocyte Dysfunction. *Circulation* 126, 2324–2334.

~ H ~

Haddad, J.G., Fraser, D.R., and Lawson, D.E. (1981). Vitamin D plasma binding protein. Turnover and fate in the rabbit. *J. Clin. Invest.* 67, 1550–1560.

Han, M.S., Jung, D.Y., Morel, C., Lakhani, S.A., Kim, J.K., Flavell, R.A., and Davis,

R.J. (2012). JNK Expression by Macrophages Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance and Inflammation. *Science* 339, 218–222.

Hanafy, A.S., and Elkatawy, H.A. (2018). Beneficial Effects of Vitamin D on Insulin Sensitivity, Blood Pressure, Abdominal Subcutaneous Fat Thickness, and Weight Loss in Refractory Obesity. *Clin. Diabetes Publ. Am. Diabetes Assoc.* 36, 217–225.

Hargreaves, M., and Richter, E. (1988). Regulation of skeletal muscle glycogenolysis during exercise. *Can. J. Sport Sci. J. Can. Sci. Sport* 13, 197–203.

Heaney, R.P., Horst, R.L., Cullen, D.M., and Armas, L.A.G. (2009). Vitamin D 3 Distribution and Status in the Body. *J. Am. Coll. Nutr.* 28, 252–256.

Heneghan, H.M., Miller, N., McAnena, O.J., O'Brien, T., and Kerin, M.J. (2011). Differential miRNA Expression in Omental Adipose Tissue and in the Circulation of Obese Patients Identifies Novel Metabolic Biomarkers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E846–E850.

Herrera, B.M., and Lindgren, C.M. (2010). The Genetics of Obesity. *Curr. Diab. Rep.* 10, 498–505.

Heydari, M., Freund, J., and Boutcher, S.H. (2012). The Effect of High-Intensity Intermittent Exercise on Body Composition of Overweight Young Males. *J. Obes.* 2012.

Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333–336.

Holecki, M., Zahorska-Markiewicz, B., Więcek, A., Mizia-Stec, K., Nieszporek, T., and Żak-Gołąb, A. (2008). Influence of Calcium and Vitamin D Supplementation on Weight and Fat Loss in Obese Women. *Obes. Facts* 1, 274–279.

Holick, M.F. (2007). Vitamin D Deficiency. *N. Engl. J. Med.* 357, 266–281.

Holmbäck, U., Forslund, A., Grudén, S., Alderborn, G., Söderhäll, A., Hellström, P.M., and Lennernäs, H. (2020). Effects of a novel combination of orlistat and acarbose on tolerability, appetite, and glucose metabolism in persons with obesity. *Obes. Sci. Pract.* 6, 313–323.

Hong, H.-R., Jeong, J.-O., Kong, J.-Y., Lee, S.-H., Yang, S.-H., Ha, C.-D., and Kang, H.-S. (2014). Effect of walking exercise on abdominal fat, insulin resistance and

serum cytokines in obese women. *J. Exerc. Nutr. Biochem.* 18, 277–285.

Horowitz, J.F., and Klein, S. (2000). Lipid metabolism during endurance exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 558S–563S.

Hoseini, Z., Behpour, N., and Hoseini, R. (2020). Co-treatment with Vitamin D Supplementation and Aerobic Training in Elderly Women with Vit D Deficiency and NAFLD: A Single-blind Controlled Trial. *Hepat. Mon.* 20.

Hoseini, R., Damirchi, A., and Babaei, P. (2017). Vitamin D increases PPAR γ expression and promotes beneficial effects of physical activity in metabolic syndrome. *Nutrition* 36, 54–59.

Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., and Spiegelman, B.M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 95, 2409–2415.

von Hurst, P.R., Stonehouse, W., and Coad, J. (2010). Vitamin D supplementation reduces insulin resistance in South Asian women living in New Zealand who are insulin resistant and vitamin D deficient – a randomised, placebo-controlled trial. *Br. J. Nutr.* 103, 549–555.

~ | ~

Ikeda, K., Maretich, P., and Kajimura, S. (2018). The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends Endocrinol. Metab.* 29, 191–200.

Inserm (2019). *Activité physique : Prévention et traitement des maladies chroniques.*

International Diabetes Federation (2019). *IDF Diabetes Atlas.* Available at: <http://diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>.

Irving, B.A., Davis, C.K., Brock, D.W., Weltman, J.Y., Swift, D., Barrett, E.J., Gaesser, G.A., and Weltman, A. (2008). Effect of exercise training intensity on abdominal visceral fat and body composition. *Med. Sci. Sports Exerc.* 40, 1863–1872.

Ismail, I., Keating, S.E., Baker, M.K., and Johnson, N.A. (2012). A systematic review and meta-analysis of the effect of aerobic vs. resistance exercise training on visceral fat. *Obes. Rev.* 13, 68–91.

~ J ~

Jahn, D., Dorbath, D., Kircher, S., Nier, A., Bergheim, I., Lenaerts, K., Hermanns, H.M., and Geier, A. (2019). Beneficial Effects of Vitamin D Treatment in an Obese Mouse Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Nutrients* 11, 77.

Jeon, S.-M., and Shin, E.-A. (2018). Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp. Mol. Med.* 50, 1–14.

Jornayvaz, F.R., and Shulman, G.I. (2012). Diacylglycerol Activation of Protein Kinase C ϵ and Hepatic Insulin Resistance. *Cell Metab.* 15, 574–584.

Jun, S., Cowan, A.E., Bhadra, A., Dodd, K.W., Dwyer, J.T., Eicher-Miller, H.A., Gahche, J., Guenther, P.M., Potischman, N., Tooze, J.A., et al. (2020). Older adults with obesity have higher risks of some micronutrient inadequacies and lower overall dietary quality compared to peers with a healthy weight. *Public Health Nutr.* 23, 2268–2279.

~ K ~

Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N., Ohtsuka-Kowatari, N., Kumagai, K., Sakamoto, K., Kobayashi, M., et al. (2006). Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Adipose Tissues Causes Macrophage Recruitment and Insulin Resistance. *J. Biol. Chem.* 281, 26602–26614.

Kamei, Y., Kawada, T., Kazuki, R., Ono, T., Kato, S., and Sugimoto, E. (1993). Vitamin D Receptor Gene Expression Is Up-Regulated by 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ in 3T3-L1 Preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 948–955.

Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., et al. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* 116, 1494–1505.

Karatayli, E., Stokes, C.S., and Lammert, F. (2020). Vitamin D in Preclinical Models of Fatty Liver Disease. *Anticancer Res.* 40, 527–534.

Karkeni, E., Marcotorchino, J., Tourniaire, F., Astier, J., Peiretti, F., Darmon, P., and Landrier, J.-F. (2015a). Vitamin D Limits Chemokine Expression in Adipocytes and Macrophage Migration In Vitro and in Male Mice. *Endocrinology* 156, 1782–1793.

Karkeni, E., Marcotorchino, J., Tourniaire, F., Astier, J., Peiretti, F., Darmon, P., and Landrier, J.-F. (2015b). Vitamin D Limits Chemokine Expression in Adipocytes and Macrophage Migration In Vitro and in Male Mice. *Endocrinology* 156, 1782–1793.

Karkeni, E., Bonnet, L., Marcotorchino, J., Tourniaire, F., Astier, J., Ye, J., and Landrier, J.-F. (2018). Vitamin D limits inflammation-linked microRNA expression in adipocytes in vitro and in vivo: A new mechanism for the regulation of inflammation by vitamin D. *Epigenetics* 13, 156–162.

Karlic, H., and Varga, F. (2011). Impact of vitamin D metabolism on clinical epigenetics. *Clin. Epigenetics* 2, 55–61.

Kawanishi, N., Yano, H., Mizokami, T., Takahashi, M., Oyanagi, E., and Suzuki, K. (2012). Exercise training attenuates hepatic inflammation, fibrosis and macrophage infiltration during diet induced-obesity in mice. *Brain. Behav. Immun.* 26, 931–941.

Kawashima, H., and Castro, A. (1981). Effect of 1 alpha-hydroxyvitamin D3 on the glucose and calcium metabolism in genetic obese mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 33, 155–161.

Keller, P., Gburcik, V., Petrovic, N., Gallagher, I.J., Nedergaard, J., Cannon, B., and Timmons, J.A. (2011). Gene-chip studies of adipogenesis-regulated microRNAs in mouse primary adipocytes and human obesity. *BMC Endocr. Disord.* 11, 7.

Kessler, K., and Pivovarova-Ramich, O. (2019). Meal Timing, Aging, and Metabolic Health. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1911.

Khosravi, Z.S., Kafeshani, M., Tavasoli, P., Zadeh, A.H., and Entezari, M.H. (2018). Effect of Vitamin D Supplementation on Weight Loss, Glycemic Indices, and Lipid Profile in Obese and Overweight Women: A Clinical Trial Study. *Int. J. Prev. Med.* 9.

Kim, J.K., Kim, Y.-J., Fillmore, J.J., Chen, Y., Moore, I., Lee, J., Yuan, M., Li, Z.W., Karin, M., Perret, P., et al. (2001). Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J. Clin. Invest.* 108, 437–446.

Kitson, M.T., Pham, A., Gordon, A., Kemp, W., and Roberts, S.K. (2016). High-dose vitamin D supplementation and liver histology in NASH. *Gut* 65, 717–718.

Klötting, N., and Blüher, M. (2014). Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 15, 277–287.

Klötting, N., Berthold, S., Kovacs, P., Schön, M.R., Fasshauer, M., Ruschke, K.,

Stumvoll, M., and Blüher, M. (2009). MicroRNA Expression in Human Omental and Subcutaneous Adipose Tissue. *PLoS ONE* 4.

Koo, S.-H. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin. Mol. Hepatol.* 19, 210–215.

Koochakpoor, G., Daneshpour, M.S., Mirmiran, P., Hosseini, S.A., Hosseini-Esfahani, F., Sedaghatkhayat, B., and Azizi, F. (2016). The effect of interaction between Melanocortin-4 receptor polymorphism and dietary factors on the risk of metabolic syndrome. *Nutr. Metab.* 13, 35.

Kuhn, E., Binart, N., and Lombès, M. (2012). Brun, blanc, beige: la couleur du gras et nouvelles perspectives thérapeutiques de l'obésité.... In *Annales d'endocrinologie*, (Elsevier), pp. S2–S8.

~ L ~

Lafontan, M., and Berlan, M. (2003). Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 276–283.

Landrier, J.-F. (2014). Vitamine D : sources, métabolisme et mécanismes d'action. *OCL* 21, D302.

Landrier, J.-F., Marcotorchino, J., and Tourniaire, F. (2012). Lipophilic Micronutrients and Adipose Tissue Biology. *Nutrients* 4, 1622–1649.

Landrier, J.-F., Karkeni, E., Marcotorchino, J., Bonnet, L., and Tourniaire, F. (2016). Vitamin D modulates adipose tissue biology: possible consequences for obesity? *Proc. Nutr. Soc.* 75, 38–46.

Landrier, J.-F., Mounien, L., and Tourniaire, F. (2019a). Obesity and Vitamin D Metabolism Modifications. *J. Bone Miner. Res.* 34, 1383–1383.

Landrier, J.-F., Derghal, A., and Mounien, L. (2019b). MicroRNAs in Obesity and Related Metabolic Disorders. *Cells* 8, 859.

Laster, J., and Frame, L.A. (2019). Beyond the Calories—Is the Problem in the Processing? *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* 17, 577–586.

Laufs Ulrich, Werner Nikos, Link Andreas, Endres Matthias, Wassmann Sven, Jürgens Kristina, Miche Eckart, Böhm Michael, and Nickenig Georg (2004). Physical Training Increases Endothelial Progenitor Cells, Inhibits Neointima Formation, and

Enhances Angiogenesis. *Circulation* 109, 220–226.

Laufs Ulrich, Wassmann Sven, Czech Thomas, Münzel Thomas, Eisenhauer Marco, Böhm Michael, and Nickenig Georg (2005). Physical Inactivity Increases Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction, and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 809–814.

Lavie, C., Ortega, F., and Kokkinos, P. (2018). Impact of Physical Activity and Fitness in Metabolically Healthy Obesity. *J. Am. Coll. Cardiol.* 71, 812–813.

Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., et al. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500, 541–546.

Lee, S., Bacha, F., Hannon, T., Kuk, J.L., Boesch, C., and Arslanian, S. (2012). Effects of Aerobic Versus Resistance Exercise Without Caloric Restriction on Abdominal Fat, Intrahepatic Lipid, and Insulin Sensitivity in Obese Adolescent Boys: A Randomized, Controlled Trial. *Diabetes* 61, 2787–2795.

Lee, Y.-H., Mottillo, E.P., and Granneman, J.G. (2014). Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1842, 358–369.

Lehmann, B., and Meurer, M. (2010). Vitamin D metabolism. *Dermatol. Ther.* 23, 2–12.

Lemieux, P., Weisnagel, S.J., Caron, A.Z., Julien, A.-S., Morisset, A.-S., Carreau, A.-M., Poirier, J., Tchernof, A., Robitaille, J., Bergeron, J., et al. (2019). Effects of 6-month vitamin D supplementation on insulin sensitivity and secretion: a randomised, placebo-controlled trial. *Eur. J. Endocrinol.* 181, 287–299.

Levin, B.E., and Govek, E. (1998). Gestational obesity accentuates obesity in obesity-prone progeny. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275, R1374–R1379.

Li, J., Byrne, M.E., Chang, E., Jiang, Y., Donkin, S.S., Buhman, K.K., Burgess, J.R., and Teegarden, D. (2008). $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D hydroxylase in adipocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 112, 122–126.

Lisse, T.S., Adams, J.S., and Hewison, M. (2013). Vitamin D and microRNAs in bone. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 23.

Liu, S., Liu, Y., Wan, B., Zhang, H., Wu, S., Zhu, Z., Lin, Y., Wang, M., Zhang, N., Lin, S., et al. (2019). Association between Vitamin D Status and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based Study. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 65, 303–308.

Liu, X., Cervantes, C., and Liu, F. (2017). Common and distinct regulation of human and mouse brown and beige adipose tissues: a promising therapeutic target for obesity. *Protein Cell* 8, 446–454.

Lorente-Cebrián, S., Eriksson, A., Dunlop, T., Mejhert, N., Dahlman, I., Åström, G., Sjölin, E., Wåhlén, K., Carlberg, C., Laurencikiene, J., et al. (2012). Differential effects of 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol on MCP-1 and adiponectin production in human white adipocytes. *Eur. J. Nutr.* 51, 335–342.

Lorvand Amiri, H., Agah, S., Mousavi, S.N., Hosseini, A.F., and Shidfar, F. (2016). Regression of Non-Alcoholic Fatty Liver by Vitamin D Supplement: A Double-Blind Randomized Controlled Clinical Trial. *Arch. Iran. Med.* 19, 0–0.

Lorvand Amiri, H., Agah, S., Tolouei Azar, J., Hosseini, S., Shidfar, F., and Mousavi, S.N. (2017). Effect of daily calcitriol supplementation with and without calcium on disease regression in non-alcoholic fatty liver patients following an energy-restricted diet: Randomized, controlled, double-blind trial. *Clin. Nutr.* 36, 1490–1497.

Loustau, T., Coudiere, E., Karkeni, E., Landrier, J.-F., Jover, B., and Riva, C. (2020). Murine double minute-2 mediates exercise-induced angiogenesis in adipose tissue of diet-induced obese mice. *Microvasc. Res.* 130, 104003.

Lutz, T.A. (2018). Considering our methods: Methodological issues with rodent models of appetite and obesity research. *Physiol. Behav.* 192, 182–187.

Lwow, F., and Bohdanowicz-Pawlak, A. (2020). Vitamin D and selected cytokine concentrations in postmenopausal women in relation to metabolic disorders and physical activity. *Exp. Gerontol.* 141, 111107.

~ M ~

MacLaughlin, J., and Holick, M.F. (1985). Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D₃. *J. Clin. Invest.* 76, 1536–1538.

Mai, S., Walker, G.E., Vietti, R., Cattaldo, S., Mele, C., Priano, L., Mauro, A., Bona, G., Aimaretti, G., Scacchi, M., et al. (2017). Acute Vitamin D₃ Supplementation in

Severe Obesity: Evaluation of Multimeric Adiponectin. *Nutrients* 9, 459.

Maia-Ceciliano, T.C., Dutra, R.R., Aguila, M.B., and Mandarim-De-Lacerda, C.A. (2019). The deficiency and the supplementation of vitamin D and liver: Lessons of chronic fructose-rich diet in mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 192, 105399.

Maillard, F., Pereira, B., and Boisseau, N. (2018). Effect of High-Intensity Interval Training on Total, Abdominal and Visceral Fat Mass: A Meta-Analysis. *Sports Med.* 48, 269–288.

Manfredi, L.H. (2020). Overheating or overcooling: heat transfer in the spot to fight against the pandemic obesity. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*

Manna, P., and Jain, S.K. (2012). Vitamin D Up-regulates Glucose Transporter 4 (GLUT4) Translocation and Glucose Utilization Mediated by Cystathionine- γ -lyase (CSE) Activation and H₂S Formation in 3T3L1 Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 287, 42324–42332.

Manna, P., Achari, A.E., and Jain, S.K. (2018). 1,25(OH)₂-vitamin D₃ upregulates glucose uptake mediated by SIRT1/IRS1/GLUT4 signaling cascade in C2C12 myotubes. *Mol. Cell. Biochem.* 444, 103–108.

Marcotorchino, J., Gouranton, E., Romier, B., Tourniaire, F., Astier, J., Malezet, C., Amiot, M.-J., and Landrier, J.-F. (2012). Vitamin D reduces the inflammatory response and restores glucose uptake in adipocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 1771–1782.

Marcotorchino, J., Tourniaire, F., Astier, J., Karkeni, E., Canault, M., Amiot, M.-J., Bendahan, D., Bernard, M., Martin, J.-C., Giannesini, B., et al. (2014). Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. *J. Nutr. Biochem.* 25, 1077–1083.

van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M.A.F.L., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J.J. (2009). Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N. Engl. J. Med.* 360, 1500–1508.

Mason, C., Xiao, L., Imayama, I., Duggan, C., Wang, C.-Y., Korde, L., and McTiernan, A. (2014). Vitamin D₃ supplementation during weight loss: a double-blind randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 99, 1015–1025.

Matta, J., Zins, M., Feral-Pierssens, A.-L., Carette, C., Ozguler, A., Goldberg, M.,

and Czernichow, S. (2016). Prévalence du surpoids, de l'obésité et des facteurs de risque cardio-métaboliques dans la cohorte Constances. 640.

Merlin, J., Evans, B.A., Dehvari, N., Sato, M., Bengtsson, T., and Hutchinson, D.S. (2016). Could burning fat start with a brite spark? Pharmacological and nutritional ways to promote thermogenesis. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 18–42.

Meunier, L. (2008). Expositions solaires et vitamine D (*Annales de Dermatologie et de Venereologie*).

Milano, W., De Biasio, V., Di Munzio, W., Foggia, G., and Capasso, A. (2020). Obesity: the New Global Epidemic. Pharmacological Treatment, Opportunities and Limits for Personalized Therapy. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*.

Mills, P.J., Hong, S., Redwine, L., Carter, S.M., Chiu, A., Ziegler, M.G., Dimsdale, J.E., and Maisel, A.S. (2006). Physical fitness attenuates leukocyte-endothelial adhesion in response to acute exercise. *J. Appl. Physiol.* 101, 785–788.

Mirhosseini, N., Vatanparast, H., Mazidi, M., and Kimball, S.M. (2017). The Effect of Improved Serum 25-Hydroxyvitamin D Status on Glycemic Control in Diabetic Patients: A Meta-Analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 102, 3097–3110.

Miyamoto, L. (2018). AMPK as a Metabolic Intersection between Diet and Physical Exercise. *Yakugaku Zasshi* 138, 1291–1296.

Mohapatra, S., Gangadharan, K., and Pitchumoni, C.S. (2020). Malnutrition in obesity before and after bariatric surgery. *Dis. Mon.* 66, 100866.

Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., et al. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387, 903–908.

Morrissey, C. (2018). Programmes d'exercices physiques et supplémentation en vitamine D: effets métaboliques et vasculaires chez l'adolescent obèse. (Avignon), p.

Morró, M., Vilà, L., Franckhauser, S., Mallol, C., Elias, G., Ferré, T., Molas, M., Casana, E., Rodó, J., Pujol, A., et al. (2020). Vitamin D Receptor Overexpression in β -Cells Ameliorates Diabetes in Mice. *Diabetes* 69, 927–939.

Mutt, S.J., Karhu, T., Lehtonen, S., Lehenkari, P., Carlberg, C., Saarnio, J., Sebert, S., Hyppönen, E., Järvelin, M.-R., and Herzig, K.-H. (2012). Inhibition of cytokine

secretion from adipocytes by 1,25-dihydroxyvitamin D3 via the NF- κ B pathway. *FASEB J.* 26, 4400–4407.

~ N ~

Nagpal, J., Pande, J.N., and Bhartia, A. (2009). A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of the short-term effect of vitamin D3 supplementation on insulin sensitivity in apparently healthy, middle-aged, centrally obese men. *Diabet. Med.* 26, 19–27.

Nakano, T., Cheng, Y.-F., Lai, C.-Y., Hsu, L.-W., Chang, Y.-C., Deng, J.-Y., Huang, Y.-Z., Honda, H., Chen, K.-D., Wang, C.-C., et al. (2011). Impact of artificial sunlight therapy on the progress of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *J. Hepatol.* 55, 415–425.

NCEP (2001). Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*.

Nemere, I., Garbi, N., Hämmerling, G.J., and Khanal, R.C. (2010). Intestinal Cell Calcium Uptake and the Targeted Knockout of the 1,25D3-MARRS (Membrane-associated, Rapid Response Steroid-binding) Receptor/PDIA3/Erp57. *J. Biol. Chem.* 285, 31859–31866.

Nikooyeh, B., Neyestani, T.R., Farvid, M., Alavi-Majd, H., Houshiarrad, A., Kalayi, A., Shariatzadeh, N., Gharavi, A., Heravifard, S., Tayebinejad, N., et al. (2011). Daily consumption of vitamin D– or vitamin D + calcium–fortified yogurt drink improved glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 93, 764–771.

Nimitphong, H., Holick, M.F., Fried, S.K., and Lee, M.-J. (2012). 25-Hydroxyvitamin D3 and 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Promote the Differentiation of Human Subcutaneous Preadipocytes. *PLOS ONE* 7, e52171.

Nobecourt, E. (2008). Place du tissu adipeux dans la physiopathologie du diabète de type 2. *Ann. Endocrinol.* 68, 84–85.

Nobili, V., and Reif, S. (2015). Vitamin D and liver fibrosis: let's start soon before it's too late. *Gut* 64, 698–699.

Norman, A.W., Frankel, J.B., Heldt, A.M., and Grodsky, G.M. (1980). Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* 209, 823–825.

~ O ~

Oh, K.-J., Lee, D., Kim, W., Han, B., Lee, S., and Bae, K.-H. (2016). Metabolic Adaptation in Obesity and Type II Diabetes: Myokines, Adipokines and Hepatokines. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 8.

Ohkawara, K., Tanaka, S., Miyachi, M., Ishikawa-Takata, K., and Tabata, I. (2007). A dose–response relation between aerobic exercise and visceral fat reduction: systematic review of clinical trials. *Int. J. Obes.* 31, 1786–1797.

Okla, M., Kim, J., Koehler, K., and Chung, S. (2017). Dietary Factors Promoting Brown and Beige Fat Development and Thermogenesis¹². *Adv. Nutr.* 8, 473–483.

Oleröd, G., Hultén, L.M., Hammarsten, O., and Klingberg, E. (2017). The variation in free 25-hydroxy vitamin D and vitamin D-binding protein with season and vitamin D status. *Endocr. Connect.* 6, 111–120.

de Oliveira, L.F., de Azevedo, L.G., da Mota Santana, J., de Sales, L.P.C., and Pereira-Santos, M. (2019). Obesity and overweight decreases the effect of vitamin D supplementation in adults: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 21, 67–76.

Oosterveer, M.H., Dijk, T.H. van, Tietge, U.J.F., Boer, T., Havinga, R., Stellaard, F., Groen, A.K., Kuipers, F., and Reijngoud, D.-J. (2009). High Fat Feeding Induces Hepatic Fatty Acid Elongation in Mice. *PLOS ONE* 4, e6066.

Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J., and Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 85–97.

Ovesen, L., Brot, C., and Jakobsen, J. (2003). Food Contents and Biological Activity of 25-Hydroxyvitamin D: A Vitamin D Metabolite to Be Reckoned With? *Ann. Nutr. Metab.* 47, 107–113.

~ P ~

Palmer, B.F., and Clegg, D.J. (2019). Strategies to Counter Weight Loss-Induced Reductions in Metabolic Rate. *Curr. Sports Med. Rep.* 18, 258–265.

Papapostoli, I., Lammert, F., and Stokes, C.S. (2016). Effect of short-term vitamin D correction on hepatic steatosis as quantified by controlled attenuation parameter (CAP). *J Gastrointest Liver Dis* 25, 175–181.

Park, A., Kim, W.K., and Bae, K.-H. (2014). Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J. Stem Cells* 6, 33–42.

Park, J.M., Park, C.Y., and Han, S.N. (2015). High fat diet-Induced obesity alters vitamin D metabolizing enzyme expression in mice. *BioFactors* 41, 175–182.

Pasarica, M., Sereda, O.R., Redman, L.M., Albarado, D.C., Hymel, D.T., Roan, L.E., Rood, J.C., Burk, D.H., and Smith, S.R. (2009). Reduced Adipose Tissue Oxygenation in Human Obesity: Evidence for Rarefaction, Macrophage Chemotaxis, and Inflammation Without an Angiogenic Response. *Diabetes* 58, 718–725.

Peres Valgas da Silva, C., Hernández-Saavedra, D., White, J.D., and Stanford, K.I. (2019). Cold and Exercise: Therapeutic Tools to Activate Brown Adipose Tissue and Combat Obesity. *Biology* 8, 9.

Perna, S. (2019). Is Vitamin D Supplementation Useful for Weight Loss Programs? A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Medicina (Mex.)* 55, 368.

Petro, A.E., Surwit, R.S., and Surwit, R.S. (2000). The c57bl/6j mouse as a model of diet-induced type 2 diabetes and obesity. *Anim. Models Diabetes* 343–345.

Petrus, P., Mejhert, N., Corrales, P., Lecoutre, S., Li, Q., Maldonado, E., Kulyté, A., Lopez, Y., Campbell, M., Acosta, J.R., et al. (2018). Transforming Growth Factor- β 3 Regulates Adipocyte Number in Subcutaneous White Adipose Tissue. *Cell Rep.* 25, 551–560.e5.

Pijl, H. (2011). Obesity: evolution of a symptom of affluence. *Neth J Med* 69, 159–66.

Pittas, A.G., Lau, J., Hu, F.B., and Dawson-Hughes, B. (2007a). The Role of Vitamin D and Calcium in Type 2 Diabetes. A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 2017–2029.

Pittas, A.G., Harris, S.S., Stark, P.C., and Dawson-Hughes, B. (2007b). The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in nondiabetic adults. *Diabetes Care* 30, 980–986.

Poirier, P., Lemieux Isabelle, Mauriège Pascale, Dewailly Eric, Blanchet Carole, Bergeron Jean, and Després Jean-Pierre (2005). Impact of Waist Circumference on the Relationship Between Blood Pressure and Insulin. *Hypertension* 45, 363–367.

Poston, L. (2012). Maternal obesity, gestational weight gain and diet as determinants of offspring long term health. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 627–639.

~ R ~

Reaven, G.M. (1988). Role of Insulin Resistance in Human Disease. *Diabetes* 37, 1595–1607.

Reboul, E., Goncalves, A., Comera, C., Bott, R., Nowicki, M., Landrier, J.-F., Jourdeuil-Rahmani, D., Dufour, C., Collet, X., and Borel, P. (2011). Vitamin D intestinal absorption is not a simple passive diffusion: Evidences for involvement of cholesterol transporters. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 691–702.

Reboul, E. (2015). Intestinal absorption of vitamin D: from the meal to the enterocyte. *Food Funct.* 6, 356–362.

Reverchon, M., Maillard, V., Froment, P., Ramé, C., and Dupont, J. (2013). Adiponectine et résistine - Un rôle dans les fonctions de reproduction? *médecine/sciences* 29, 417–424.

Rezende, L.F.M. de, Lopes, M.R., Rey-López, J.P., Matsudo, V.K.R., and Luiz, O. do C. (2014). Sedentary Behavior and Health Outcomes: An Overview of Systematic Reviews. *PLOS ONE* 9, e105620.

Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., et al. (2013). Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science* 341.

Rocha-Rodrigues, S., Rodríguez, A., Gouveia, A.M., Gonçalves, I.O., Becerril, S., Ramírez, B., Beleza, J., Frühbeck, G., Ascensão, A., and Magalhães, J. (2016). Effects of physical exercise on myokines expression and brown adipose-like phenotype modulation in rats fed a high-fat diet. *Life Sci.* 165, 100–108.

Roderka, M.N., Puri, S., and Batsis, J.A. (2020). Addressing Obesity to Promote Healthy Aging. *Clin. Geriatr. Med.* 36, 631–643.

Roizen, J.D., Long, C., Casella, A., O’Lear, L., Caplan, I., Lai, M., Sasson, I., Singh, R., Makowski, A.J., Simmons, R., et al. (2019). Obesity Decreases Hepatic 25-Hydroxylase Activity Causing Low Serum 25-Hydroxyvitamin D. *J. Bone Miner. Res.* *34*, 1068–1073.

Romacho, T., Elsen, M., Röhrborn, D., and Eckel, J. (2014). Adipose tissue and its role in organ crosstalk. *Acta Physiol.* *210*, 733–753.

Rosen, C.J., Adams, J.S., Bikle, D.D., Black, D.M., Demay, M.B., Manson, J.E., Murad, M.H., and Kovacs, C.S. (2012). The Nonskeletal Effects of Vitamin D: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr. Rev.* *33*, 456–492.

Rosenblum, J.L., Castro, V.M., Moore, C.E., and Kaplan, L.M. (2012). Calcium and vitamin D supplementation is associated with decreased abdominal visceral adipose tissue in overweight and obese adults. *Am. J. Clin. Nutr.* *95*, 101–108.

Ross, R., Soni, S., and Houle, S. (2020). Negative Energy Balance Induced by Exercise or Diet: Effects on Visceral Adipose Tissue and Liver Fat. *Nutrients* *12*, 891.

Rosso, C., Kazankov, K., Younes, R., Esmaili, S., Marietti, M., Sacco, M., Carli, F., Gaggini, M., Salomone, F., Møller, H.J., et al. (2019). Crosstalk between adipose tissue insulin resistance and liver macrophages in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* *71*, 1012–1021.

Roth, C.L., Elfers, C.T., Figlewicz, D.P., Melhorn, S.J., Morton, G.J., Hoofnagle, A., Yeh, M.M., Nelson, J.E., and Kowdley, K.V. (2012). Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and toll-like receptor activation. *Hepatology* *55*, 1103–1111.

~ S ~

Sabio, G., and Davis, R.J. (2010). cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. *Trends Biochem. Sci.* *35*, 490–496.

Salehpour, A., Hosseinpanah, F., Shidfar, F., Vafa, M., Razaghi, M., Dehghani, S., Hoshiarrad, A., and Gohari, M. (2012). A 12-week double-blind randomized clinical trial of vitamin D3 supplementation on body fat mass in healthy overweight and obese women. *Nutr. J.* *11*, 78.

Sampath, S.C., Sampath, S.C., Bredella, M.A., Cypess, A.M., and Torriani, M. (2016). Imaging of Brown Adipose Tissue: State of the Art. *Radiology* *280*, 4–19.

Sangouni, A.A., Ghavamzadeh, S., and Jamalzehi, A. (2019). A narrative review on effects of vitamin D on main risk factors and severity of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 13, 2260–2265.

Schaffer, J.. (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr. Opin. Lipidol.* 281–287.

Schuster, I. (2011). Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1814, 186–199.

Seida, J.C., Mitri, J., Colmers, I.N., Majumdar, S.R., Davidson, M.B., Edwards, A.L., Hanley, D.A., Pittas, A.G., Tjosvold, L., and Johnson, J.A. (2014). Effect of Vitamin D3 Supplementation on Improving Glucose Homeostasis and Preventing Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, 3551–3560.

Sergeev, I.N. (2016). Vitamin D—Cellular Ca²⁺ link to obesity and diabetes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 164, 326–330.

Sergeev, I.N., and Song, Q. (2014). High vitamin D and calcium intakes reduce diet-induced obesity in mice by increasing adipose tissue apoptosis. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 1342–1348.

Sha, B.-Y., Yang, T.-L., Zhao, L.-J., Chen, X.-D., Guo, Y., Chen, Y., Pan, F., Zhang, Z.-X., Dong, S.-S., Xu, X.-H., et al. (2009). Genome-wide association study suggested copy number variation may be associated with body mass index in the Chinese population. *J. Hum. Genet.* 54, 199–202.

Shafir, E., and Ziv, E. (2009). A useful list of spontaneously arising animal models of obesity and diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E1450-1452.

Sharifi, N., Amani, R., Hajiani, E., and Cheraghian, B. (2014). Does vitamin D improve liver enzymes, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in adults with non-alcoholic fatty liver disease? A randomized clinical trial. *Endocrine* 47, 70–80.

Sharma, S.S., Jangale, N.M., Harsulkar, A.M., Gokhale, M.K., and Joshi, B.N. (2017). Chronic maternal calcium and 25-hydroxyvitamin D deficiency in Wistar rats programs abnormal hepatic gene expression leading to hepatic steatosis in female offspring. *J. Nutr. Biochem.* 43, 36–46.

Sijie, T., Hainai, Y., Fengying, Y., and Jianxiong, W. (2012). High intensity interval exercise training in overweight young women. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 52, 255–

262.

Sneve, M., Figenschau, Y., and Jorde, R. (2008). Supplementation with cholecalciferol does not result in weight reduction in overweight and obese subjects. *Eur. J. Endocrinol.* 159, 675–684.

de Souza Santos, R., and Vianna, L.M. (2005). Effect of cholecalciferol supplementation on blood glucose in an experimental model of type 2 diabetes mellitus in spontaneously hypertensive rats and Wistar rats. *Clin. Chim. Acta* 358, 146–150.

Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783–787.

Speliotes, E.K., Willer, C.J., Berndt, S.I., Monda, K.L., Thorleifsson, G., Jackson, A.U., Allen, H.L., Lindgren, C.M., Luan, J., Mägi, R., et al. (2010). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat. Genet.* 42, 937–948.

Stanford, K.I., Middelbeek, R.J.W., and Goodyear, L.J. (2015). Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. *Diabetes* 64, 2361–2368.

Stunkard, A.J., Foch, T.T., and Hrubec, Z. (1986). A twin study of human obesity. *Jama* 256, 51–54.

Sutherland, L.N., Bomhof, M.R., Capozzi, L.C., Basaraba, S.A.U., and Wright, D.C. (2009). Exercise and adrenaline increase PGC-1 α mRNA expression in rat adipose tissue. *J. Physiol.* 587, 1607–1617.

Swift, D.L., McGee, J.E., Earnest, C.P., Carlisle, E., Nygard, M., and Johannsen, N.M. (2018). The Effects of Exercise and Physical Activity on Weight Loss and Maintenance. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 61, 206–213.

Symonds, M.E., Henderson, K., Elvidge, L., Bosman, C., Sharkey, D., Perkins, A.C., and Budge, H. (2012). Thermal Imaging to Assess Age-Related Changes of Skin Temperature within the Supraclavicular Region Co-Locating with Brown Adipose Tissue in Healthy Children. *J. Pediatr.* 161, 892–898.

Szymczak-Pajor, I., and Śliwińska, A. (2019). Analysis of Association between Vitamin D Deficiency and Insulin Resistance. *Nutrients* 11, 794.

~ T ~

Tamura, Y., Sugimoto, M., Murayama, T., Minami, M., Nishikaze, Y., Ariyasu, H., Akamizu, T., Kita, T., Yokode, M., and Arai, H. (2010). C-C Chemokine Receptor 2 Inhibitor Improves Diet-Induced Development of Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in Mice. *J. Atheroscler. Thromb.* 17, 219–228.

Tanti, J.-F., and Jager, J. (2009). Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 753–762.

Thompson, P.D., Arena, R., Riebe, D., and Pescatello, L.S. (2013). ACSM's New Preparticipation Health Screening Recommendations from ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription, Ninth Edition. *Curr. Sports Med. Rep.* 12, 215–217.

Touati, S., Montezano, A.C., Meziri, F., Riva, C., Touyz, R.M., and Laurant, P. (2015). Exercise training protects against atherosclerotic risk factors through vascular NADPH oxidase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase downregulation in obese rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 42, 179–185.

Tourniaire, F., Romier-Crouzet, B., Lee, J.H., Marcotorchino, J., Gouranton, E., Salles, J., Malezet, C., Astier, J., Darmon, P., Blouin, E., et al. (2013). Chemokine Expression in Inflamed Adipose Tissue Is Mainly Mediated by NF- κ B. *PLOS ONE* 8, e66515.

Trayhurn, P., and Wood, I.S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* 92, 347–355.

Trayhurn, P., O'Hara, A., and Bing, C. (2011). Interrogation of microarray datasets indicates that macrophage-secreted factors stimulate the expression of genes associated with vitamin D metabolism (VDR and CYP27B1) in human adipocytes. *Adipobiology* 3, 31–36.

Tremaroli, V., and Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489, 242–249.

Trivedi, T., Liu, J., Probst, J.C., Merchant, A., Jones, S., and Martin, A.B. (2015). Obesity and obesity-related behaviors among rural and urban adults in the USA. *Rural Remote Health* 15, 3267.

Tsuzuki, T., Shinozaki, S., Nakamoto, H., Kaneki, M., Goto, S., Shimokado, K., Kobayashi, H., and Naito, H. (2015). Voluntary Exercise Can Ameliorate Insulin Resistance by Reducing iNOS-Mediated S-Nitrosylation of Akt in the Liver in Obese Rats. *PLOS ONE* 10, e0132029.

~ V ~

Vague, J. (1947). La différentiation sexuelle facteur déterminant des formes de l'obésité. *Presse Med* 30, 339–340.

Vázquez-Vela, M.E.F., Torres, N., and Tovar, A.R. (2008). White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Arch. Med. Res.* 39, 715–728.

Vernay, M., Sponga, M., Salanave, B., Oléko, A., Deschamps, V., Malon, A., and Castetbon, K. (2012). Statut en vitamine D de la population adulte en France: l'étude nationale nutrition santé (ENNS, 2006–2007). *BEH* 16, 189–194.

Villareal, D.T., Chode, S., Parimi, N., Sinacore, D.R., Hilton, T., Armamento-Villareal, R., Napoli, N., Qualls, C., and Shah, K. (2011). Weight Loss, Exercise, or Both and Physical Function in Obese Older Adults. *N. Engl. J. Med.* 364, 1218–1229.

Vinet, A., Obert, P., Dutheil, F., Diagne, L., Chapier, R., Lesourd, B., Courteix, D., and Walther, G. (2015). Impact of a Lifestyle Program on Vascular Insulin Resistance in Metabolic Syndrome Subjects: The RESOLVE Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, 442–450.

Viollet, B. (2017). The Energy Sensor AMPK: Adaptations to Exercise, Nutritional and Hormonal Signals. In *Hormones, Metabolism and the Benefits of Exercise*, B. Spiegelman, ed. (Cham (CH): Springer).

Vissers, D., Hens, W., Taeymans, J., Baeyens, J.-P., Poortmans, J., and Gaal, L.V. (2013). The Effect of Exercise on Visceral Adipose Tissue in Overweight Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* 8, e56415.

~ W ~

Wamberg, L., Christiansen, T., Paulsen, S.K., Fisker, S., Rask, P., Rejnmark, L., Richelsen, B., and Pedersen, S.B. (2013a). Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue—the effect of obesity and diet-induced weight loss. *Int. J. Obes.* 37, 651–657.

Wamberg, L., Cullberg, K.B., Rejnmark, L., Richelsen, B., and Pedersen, S.B. (2013b). Investigations of the Anti-inflammatory Effects of Vitamin D in Adipose Tissue: Results from an In Vitro Study and a Randomized Controlled Trial. *Horm. Metab. Res.* *45*, 456–462.

Wamberg, L., Kampmann, U., Stødkilde-Jørgensen, H., Rejnmark, L., Pedersen, S.B., and Richelsen, B. (2013c). Effects of vitamin D supplementation on body fat accumulation, inflammation, and metabolic risk factors in obese adults with low vitamin D levels — Results from a randomized trial. *Eur. J. Intern. Med.* *24*, 644–649.

Wang, C.C.L., Goalstone, M.L., and Draznin, B. (2004). Molecular Mechanisms of Insulin Resistance That Impact Cardiovascular Biology. *Diabetes* *53*, 2735–2740.

Wardle, J., Carnell, S., Haworth, C.M., and Plomin, R. (2008). Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. *Am. J. Clin. Nutr.* *87*, 398–404.

Willebrords, J., Pereira, I.V.A., Maes, M., Crespo Yanguas, S., Colle, I., Van Den Bossche, B., Da Silva, T.C., de Oliveira, C.P.M.S., Andraus, W., Alves, V.A., et al. (2015). Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. *Prog. Lipid Res.* *59*, 106–125.

Williamson, V.G., Dilip, A., Dillard, J.R., Morgan-Daniel, J., Lee, A.M., and Cardel, M.I. (2020). The Influence of Socioeconomic Status on Snacking and Weight among Adolescents: A Scoping Review. *Nutrients* *12*, 167.

Woo, M., and Patti, M.-E. (2008). Diabetes Risk Begins In Utero. *Cell Metab.* *8*, 5–7.

Wortsman, J., Matsuoka, L.Y., Chen, T.C., Lu, Z., and Holick, M.F. (2000). Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* *72*, 690–693.

Wronska, A., and Kmiec, Z. (2012). Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol.* *205*, 194–208.

Wu, M., Junker, D., Branca, R.T., and Karampinos, D.C. (2020). Magnetic Resonance Imaging Techniques for Brown Adipose Tissue Detection. *Front. Endocrinol.* *11*.

Wu, M.V., Bikopoulos, G., Hung, S., and Ceddia, R.B. (2014). Thermogenic Capacity Is Antagonistically Regulated in Classical Brown and White Subcutaneous

Fat Depots by High Fat Diet and Endurance Training in Rats. *J. Biol. Chem.* 289, 34129–34140.

~ Y ~

Yang, J., Tian, C., Chen, Y., Zhu, C., Chi, H., and Li, J. (2020). Obesity aggravates COVID-19: An updated systematic review and meta-analysis. *J. Med. Virol.* 1-13.

Yaribeygi, H., Atkin, S.L., Simental-Mendía, L.E., and Sahebkar, A. (2019). Molecular mechanisms by which aerobic exercise induces insulin sensitivity. *J. Cell. Physiol.* 234, 12385–12392.

Yarizadeh, H., Eftekhar, R., Anjom-Shoae, J., Speakman, J.R., and Djafarian, K. (2020). The Effect of Aerobic and Resistance Training and Combined Exercise Modalities on Subcutaneous Abdominal Fat: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *Adv. Nutr.* nmaa090.

Ye, J., Gao, Z., Yin, J., and He, Q. (2007). Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 293, E1118–E1128.

Yin, Y., Yu, Z., Xia, M., Luo, X., Lu, X., and Ling, W. (2012). Vitamin D attenuates high fat diet–induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism. *Eur. J. Clin. Invest.* 42, 1189–1196.

Yu, J., Zheng, J., Liu, X.F., Feng, Z.L., Zhang, X.P., Cao, L.L., and Zhou, Z.P. (2016). Exercise improved lipid metabolism and insulin sensitivity in rats fed a high-fat diet by regulating glucose transporter 4 (GLUT4) and musclin expression. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 49.

Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z.-W., Karin, M., and Shoelson, S.E. (2001). Reversal of Obesity- and Diet-Induced Insulin Resistance with Salicylates or Targeted Disruption of Ikk β . *Science* 293, 1673–1677.

~ Z ~

Zeitz, U., Weber, K., Soegiarto, D.W., Wolf, E., Balling, R., and Erben, R.G. (2003). Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB J.* 17, 1–14.

Zhang, H., Tong, T.K., Qiu, W., Zhang, X., Zhou, S., Liu, Y., and He, Y. (2017).

Comparable Effects of High-Intensity Interval Training and Prolonged Continuous Exercise Training on Abdominal Visceral Fat Reduction in Obese Young Women. *J. Diabetes Res.* 2017, 5071740.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.

Zhang, Y., Wan, J., Xu, Z., Hua, T., and Sun, Q. (2019). Exercise ameliorates insulin resistance via regulating TGF β -activated kinase 1 (TAK1)-mediated insulin signaling in liver of high-fat diet-induced obese rats. *J. Cell. Physiol.* 234, 7467–7474.

Zhou, J., Zhao, L.-J., Watson, P., Zhang, Q., and Lappe, J.M. (2010). The effect of calcium and vitamin D supplementation on obesity in postmenopausal women: secondary analysis for a large-scale, placebo controlled, double-blind, 4-year longitudinal clinical trial. *Nutr. Metab.* 7, 62.

Zhou, Q.G., Hou, F.F., Guo, Z.J., Liang, M., Wang, G.B., and Zhang, X. (2008). 1,25-Dihydroxyvitamin D improved the free fatty-acid-induced insulin resistance in cultured C2C12 cells. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 24, 459–464.

Zhu, J.G., Ochalek, J.T., Kaufmann, M., Jones, G., and DeLuca, H.F. (2013a). CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 15650–15655.

Zhu, W., Cai, D., Wang, Y., Lin, N., Hu, Q., Qi, Y., Ma, S., and Amarasekara, S. (2013b). Calcium plus vitamin D3 supplementation facilitated Fat loss in overweight and obese college students with very-low calcium consumption: a randomized controlled trial. *Nutr. J.* 12, 8.

Zierath, J.R., and Wallberg-Henriksson, H. (2015). Looking Ahead Perspective: Where Will the Future of Exercise Biology Take Us? *Cell Metab.* 22, 25–30.

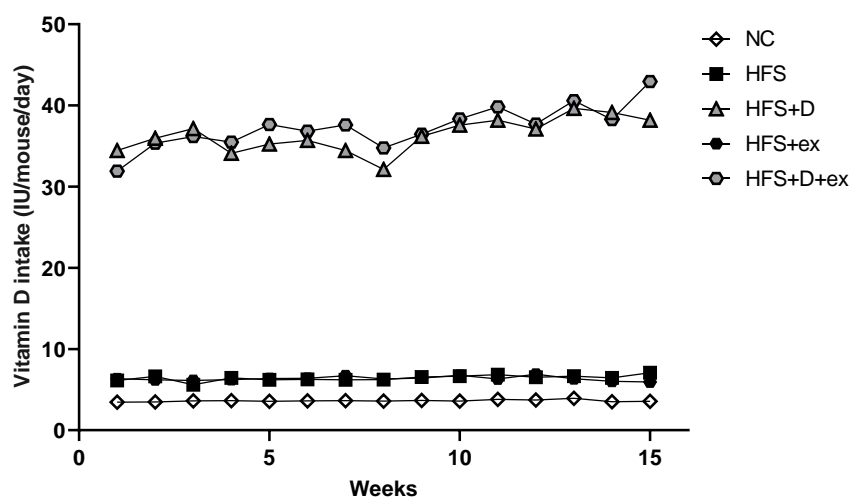
Zittermann, A., Frisch, S., Berthold, H.K., Götting, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Stehle, P., Koertke, H., and Koerfer, R. (2009). Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1321–1327.

Zoico, E., Franceschetti, G., Chirumbolo, S., Rossi, A.P., Mazzali, G., Rizzatti, V., Budui, S., and Zamboni, M. (2014). Phenotypic Shift of Adipocytes by Cholecalciferol and $1\alpha,25$ Dihydroxycholecalciferol in Relation to Inflammatory Status and Calcium Content. *Endocrinology* 155, 4178–4188.

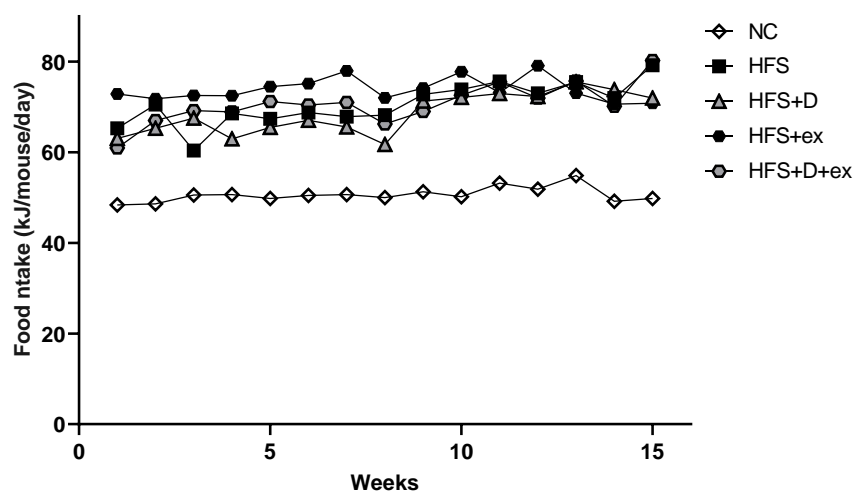
Annexes

Données complémentaires aux études n°1 et n°2

A



B



(A) Moyenne des apports en vitamine D exprimée en UI (unité internationale) par jour et par souris durant les 15 semaines de supplémentation.

(B) Moyenne des apports caloriques exprimée en kJ par jour et par souris durant les 15 semaines de supplémentation.

NC (Normal Chow) ; HFS (High fat high sucrose) ; HFS+D (HFS supplémenté en vitamine D) ; HFS+ex (HFS + exercice volontaire) ; HFS+D+ex (HFS supplémenté en vitamine D + exercice volontaire).

Vitamin D₃ supplementation alleviates left ventricular dysfunction in a mouse model of diet-induced type 2 diabetes: potential involvement of cardiac lipotoxicity modulation.

Clothilde Philouze^a, Jean-Charles Martin^b, Catherine Riva^a, Alexandra Marziou^{a, b}, Catherine Defoort^b, Charlène Couturier^b, Thierry Berton^b, Julien Astier^b, Bernard Jover^c, Nathalie Gayrard^d, Cyril Reboul^a, Sandrine Gayrard^a, Jean-François Landrier^b, Philippe Obert^a.

^a EA 4278 LaPEC, Laboratory of Cardiovascular Pharm-Ecology, Avignon University, Avignon, France

^b UMR 1260 INSERM/INRA/AMU Nutrition and Cardiovascular Research Center (C2VN), Aix-Marseille University, Marseille, France

^c PhyMedExp, INSERM-CNRS-Montpellier University, France

^d RD Néphrologie, Montpellier, France

E-mail addresses: clothilde.philouze@gmail.com, jean-charles.martin@univ-amu.fr, catherine.riva@univ-avignon.fr, alexandra.marziou@gmail.com, catherine.defoort@univ-amu.fr, charlene.couturier@univ-amu.fr, thierry.berton@univ-amu.fr, julien.astier@univ-amu.fr, bernard.jover@inserm.fr, nathalie.gayrard@umontpellier.fr, cyril.reboul@univ-avignon.fr, sandrine.gayrard@univ-avignon.fr, jean-francois.landrier@univ-amu.fr, philippe.obert@univ-avignon.fr

Corresponding author: Pr. P Obert. University of Avignon, Faculty of Sciences, 301 rue Baruch de Spinoza, 84916 Avignon Cedex 9, France. Email: philippe.obert@univ-avignon.fr, Tel: +33 4 90 16 29 49, Fax: +33 4 90 16 29 01

Running title: Vitamin D alleviates cardiac dysfunction in diabetes.

This work or parts of it have not been presented elsewhere

Word count: 3802/4000 (5000 – 250 x 4 figures)

ABSTRACT

Aims – To evaluate the effectiveness of vitamin D₃ supplementation, in secondary prevention, on cardiac remodeling and function, as well as lipid profile, in a mouse model of diet-induced type 2 diabetes.

Methods – Mice were fed a high fat and sucrose diet for 10 weeks. Afterwards, diet was maintained for 15 more weeks and 2 groups were formed, with and without cholecalciferol supplementation. A control group was fed with normal chow. Glucose homeostasis and cardiac function were assessed at baseline and at the 10th and 24th weeks. Animals were killed at the 10th and 25th weeks for plasma and cardiac sample analysis. Cardiac lipid profile was characterized by LC-MS/MS.

Results – After 10 weeks of diet, mice exhibited pre-diabetes, mild left ventricle hypertrophy and impaired longitudinal strain, but preserved myocardial circumferential as well as global diastolic and systolic cardiac function. After 15 more weeks of diet, animals presented with well-established type 2 diabetes, pathological cardiac hypertrophy and impaired regional myocardial function. Cholecalciferol supplementation had no effect on glucose homeostasis but improved cardiac remodeling and regional myocardial function. After 25 weeks, non-supplemented mice exhibited increased myocardial levels of ceramides and diacylglycerol, both of which were normalized by vitamin D₃ supplementation.

Conclusion – This work brought to light the beneficial effects of cholecalciferol supplementation, in secondary prevention, on cardiac remodeling and function in a mouse model of diet-induced type 2 diabetes. Those cardioprotective effects may be, at least in part, explained on account of the modulation of myocardial levels of lipotoxic species by vitamin D.

Word count: 250/250

Keywords: cardiac lipotoxicity - regional myocardial function - type 2 diabetes - vitamin D.

1. INTRODUCTION

Diabetic cardiomyopathy (DMCM) is the leading cause of morbidity and mortality, as well as the most frequent complication observed in type 2 diabetic patients¹. The pathophysiological process is thought to set up as soon as the onset of diabetes, emphasizing the importance of early diagnosis and therapeutic intervention¹.

The etiology of DMCM is not fully understood yet but growing evidence suggest a pivotal role of cardiac lipotoxicity^{2,3}. Transgenic models designed to increase myocardial lipid content have consistently reported impairments in cardiac function, especially as a result of increased cytotoxic lipid species, such as ceramides and diacylglycerols (DAG)⁴⁻⁶. A major concern with genetically modified models is however the induction of massive lipid storage at non-physiological levels. High fat diets (HFD) in rodent models recapitulate faithfully the etiology of and risk factors associated with T2DM in humans. It is however still unclear whether HFD is sufficient to induce cardiac dysfunction in rodents⁷⁻⁹. Discrepancies may partly arise from regimen duration, longitudinal studies having reported adverse cardiac effects mainly consecutive to long-term HFD^{7,9,10}. Other reasons come very likely from the fact that only indexes of global systolic function (e.g. ejection fraction, EF) were measured, the latter being often depressed only at an advanced stage of cardiac disease. Deformation imaging is able to reveal subtle regional myocardial abnormalities at an early stage before overt cardiac dysfunction. In mice on HFD, impairments of radial systolic strain rate, as early as the 5th week, were reported, when EF was still normal⁹. Longitudinal (LS) and circumferential (CS) strains are major components of LV myocardial mechanics. In T2DM patients, alteration in longitudinal function usually precedes that of circumferential one^{11,12}. To our knowledge, no data is today available on LS and CS in the time course of HFD in rodent models. To what extent HFD is able to major cardiac lipid content and how this affect myocardial function remains poorly documented¹³.

Vitamin D can exert major effects on cardiovascular physiological processes. By its regulating properties of calcium homeostasis, cell proliferation, renin-angiotensin system, immunity and inflammation, vitamin D has indeed the potential to prevent the progression of myocardial hypertrophy, fibrosis and dysfunction¹⁴⁻¹⁶. Of note, hypovitaminosis D is highly prevalent in type 2 diabetic patients and associated with adverse cardiovascular events¹⁷⁻¹⁹. In animals, our understanding of the specific vitamin D-induced cardiac effect originates mainly from transgenic mice^{16,20} or streptozotocin-induced type 1 diabetic rats^{21,22}. In the diet-induced T2DM model, only

one study is to our knowledge currently available and examined the effect of vitamin D supplementation in primary prevention on cardiac remodeling²³. The authors demonstrated that vitamin D dietary supplementation could prevent LV hypertrophy and reduce fibrosis. Data regarding the efficiency of vitamin D supplementation in impeding the progression of DMCM in secondary prevention in a T2DM phenotype are then still dramatically lacking, as well as data regarding the effects of vitamin D supplementation on cardiac lipid profile.

Therefore, the first aim of this study was to assess the impact of cholecalciferol supplementation, in secondary prevention, on cardiac remodeling, as well as global and regional function, in a mouse model of diet-induced T2DM. The second aim was to characterize the effect of this intervention on myocardial lipid profile.

2. METHODS

2.1. Animals

Six-week old male C57Bl/6JRj mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and housed in a room under normal controlled conditions. All procedures meet European parliamentary guidelines 2010/63/EU (N°CEEA-00322.03) and were approved by the local ethics committee (N°2017071209197796).

2.2. Experimental groups and protocol

At 10 weeks of age, mice were randomly assigned into either a control (CTRL) or diabetic group. The CTRL mice were fed with standard rodent chow (A04, SAFE Diets, Augy, France) and tap water for 25 weeks. The diabetic group was fed with high fat diet (60% of energy intake from fat, HF230, SAFE Diets, Augy, France) and 10% sucrose-added tap water for 10 weeks (HFS diet). Afterwards, mice were randomly subdivided and kept for the 15 following weeks either on the HFS regimen only (DM) or the HFS diet supplemented with 15,000 IU/kg cholecalciferol (customized HF230, SAFE Diet, Augy, France) (DM+D), as previously described²⁴.

Mice follow-up included weekly weighing, as well as glucose homeostasis assessment and echocardiography at baseline and at the 10th and 24th weeks. Animals were killed at the 10th and 25th weeks of the protocol for biochemical assessments.

2.3. Glucose homeostasis

Glucose homeostasis and diabetic state were evaluated by 6-hour-fasting glycaemia and intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT). Glycaemia was measured using commercially available glucose meter (CareSens N, Dinno Santé, Bussy-Saint-Georges, France) from a blood drop obtained by slight incision of the locally anesthetized tail. IPITT was then initiated by intraperitoneal injection of 1 IU/kg insulin and glycaemia was measured 10, 30, 60, 90 and 120 minutes after injection. Area under curve (AUC) was calculated.

2.4. Echocardiography

Echocardiographic assessment was performed using a Vevo 3100 imaging system (Fujifilm VisualSonics, Toronto, Canada). Images were analyzed post-processing using the VevoLab software. Mice anesthesia was induced with 4% isoflurane in medical air mix, ventilated at 1L/min, and then maintained with 1.5% isoflurane after effective sleep. Animals were placed in a supine position on a heating pad and their body temperature, breathing rate and electrocardiogram were monitored throughout the exam.

End-diastolic and end-systolic LV diameters (LVED and LVES, respectively) as well as anterior and posterior wall thicknesses (AWT and PWT, respectively) were measured from M-mode echocardiograms on a parasternal long-axis view. EF, relative wall thickness ($RWT = (AWT + PWT) / LVED$) and LV mass were then calculated. Early (E) and late (A) mitral inflow peak velocities were obtained from an apical 4-chamber view using pulsed Doppler and E/A ratio was calculated.

Two-dimensional cine loops were recorded in parasternal long- and short- (papillary muscle level) axis views for strain and strain rate (SR) analysis in longitudinal and circumferential dimensions, respectively.

All measurements were averaged from the 3 cardiac cycles displaying the best image quality.

2.5. Animals sacrifice

Mice were sacrificed after an overnight fasting. Blood was sampled by intracardiac puncture on heparinized syringe. After centrifugation, plasma was stored at -80°C before analysis. Mice were then dislocated and heart was quickly harvested and washed in a cold Krebs solution. Heart was then weighted and either fixed in formalin

(Merck, Darmstedt, Germany) or snap-frozen in liquid nitrogen after ventricles dissection. Formalin-fixed samples were washed in saline phosphate buffer 24 hours after sacrifice, and stored at 4°C in 70% ethanol.

2.6. Blood analyses

Plasma triglycerides (TG), calcium and glucose were assayed using colorimetric kits (BIOLABO, Maizy, France). Insulin was measured using the mouse ultrasensitive Insulin ELISA kit (ALPCO, Salem, United-States), and cholecalciferol as well as calcidiol were assayed using LC-MS/MS (Hypersil GOLD C18 column, ThermoFisher Scientific, United-States)²⁵.

2.7. Histology

After dehydration, hearts were embedded in paraffin and sliced in 10µm longitudinal sections. Samples were then stained either with hematoxylin-eosin or with Sirius Red and mounted with xylene-based mounting medium before imaging. Analyses were performed using ImageJ software. For cardiomyocyte size evaluation, the small diameter of 40 cells per sample was measured from hematoxylin-eosin stained sections. For interstitial fibrosis assessment, the percentage of Sirius Red-stained area was measured at 10 different spots.

2.8. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted using TRI Reagent (Merck). cDNAs were then synthesized from 1µg RNA using the M-MLV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, United-States). qRT-PCR was performed in the qPCR MasterMix Plus for SYBR Green I No ROX (Eurogentec, Liège, Belgium), using the AriaMX system (Agilent Technologies, Santa Clara, United-States).

2.9. Western blot analysis

AKT and AKT-Pser473 were measured by western blot, as previously described²⁵. Briefly, proteins were separated by gel electrophoresis and transferred onto PVDF membranes. Then, membranes were blocked in 5% milk in Tris-Buffered Saline solution with 0.05 %Tween-20. Primary antibodies were anti-rabbit AKT-Pser473 (1/500, 5% BSA, Cell Signaling), anti-rabbit AKT (1/1000, 5% BSA, Cell Signaling) and anti-rabbit tubulin (1/3000, 3% BSA, Santa Cruz).

2.10. Cardiac lipid profile

Cardiac lipids were firstly extracted by double methyl tert-butyl ether (MTBE) extraction from a 20mg LV sample. Briefly, samples were grounded in liquid nitrogen and added with 0.2 mL saline phosphate buffer, 1.5mL methanol, 5mL MTBE and 1.25mL deionized water. After 1h stirring and 10 min centrifugation at 1000 rpm and 10°C, the upper lipid phase was removed and reserved. Then the second extraction was carried out on the lower phase of the liquid, with 2 mL of a methanol/MTBE/H₂O mixture. After a 10 min stirring and another centrifugation, the upper phase was pipetted and added to the previously removed phase. Finally, a dry extract was obtained after evaporation.

After addition of 200µl of a CHCl₃/methanol/H₂O mixture to the dry extract, cardiac lipid profile semi-quantitative analysis was performed by LC-MS/MS (Accucore™ 02 C18 column, ThermoFisher Scientific, Waltham, United-States).

2.11. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS statistics 20.0 (IBM Corp., USA). Values are expressed as mean±SEM, otherwise specified. Statistical significance was defined as p value<0.05 and Normality was assessed using Shapiro-Wilk test. The effects of HFS diet and vitamin D supplementation on follow-up biological and echocardiographic variables were tested using a linear mixed-effect model (GLM) with group and time as fixed effects. In case of significant interaction between time and group, analyses were further conducted within each group using GLM, with Bonferroni post-hoc test. At each time, a generalized linear model was use for group comparison. Heart rate (HR) was introduced as covariate, when appropriate.

3. RESULTS

3.1. Vitamin D supplementation does not impede HFS diet-induced metabolic abnormalities and increase in visceral fat mass.

Mice weight increased significantly during follow-up in the 3 groups, but gains were more pronounced for DM compared to CTRL groups (figure 1a). After 10 weeks of HFS diet, mice exhibited increased visceral fat, plasma TG and altered insulin sensitivity, while fasting glycaemia did not significantly increase (figure 1a and b). After 25 weeks

of HFS diet, mice displayed a well-established type 2 diabetic profile, characterized by fasting hyperglycemia and impaired insulin sensitivity (figure 1b). No inter-group differences were however noticed for plasma TG.

Fifteen weeks of cholecalciferol supplementation in mice fed a HFS diet had no impact on the aforementioned changes in body weight, visceral fat mass or glucose homeostasis indexes (figure 1a & b). Vitamin D₃ supplementation efficiently increased cholecalciferol and 25(OH)D₃ plasma levels, without altering Ca²⁺ levels compared to the DM mice (figure 1d).

3.2. Vitamin D supplementation in DM mice alleviates pathological cardiac remodeling and regional myocardial dysfunction.

LVM increased significantly after 10 weeks of HFS diet, on account mainly of increases in wall thicknesses (Figure 2a, Supplemental table 1). LV hypertrophy remained however modest, data in DM and DM+D groups being not different from those in CTRL littermates. Of note, no inter-group differences were noticed for cardiomyocyte size or heart weight/tibia length ratio (figure 2b & c). Global systolic (EF) and diastolic (E/A ratio) function did not differ between DM or DM+D and CTRL mice and no differences with baseline values were noticed for the different groups (Figure 2d, Supplemental table 1). The 2D-strain analysis highlighted as early as the 10th week a significant impairment in LS while CS appeared well-preserved (Figure 2f, Supplemental table 1).

After 25 weeks of HFS diet, DM mice presented with a well-established concentric remodeling, as evidenced by the major increases in LV wall thicknesses, LV mass and RWT as well as cardiomyocyte size and heart weight/tibia length ratio (Figure 2a & b, Supplemental table 1). DM mice exhibited also an increase in myocardial interstitial fibrosis and an overexpression of collagen type I and III mRNA (Figure 3a & b). Of note, significant relationships were obtained between fibrosis and LS or CS (figure 4c). Furthermore, a significant increase in the phosphorylated/total protein content ratio of AKT was also noticed in DM mice compared to CTRL littermates (Figure 3c). Neither global diastolic nor systolic function indexes were significantly affected by 25 weeks of HFS diet (Figure 2d, Supplemental table 1), even if a slight reduction in EF could be noticed in DM mice (-7% vs. CTRL mice and -10% vs. baseline, NS). Opposite to global cardiac function, major impairments in regional myocardial function were however observed. Indeed, LS were further depressed, and CS were now significantly reduced in DM mice compared to CTRL ones (Figure 2e & f, Supplemental table 1).

Furthermore, longitudinal as well as circumferential systolic and diastolic SR were also significantly impaired in DM mice at the 25th week, indicative of both regional LV systolic and diastolic abnormalities (Figure 2g).

Fifteen weeks of cholecalciferol supplementation significantly affected cardiac remodeling and limited hypertrophy in mice fed a HFS diet. Heart weight/tibia length ratio were indeed at intermediate levels compared to the 2 other groups, data being not significantly different from those in CTRL or DM animals (figure 2b). Furthermore, even if LVM was higher in DM+D compared to CTRL mice ($p < 0.001$), it was also significantly reduced ($p < 0.01$) when compared to DM counterparts at the 25th week of follow-up (Figure 2a, Supplemental table 1). Interestingly, the DM+D mice did not exhibit a concentric pattern, in contrast to their DM littermates (Figure 2a, Supplemental table 1). Additionally, the vitamin D supplementation significantly corrected myocardial fibrosis, limited the overexpression of collagen type I and III mRNA and normalized relative AKT phosphorylation (Figure 3a). While no major impact was seen on global systolic and diastolic function (Figure 2d, Supplemental table 1), cholecalciferol also restored regional myocardial function, LV deformation imaging indexes in DM+D mice being similar to those in CTRL (figure 2e, f & g).

3.3. Cholecalciferol supplementation reduces cardiac lipotoxicity in DM mice.

At the 10th week of protocol, DM mice exhibited significantly increased myocardial levels of ceramides, other sphingolipids and cholesteryl esters compared to their CTRL littermates (Figure 4a). In contrast, DAG levels appeared to be decreased. No changes were observed regarding the prenol and glycerophospholipid subclasses, nor the TG.

After 25 weeks of HFS diet, the increases in cholesteryl esters, ceramides and other sphingolipids were sustained (Figure 4b). Opposite to the 10th week, DAG levels raised now at significantly higher levels in DM compared to CTRL mice. Especially, long- and very-long chain DAG and ceramide species were overexpressed in DM Mice at this stage (Figure 4b and c). TG, prenol and glycerophospholipid levels remained unchanged.

Cholecalciferol supplementation in mice fed a HFS diet normalized DAG and ceramides and decreased cholesterol levels, although the latter was not significantly increased in the DM group compared to the CTRL one (Figure 4a and b). Cholecalciferol had however no effect on TG, other sphingolipids or cholesteryl esters.

4. DISCUSSION

The major findings from the present work are 1) the cardioprotective effects of vitamin D₃ in secondary prevention in T2DM with nascent cardiomyopathy and 2) the potential regulating effect of cholecalciferol on myocardial levels of two major lipotoxic species, ceramides and DAG.

Understanding the early phases of DMCM is of paramount importance to prevent the progression to adverse remodeling and overt cardiac dysfunction. The originality of the present study was to concomitantly investigate cardiac remodeling, function and lipid profile in the time-course of T2DM development in a mice model that recapitulates not only the etiology but also the cause and outcome of the early phases of human DMCM. Indeed, the evolution of mice cardiac remodeling and myocardial function impairments we observed during the time-course of T2DM development is similar to what is noted in clinical studies during the transition from risk factor acquisition to structural disease. For example, the decreased LS with preserved CS and EF in our pre-diabetic animals (e.g. 10th week) has been previously reported in asymptomatic T2DM patients with fairly well-controlled glycaemia¹². Likewise to our DM mice after 25 weeks of HFD, cardiac maladaptive concentric hypertrophy associated with blunted both LS and CS but preserved EF is a typical pattern in patients exhibiting more advanced T2DM and poor glycemic control^{12,26}. Whether HFD induces cardiac dysfunction remains conflicting in the literature, on account very likely to differences in regimen duration as well as methods used to evaluate cardiac function, however our observations regarding cardiac remodeling and global systolic function are in line with numerous previous studies in similar rodent models consecutive long-term HFD^{10,27} HFD. To the best of our knowledge, only Ternacle et al.⁹ performed conventional and deformation imaging echocardiography in HFD mice. In accordance with our data, only regional myocardial was affected in the early stage (5th week), as reflected by significantly reduced TDI-derived radial SR, while EF was normal. Radial function was further depressed at 20 weeks, and mice displayed LV hypertrophy along with slight reduction in EF.

The first major finding from this work is the cardioprotective effects of vitamin D₃ in secondary prevention in T2DM with nascent DMCM. Indeed, to our knowledge, the only study assessing the cardiac effects of dietary supplementation with vitamin D in a model of HF-induced diabetes is the one published recently by Mazzone *et al.*²³. In their

experiment, Vitamin D supplementation alleviated the LV hypertrophy reported in mice fed a western regimen, in line with our own data. Any comparison with our study must however be made cautiously as they evaluated the effects of vitamin D supplementation in primary prevention, not secondary prevention, as we did. Because Mazzone *et al.* did not evaluate cardiac function, the present study is then, to our knowledge, the first one to report the beneficial effects of vitamin D supplementation on cardiac function in a rodent model of diet-induced T2DM. Not only EF and CS were preserved in DM+D mice but LS, which were decreased after 10 weeks diet, were completely restored after cholecalciferol supplementation. Taken together, these results bring to light a cardioprotective effect of vitamin D supplementation in T2DM. If further experimental studies will be needed to decipher the mechanisms underlying cholecalciferol beneficial effects, some previous studies, performed in type 1 diabetic rodent models, give us some insights. Indeed, the team led by Y.-J. Chen reported a restoration of EF in streptozotocin diabetic rats after 4 weeks of daily calcitriol subcutaneous injection, associated with decreased inflammation and expression of receptors for advanced glycation end-products^{21,28}. Another team further confirmed those results in a similar rat model, by reporting ameliorated EF and E/A ratio after calcitriol injections²². The authors associated those beneficial effects to activation of autophagy pathway²². Of note, in our study, together with the alleviation of cardiac hypertrophy, cholecalciferol abrogated the development of maladaptive concentric phenotype (e.g. normalization of interstitial fibrosis and AKT activation). Such anti-hypertrophic effects of vitamin D have been also previously reported in type 1 diabetes models^{22,28} or vitamin D receptor knock-out models (VDR KO) and have been linked to a decrease in renin expression, although this statement is not unanimous^{14,29}. On the other hand, VDR KO animals exhibit increased metalloproteinases 1/2 activity, together with decreased tissue inhibitors of metalloproteinases 1/3, indicating a role for VDR in regulating extracellular matrix turnover¹⁵, results that fit well with ours on interstitial fibrosis. Although we cannot here confirm nor exclude the involvement of the aforementioned processes in the alleviation of cardiac function impairments we observed, the characterization of cardiac lipid profile we carried out put forward a brand-new insight in the potentially involved processes.

The second salient novel finding of the present study was the normalization by cholecalciferol of the cardiac levels of the two lipotoxic species, ceramides and DAG.

This observation is of major interest because those two lipid forms have been shown to exert adverse effects on a broad range of processes^{4-6,13,30-33}.

Our knowledge regarding cardiac lipotoxicity arises mainly from transgenic models, with induction of massive lipid storage at non-physiological levels. Here, a diet-induced diabetes model was preferred for it replicates the etiology of T2DM and its associated risks factors in a more physiological way. In such a model, to what extent HFD is able to major cardiac lipid content and alter its profile and how this may affect cardiac function remains extremely poorly documented. Indeed, cardiac adiposity after HFD is frequently evaluated in animal models through myocardial lipid droplets or TG quantification, and data regarding cardiac lipid profile characterization, and more specifically DAG and ceramides, are sparser. Although a link between myocardial TG accumulation and altered cardiac function has been suggested in the past^{2,4,8}, it rather seems that TG accumulation is not deleterious per se, agreeing with data from the present study. Indeed, in transgenic mice with DGAT1 overexpression leading to massive cardiac TG storage but reduced ceramides and DAG content, cardiac function by echocardiography and heart catheterization was reported to be normal⁵. Similar results regarding cardiac function have been demonstrated in transgenic mice with cardiomyocyte-specific perilipin 5 overexpression favoring the formation and accumulation of lipid droplets³⁴. Overall, our data, including those after cholecalciferol supplementation, strongly speak in favor for a role of DAG and ceramides in the etiology of the observed myocardial impairments in DM mice. This is, to the best of our knowledge, established for the first time in a HFD rodent model that mimic human DMCM and agrees with previous studies using transgenic models. Indeed, using transgenic models of DGAT1 and/or ACS overexpression, allowing modulation of cardiac ceramides and DAG content, Liu et al. reported significant correlations between the levels of these two lipotoxic species with systolic and diastolic function assessed by cardiac catheterization⁵. In another transgenic model (LpL^{GPI}) of cardiac steatosis, pharmacological inhibition of ceramides synthesis led to an improvement of cardiac function³⁰, in line with our findings consecutive to cholecalciferol supplementation. Furthermore, phosphorylation of AKT, which was initially increased in LpL^{GPI} mice, was reduced to levels of wild-type mice consecutive to pharmacological treatment, agreeing with our own data. The functional abnormalities demonstrated by us and previous reports could originate from deleterious effects exerted by lipotoxic species at the cardiomyocyte level on insulin signaling, mitochondrial function, calcium handling and

sarcomere contractility, among others^{31–33,35}. They could also very likely be related to structural changes, as highlighted in figure 4. Agreeing with our data, DAG and ceramides are responsible for the development of myocardial interstitial fibrosis³⁶, on account in part of activation of pathological hypertrophy signaling pathway^{30,37}, as evidenced here from increased AKT phosphorylation (Figure 3c). Previous studies in various mice models with HF diet have demonstrated also that long-term chronic cardiac AKT activation contributed to pathological LV hypertrophy^{30,38}.

In conclusion, in a T2DM mouse model exhibiting nascent cardiomyopathy, this work brought to light the beneficial effects of cholecalciferol supplementation, in secondary prevention, on cardiac remodeling and function. Moreover, we reported for the first time that in such a model, vitamin D could modulate the myocardial levels of two major lipotoxic species, namely ceramides and DAG, a phenomenon that could potentially be involved in the observed cardioprotective effects of this vitamin. Further experimental studies will be needed to confirm these findings and explore the mechanisms underlying the cardiac effects of vitamin D; and clinical trials will have to be carried out to assess the clinical relevance of vitamin D supplementation regarding cardiac health in type 2 diabetic patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Platform 3A, funded by the European Regional Development Fund, the French Ministry of Research Higher Education and Innovation, the Provence-Alpes-Côte-d'Azur region, the Departmental Council of Vaucluse and the Urban Community of Avignon.

FUNDING

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

CONTRIBUTION STATEMENT

CP, JCM, CR, AM, JFL and PO contributed to the conception and design of the study; CP, JCM, CR, AM, CC, TB, JA, CD, BJ, NG, CR, SG, JFL and PO were involved in the data acquisition, analysis and interpretation; CP, JFL and PO were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content.

All authors reviewed/edited the manuscript and approved the final version.

PO is the guarantor of the present work.

ORCID

Philippe Obert <https://orcid.org/0000-0003-0472-6338>

Clothilde Philouze <https://orcid.org/0000-0002-0669-0263>

REFERENCES

1. Waddingham MT, Edgley AJ, Tsuchimochi H, et al. Contractile apparatus dysfunction early in the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy. *World J Diabetes* 2015; 6: 943–960.
2. van der Meer RW, Rijzewijk LJ, Diamant M, et al. The ageing male heart: myocardial triglyceride content as independent predictor of diastolic function. *European Heart Journal* 2008; 29: 1516–1522.
3. Hammer S, Snel M, Lamb HJ, et al. Prolonged Caloric Restriction in Obese Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Decreases Myocardial Triglyceride Content and Improves Myocardial Function. *Journal of the American College of Cardiology* 2008; 52: 1006–1012.
4. Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard MLS, et al. Cardiac Lipid Accumulation Associated with Diastolic Dysfunction in Obese Mice. *Endocrinology* 2003; 144: 3483–3490.
5. Liu L, Shi X, Bharadwaj KG, et al. DGAT1 Expression Increases Heart Triglyceride Content but Ameliorates Lipotoxicity. *J Biol Chem* 2009; 284: 36312–36323.
6. Glenn DJ, Wang F, Nishimoto M, et al. A Murine Model of Isolated Cardiac Steatosis Leads to Cardiomyopathy. *Hypertension* 2011; 57: 216–222.
7. Park S-Y, Cho Y-R, Kim H-J, et al. Unraveling the Temporal Pattern of Diet-Induced Insulin Resistance in Individual Organs and Cardiac Dysfunction in c57bl/6 Mice. *Diabetes* 2005; 54: 3530–3540.
8. Ouwens DM, Diamant M, Fodor M, et al. Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD36-mediated fatty acid uptake and esterification. *Diabetologia* 2007; 50: 1938–1948.
9. Ternacle J, Wan F, Sawaki D, et al. Short-term high-fat diet compromises myocardial function: a radial strain rate imaging study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2017; 18: 1283–1291.

10. Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, et al. Mice Long-Term High-Fat Diet Feeding Recapitulates Human Cardiovascular Alterations: An Animal Model to Study the Early Phases of Diabetic Cardiomyopathy. *PLoS ONE* 2013; 8: e60931.
11. Ng ACT, Delgado V, Bertini M, et al. Findings from Left Ventricular Strain and Strain Rate Imaging in Asymptomatic Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *The American Journal of Cardiology* 2009; 104: 1398–1401.
12. Zhang X, Wei X, Liang Y, et al. Differential Changes of Left Ventricular Myocardial Deformation in Diabetic Patients with Controlled and Uncontrolled Blood Glucose: A Three-Dimensional Speckle-Tracking Echocardiography–Based Study. *Journal of the American Society of Echocardiography* 2013; 26: 499–506.
13. Hankiewicz JH, Banke NH, Farjah M, et al. Early Impairment of Transmural Principal Strains in the Left Ventricular Wall After Short-Term, High-Fat Feeding of Mice Predisposed to Cardiac Steatosis. *Circ Cardiovasc Imaging* 2010; 3: 710–717.
14. Xiang W, Kong J, Chen S, et al. Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2005; 288: E125–E132.
15. Rahman A, Hershey S, Ahmed S, et al. Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2007; 103: 416–419.
16. Tishkoff DX, Nibbelink KA, Holmberg KH, et al. Functional Vitamin D Receptor (VDR) in the T-Tubules of Cardiac Myocytes: VDR Knockout Cardiomyocyte Contractility. *Endocrinology* 2008; 149: 558–564.
17. Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Low 25-Hydroxyvitamin D and Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Cohort Study and Metaanalysis. *Clinical Chemistry* 2013; 59: 381–391.

18. Chen Y, Zhao C-T, Zhen Z, et al. Association of myocardial dysfunction with vitamin D deficiency in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications* 2014; 28: 286–290.
19. Heidari B, Nargesi AA, Hafezi-Nejad N, et al. Assessment of serum 25-hydroxy vitamin D improves coronary heart disease risk stratification in patients with type 2 diabetes. *American Heart Journal* 2015; 170: 573-579.e5.
20. Green JJ, Robinson DA, Wilson GE, et al. Calcitriol modulation of cardiac contractile performance via protein kinase C. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2006; 41: 350–359.
21. Lee T-W, Kao Y-H, Lee T-I, et al. Calcitriol modulates receptor for advanced glycation end products (RAGE) in diabetic hearts. *Int J Cardiol* 2014; 173: 236–241.
22. Wei H, Qu H, Wang H, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 prevents the development of diabetic cardiomyopathy in type 1 diabetic rats by enhancing autophagy via inhibiting the β -catenin/TCF4/GSK-3 β /mTOR pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Epub ahead of print 16 February 2017. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.02.007.
23. Mazzone G, Morisco C, Lembo V, et al. Dietary supplementation of vitamin D prevents the development of western diet-induced metabolic, hepatic and cardiovascular abnormalities in rats. *United European Gastroenterol J* 2018; 6: 1056–1064.
24. Marziou A, Philouze C, Couturier C, et al. Vitamin D Supplementation Improves Adipose Tissue Inflammation and Reduces Hepatic Steatosis in Obese C57BL/6J Mice. *Nutrients*; 12. Epub ahead of print 28 January 2020. DOI: 10.3390/nu12020342.
25. Bonnet L, Karkeni E, Couturier C, et al. Gene Expression Pattern in Response to Cholecalciferol Supplementation Highlights Cubilin as a Major Protein of 25(OH)D Uptake in Adipocytes and Male Mice White Adipose Tissue. *Endocrinology* 2018; 159: 957–966.

26. Enomoto M, Ishizu T, Seo Y, et al. Myocardial dysfunction identified by three-dimensional speckle tracking echocardiography in type 2 diabetes patients relates to complications of microangiopathy. *Journal of Cardiology* 2016; 68: 282–287.
27. Brainard RE, Watson LJ, DeMartino AM, et al. High Fat Feeding in Mice Is Insufficient to Induce Cardiac Dysfunction and Does Not Exacerbate Heart Failure. *PLoS One*; 8. Epub ahead of print 18 December 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0083174.
28. Lee T-I, Kao Y-H, Chen Y-C, et al. Cardiac metabolism, inflammation, and peroxisome proliferator-activated receptors modulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in diabetic rats. *International Journal of Cardiology* 2014; 176: 151–157.
29. Simpson RU, Hershey SH, Nibbelink KA. Characterization Of Heart Size And Blood Pressure In The Vitamin D Receptor Knockout Mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 521–524.
30. Park T-S, Hu Y, Noh H-L, et al. Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. *Journal of Lipid Research* 2008; 49: 2101–2112.
31. Zhang L, Ussher JR, Oka T, et al. Cardiac diacylglycerol accumulation in high fat-fed mice is associated with impaired insulin-stimulated glucose oxidation. *Cardiovasc Res* 2011; 89: 148–156.
32. Parra V, Moraga F, Kuzmicic J, et al. Calcium and mitochondrial metabolism in ceramide-induced cardiomyocyte death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2013; 1832: 1334–1344.
33. Simon JN, Chowdhury SAK, Warren CM, et al. Ceramide-mediated depression in cardiomyocyte contractility through PKC activation and modulation of myofilament protein phosphorylation. *Basic Research in Cardiology*; 109. Epub ahead of print November 2014. DOI: 10.1007/s00395-014-0445-6.
34. Wang H, Sreenivasan U, Gong D-W, et al. Cardiomyocyte-specific perilipin 5 overexpression leads to myocardial steatosis and modest cardiac dysfunction1. *J Lipid Res* 2013; 54: 953–965.

35. Battiprolu PK, Gillette TG, Wang ZV, et al. Diabetic Cardiomyopathy: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Drug Discov Today Dis Mech* 2010; 7: e135–e143.
36. Shea BS, Tager AM. Sphingolipid Regulation of Tissue Fibrosis. *The Open Rheumatology Journal*; 6. Epub ahead of print 15 June 2012. DOI: 10.2174/1874312901206010123.
37. Chen C-L, Lin C-F, Chang W-T, et al. Ceramide induces p38 MAPK and JNK activation through a mechanism involving a thioredoxin-interacting protein-mediated pathway. *Blood* 2008; 111: 4365–4374.
38. Perry RA, Brown LA, Haynie WS, et al. Cardiac hypertrophy in sarcopenic obese C57BL/6J mice is independent of Akt/mTOR cellular signaling. *Experimental Gerontology* 2018; 111: 122–132.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Characterization of the DM mouse model and effect of cholecalciferol supplementation on the model phenotype. *CTRL* control group, *DM* type 2 diabetic mice, *DM+D* vitamin D-supplemented DM mice, *BM* body mass. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ††† $p < 0.001$ vs. *CTRL*. a) Mice *BM* evolution throughout the protocol and epididymal (visceral) adipose fat mass, indexed to *BM*, at the 10th and 25th weeks of protocol. b) Mice plasma assays (fasting glycemia, triglycerides, insulin and AUC of insulin tolerance test, free vitamin D₃ & 25(OH)D₃ and calcium) at the 10th and 25th weeks of protocol.

Figure 2. Effect of cholecalciferol supplementation on cardiac remodeling and function. *CTRL* control group, *DM* type 2 diabetic mice, *DM+D* vitamin D-supplemented DM mice, *LSR_{s/-d}* systolic/-diastolic longitudinal strain rate, *CSR_{s/-d}* systolic/-diastolic circumferential strain rate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ††† $p < 0.001$ vs. *CTRL*. a) Echocardiographic follow-up of cardiac remodeling. b) Cardiac hypertrophy appraisal by heart weight/tibia length ratio at the 10th and 25th weeks of protocol. c) Cardiomyocyte size at the 25th week of protocol. d) Echocardiographic follow-up of global systolic function, estimated from ejection fraction. e) Examples of longitudinal strain curves obtained from VevoLab. f) Longitudinal and circumferential strains evolution throughout the protocol. g) Longitudinal and circumferential systolic and diastolic strain rates, at the 25th week of protocol. Values are expressed as marginal means \pm SEM.

Figure 3. Effect of cholecalciferol supplementation on myocardial fibrosis and AKT phosphorylation. *CTRL* control group, *DM* type 2 diabetic mice, *DM+D* vitamin D-supplemented DM mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. a) Myocardial fibrosis histological assessment and collagen mRNA expression at the 25th week of protocol. b) Correlations between longitudinal & circumferential strains and fibrotic area. c) AKT phosphorylation status at the 25th week of protocol.

Figure 4. Effect of cholecalciferol supplementation on myocardial lipid profile. Data at the 10th (a) & 25th (b) weeks of protocol and detailed quantification of ceramides (c) & diacylglycerols (d) at the 25th week of protocol. *CTRL* control

group, *DM* type 2 diabetic mice, *DM+D* vitamin D-supplemented DM mice, *MG* monoradylglycerols, *DAG* diacylglycerols, *TG* triacylglycerols, *PC* glycerophosphocholines, *PE* glycerophosphoethanolamines, *PG* glycerophosphoglycerols, *PI* glycerophosphoinositols, *PS* glycerophosphoserines, *Cer* ceramides, *SL* sphingolipids, *CoQ* ubiquinones, *Chole.* cholesterols, *Chole.E.* cholesterylesters. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

FIGURES

Figure 1

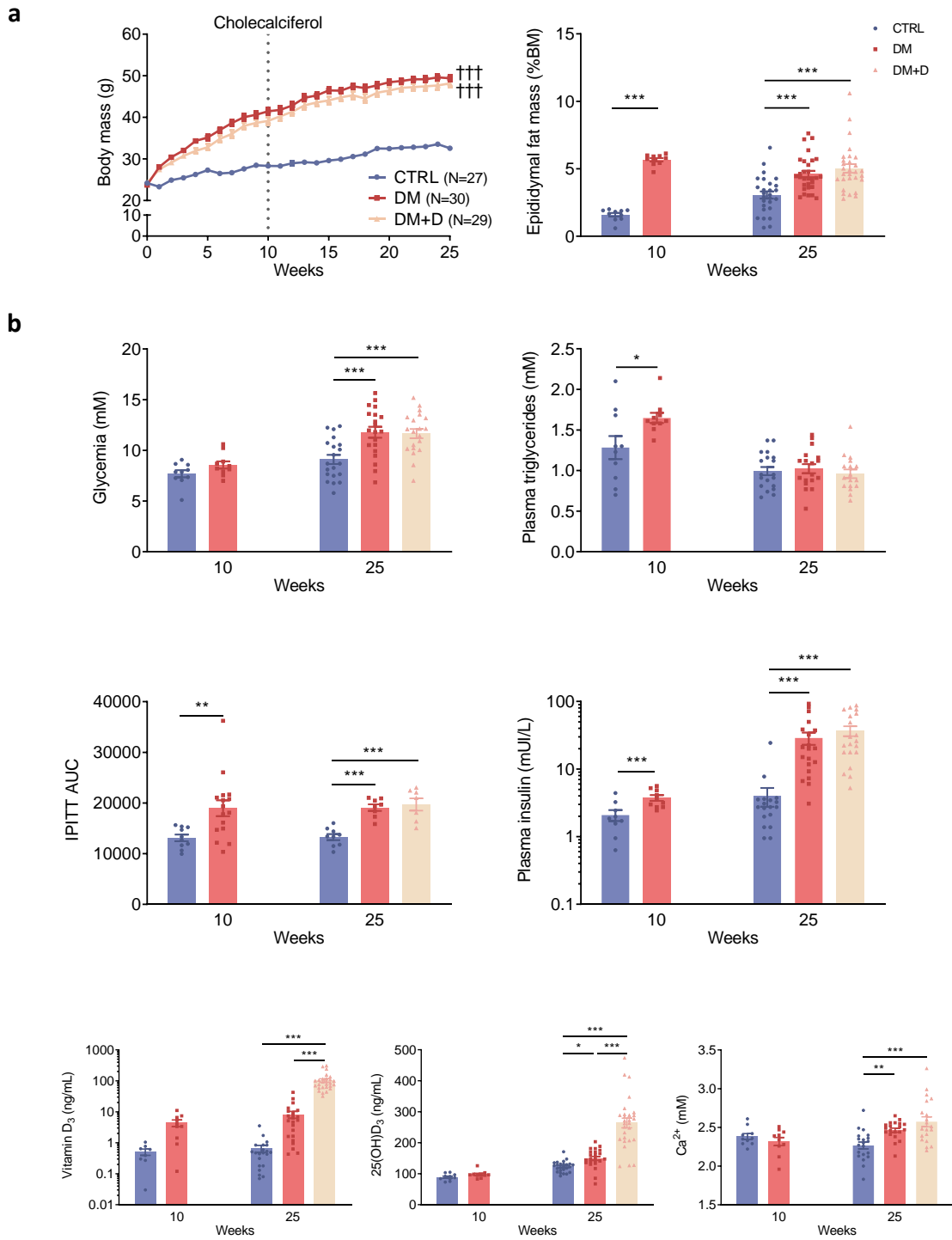


Figure 2

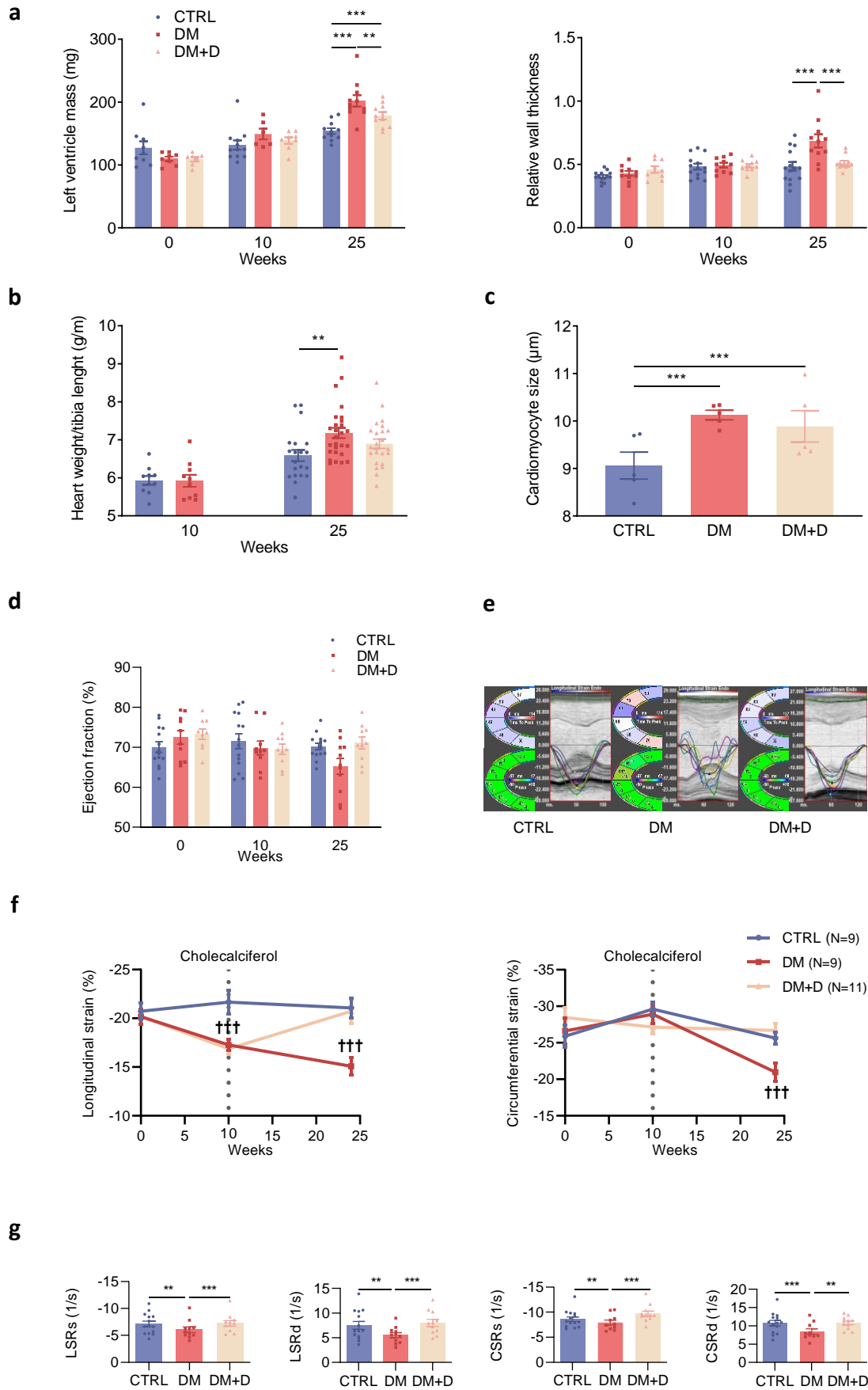
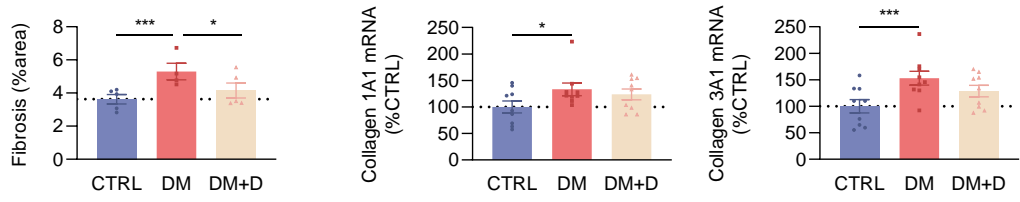
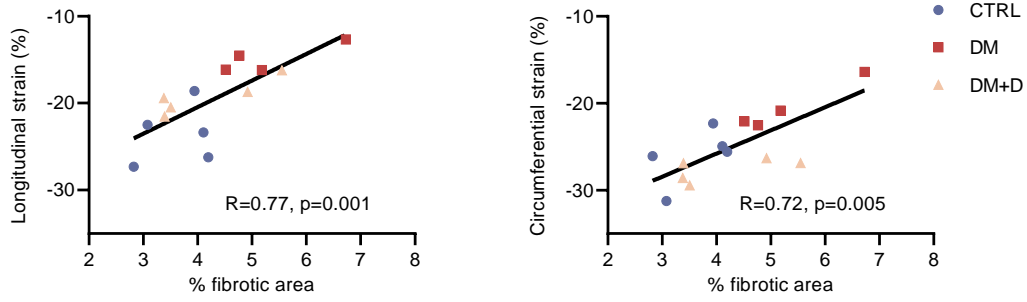


Figure 3

a



b



c

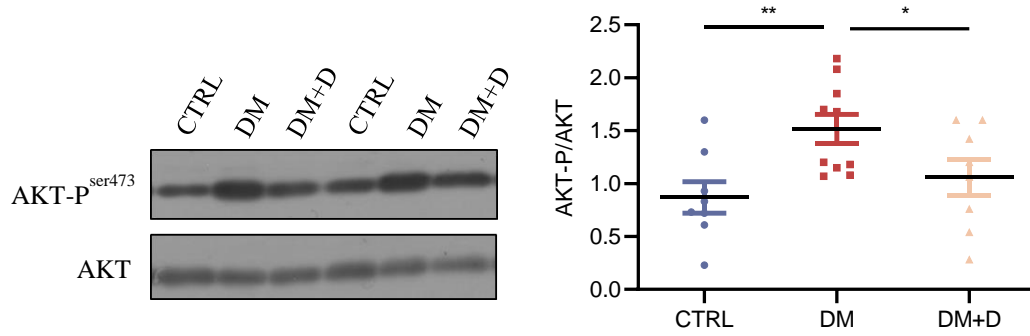
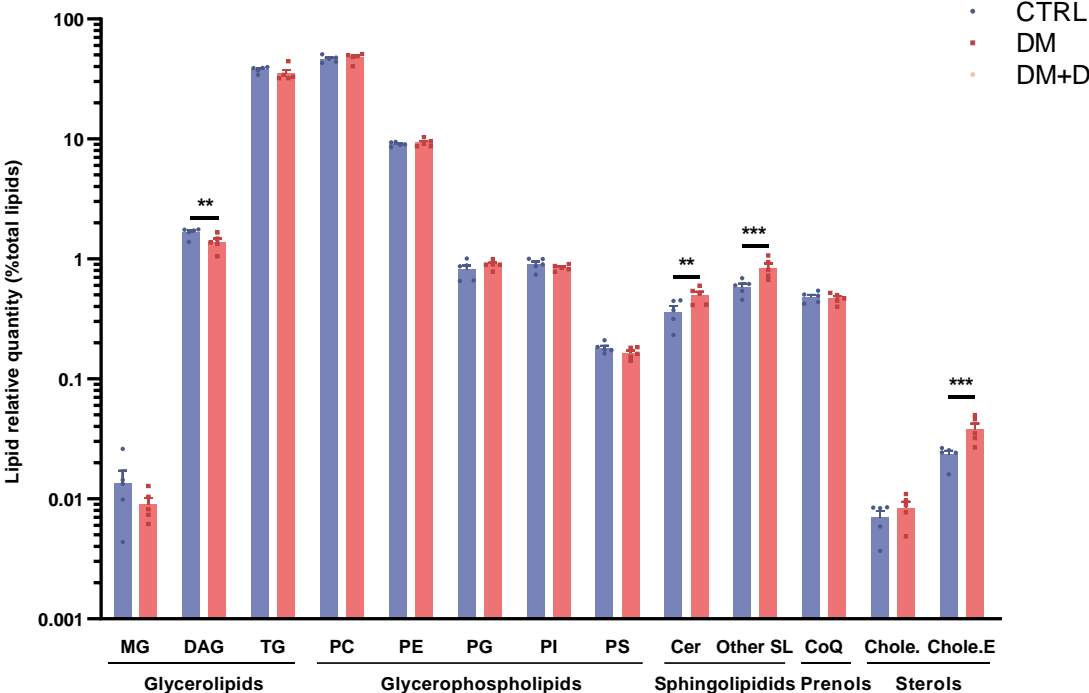
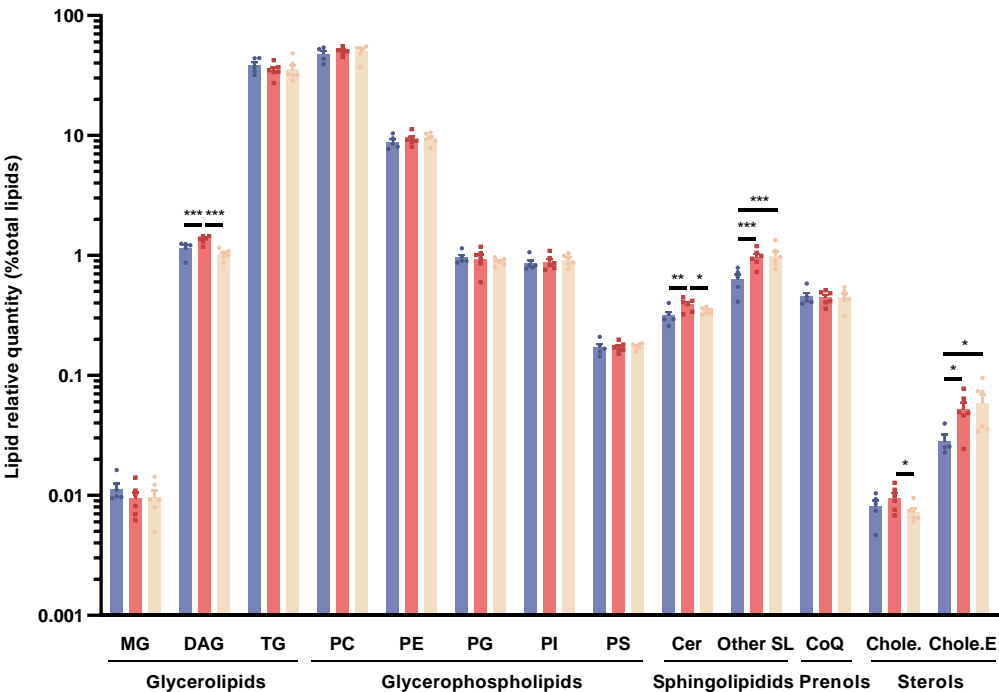


Figure 4

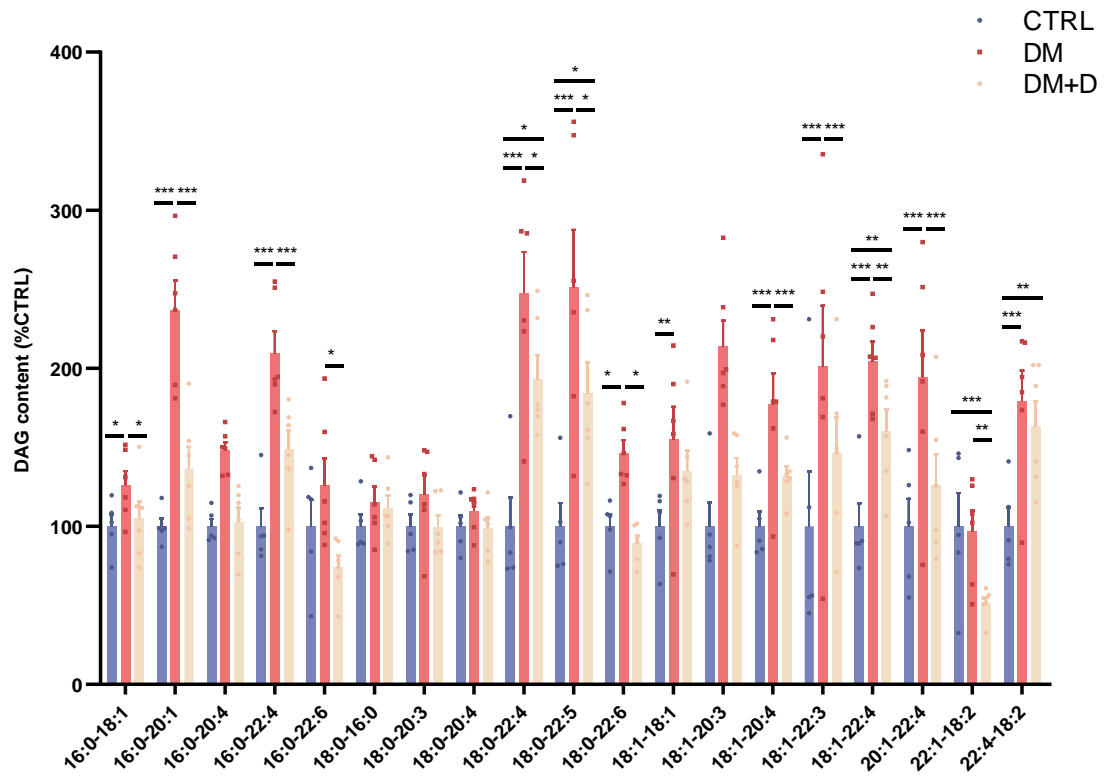
a



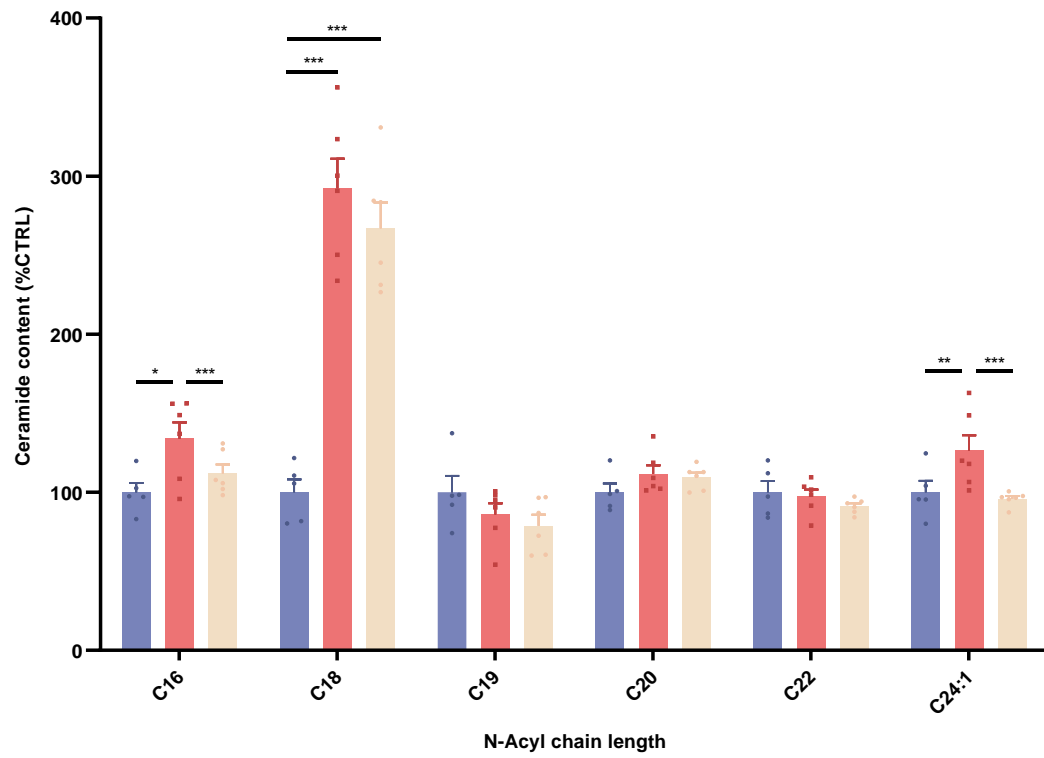
b

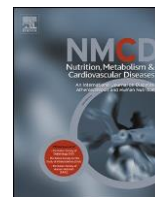


c



d





SHORT COMMUNICATION

Artificial sweeteners impair endothelial vascular reactivity: Preliminary results in rodents

Sydney Risdon ^a, Grégory Meyer ^a, Alexandra Marziou ^a, Catherine Riva ^a, Matthieu Roustit ^{b,c}, Guillaume Walther ^{a,*}

^a Avignon University, LAPEC EA4278, F-84000, Avignon,

France ^b Univ. Grenoble Alpes, Inserm U1042, 38000

Grenoble, France

^c Grenoble Alpes University Hospital, Clinical Pharmacology, Inserm CIC1406, 38000 Grenoble, France

Received 30 August 2019; received in revised form 24 January 2020; accepted 27 January 2020

Handling Editor: A. Siani Available online 12 February 2020



KEYWORDS

Artificial sweeteners;
Vascular reactivity;
Endothelium;
Metabolic disease

Abstract Background and aims: Prospective epidemiological studies highlighted recently the link between artificial sweeteners (AS) consumption and the risk of developing cardiometabolic diseases. However, underlying mechanisms remain unknown. Thus, the aim of this preliminary study was to characterize, in a healthy rat population, the effect of chronic AS consumption on body composition and vascular function, an early marker for cardiovascular disease.

Methods and results: Healthy Wistar rats followed a 10-week standard diet including the consumption of water sweetened or not with a sucralose/acesulfame potassium solution at different concentrations: for moderate consumption at 1 and 2 mg.kg¹.day¹, respectively or high intake at 15 and 15 mg.kg¹.day¹ for both molecules (acceptable daily intake). Body fat composition has been evaluated and ex vivo aortic vasomotor function has been investigated with a pharmacological approach.

Conclusion: Both groups of AS-treated rats showed a significant increase in subcutaneous and perirenal adipose tissue mass storage, without changes in total body mass. However, rats that have consumed AS at Acceptable Daily Intake (ADI) concentration revealed a significant vascular endothelial dysfunction compared to other groups. These results are interesting because they will help to better explain the observed increase in cardiometabolic risk.

^a 2020 The Italian Society of Diabetology, the Italian Society for the Study of Atherosclerosis, the Italian Society of Human Nutrition, and the Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Cardiovascular disease (CVD) is the single leading cause of death among those with obesity and type 2 diabetes (T2D) [1]. Although these worsening trends are driven by a complex interaction between numerous lifestyle and

socioeconomic factors, it is now well accepted that habitual excess sugar consumption is the dietary factor that is most consistently found to be associated with obesity or T2D [2,3]. Moreover, Malik et al. recently reported a positive, dose-dependent association between sugary drinks consumption and CVD mortality [4].

As an alternative, artificial sweeteners (AS) have been increasingly used in food and beverages to replace highenergy, added sugars. By providing consumers with products that have a sweet taste and low-energy content,

* Corresponding author. Avignon University, Faculty of Sciences LAPEC EA4278, 74 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France. Fax: þ334 90 16 29 01.

E-mail address: guillaume.walther@univ-avignon.fr (G. Walther).

AS appear to be the magic bullet to enhance weight loss and reduce cardiometabolic diseases. Indeed, AS (e.g. sucralose (Su), acesulfame potassium (AceK), saccharin, aspartame or stevia among others) are products that maintain perceived sweetness, without increasing caloric intake [5]. As a consequence, AS consumption does not acutely significantly change blood glucose concentration in healthy adults or in those with T2D [6]. These results encouraged health authorities to recommend AS consumption, as part of a weight loss strategy in overweight and obese individuals, and in patients with glucose intolerance or diabetes [7]. In addition, the European Food Safety Authority and the United States Food and Drug Administration, have approved several AS safe for human consumption [8].

Despite the apparent neutral effects of AS on blood glucose, there is still a strong debate questioning their physiological inactivity and their long-term effect on human health [9]. Indeed, several recent epidemiological and descriptive studies have reported significant associations between the consumption of AS and weight gain, increased incidence of T2D and CV events [9e11]. Recently, an increased risk in total and CVD mortality has been identified in women consuming four or more AS beverage servings per day, but not in mixed-gender subjects drinking moderately [4,12]. However, the interpretation of these data is difficult because AS are typically consumed by individuals already suffering from obesity or cardiometabolic conditions. Very few prospective, randomized, controlled studies have assessed the effect of these molecules consumption on human health, highlighting the urgent need for more research into this question [13].

As the mechanisms through which artificial sweetened beverages (ASB) may be harmful on cardiovascular health remain unknown, we conducted a preliminary experimental study in rats focusing on the effects of chronic ASB consumption on vascular function. Indeed, vascular dysfunction is a well-recognized, early biomarker of atherosclerosis and a key contributor to the onset and progression of CVD. It could therefore explain health issues associated with AS consumption.

All animal experiments were performed according to the European Parliament Directive and approved by the local research ethics committee. Adult Wistar rats (Janvier Labs, France) underwent 10 weeks of a normal chow diet (A04, SAFE, France), supplemented by ad libitum water or ASB. Su and AceK, both high intensity sweeteners were used in this protocol because they are the most used sweeteners in overall foods and beverages (accounting for 62% of the global artificial sweetener market). To assess the health effect of a daily consumption of AS, we provided Su and AceK at low (LD-ASB) concentrations, closely following Young et al. study that reported ASB metabolic impact in human and corresponding to moderate user consumption (1 and 2 mg.kg¹.day¹, respectively) [14]. ASB effect at a high (HD-

ASB) dose was also studied, reaching the maximal limit of ADI, (15 mg.kg¹.day¹ for both Su

and AceK), respectively [15]. At the end of the diet period, rats were sacrificed to collect adipose tissues and aorta (Fig. 1A). Aortic rings (2 mm) were placed into an isometric force transducer. After a 1-h incubation in either normoglycemic (NG) (11 mM) or hyperglycemic condition (HG) (100 mM), rings were constricted with phenylephrine and endothelium-dependent vasodilatation was tested using increasing doses of Acetylcholine. For comparison of multiple experimental conditions, analysis of variance (ANOVA) or repeated-measures ANOVA followed by Tukey's test were used. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was done using GraphPad Prism version 8 (GraphPad Software Inc.).

No difference was observed regarding vasodilatory function in a NG condition. However, after 1-h hyperglycemic stress, endothelial function in both ASB groups was impaired compared to control group, although statistical significance was reached only with HD-ASB (Fig. 1B). When expressed as a difference between NG and HG conditions, we observed a two-fold higher decrease in maximal relaxation in HD-ASB than in water group (Fig. 1C). Interestingly, we reported significant changes in adipose tissue deposition of both ASB groups, with increased subcutaneous and visceral perirenal fat mass (Fig. 1E), while total body weight remained comparable between the three groups (Fig. 1D).

As part of a weight loss strategy in overweight and obese individuals and in patients with glucose intolerance or type 2 diabetes, several health authorities or medical practitioners recommend the use of ASB consumption [7]. Nevertheless, there is no consensus regarding the safety of these molecules and further studies are needed to understand their metabolic impact on healthy subjects or patients with cardiometabolic disease. Our experiments conducted in rats showed, for the first time, that commonly used AS in food or drinks (Su and AceK) induced a decrease in endothelium-dependent vascular function in a HG condition. This is of high interest, because we recently demonstrated that acute hyperglycemic stress induced by a commercial sugary drink impaired vascular endothelial function reactivity in healthy young adults; thus confirming the high sensitivity of vascular function to the disruption of glucose metabolism [16]. Therefore, the present study suggests that AS consumption could increase vascular dysfunction in response to a glucose load. Moreover, this vascular dysfunction was also associated with a significant modification in adipose tissue repartition in the body, supporting the hypothesis that AS are able to affect body homeostasis, potentially explaining the increase in cardiometabolic risk observed in epidemiological studies [9e11]. However, the literature is not clear about AS effects on adipose tissue, describing deleterious or neutral effects depending on the study [17,18]. In human overweight and obese population, recent work described positive effects of AS, by limiting weight gain [19]. Whether these changes are found in humans by a direct or indirect effect of AS on vascular function, and whether age and sex may affect the

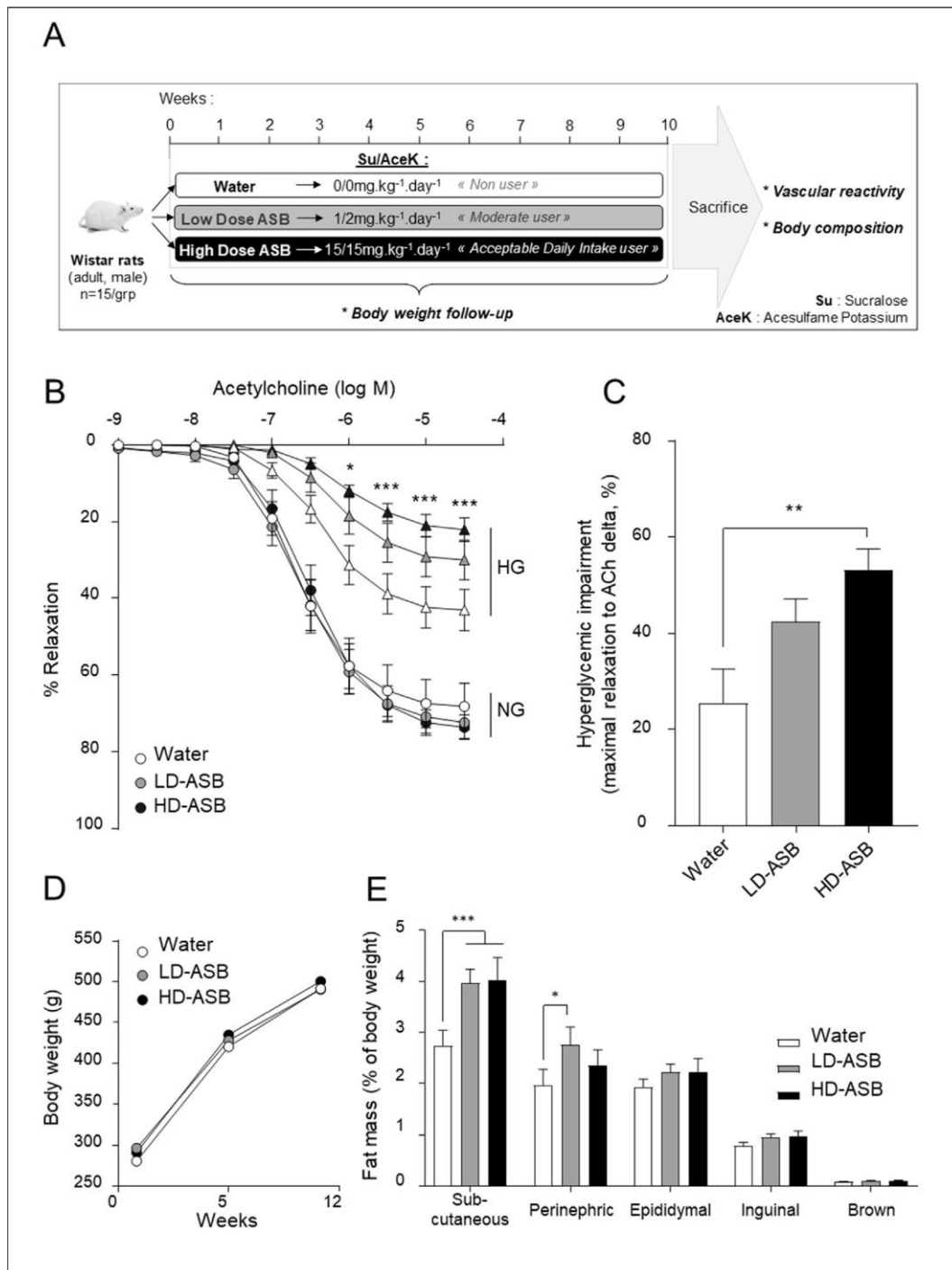


Figure 1 Impact of chronic artificial sweeteners consumption, at moderate and Acceptable Daily Intake, on endothelial dysfunction during acute hyperglycemia. A) Diet protocol for rat fed with normal chow and that consumed water supplemented or not (Water) with artificial sweeteners at low (LD-ASB) or high (HD-ASB) dose, respectively, mimicking moderate and Acceptable Daily Intake consumption. After 10 weeks of diet and body weight follow-up, animals are sacrificed for vascular reactivity and body composition assessment. B) Endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine (ACh) in rat aorta following 1 h of NG condition (11 mM glucose) or hyperglycemic stress (100 mM glucose). C) Maximal relaxation delta between NG and HG condition. D) Body weight following 10-week diet. E) Body weight percentage of visceral (perirenal, epididymal, and inguinal), subcutaneous, and brown adipose tissue. Data are represented as Mean SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

discrepancies observed between

human and animal studies suggest that more studies are needed to understand AS cardiovascular effects in a healthy population, but also in patients with metabolic disease.

Acknowledgements

Sydney Risdon is supported by a Provence Alpes Cote d'Azur Régional PhD grant.

References

- [1] NCD Risk Factor Collaboration. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4\$4 million participants. *Lancet Lond Engl* 2016;387:1513e30. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00618-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00618-8).
- [2] Arsenaault BJ, Lamarche B, Després J-P. Targeting overconsumption of sugar-sweetened beverages vs. Overall poor diet quality for cardiometabolic diseases risk prevention: place your bets! *Nutrients* 2017;9. <https://doi.org/10.3390/nu9060600>. pii:E600.
- [3] Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Després J-P, Hu FB. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation* 2010;121:1356e64. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.876185>.
- [4] Malik VS, Li Y, Pan A, De Koning L, Schernhammer E, Willett WC, et al. Long-term consumption of sugar-sweetened and artificially sweetened beverages and risk of mortality in US adults. *Circulation* 2019;139:2113e25. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037401>.
- [5] Wang Q-P, Browman D, Herzog H, Neely GG. Non-nutritive sweeteners possess a bacteriostatic effect and alter gut microbiota in mice. *PLoS One* 2018;13:e0199080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199080>.
- [6] Tucker RM, Tan S-Y. Do non-nutritive sweeteners influence acute glucose homeostasis in humans? A systematic review. *Physiol Behav* 2017;182:17e26. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.09.016>.
- [7] Shvide-Slavin C, Swift C, Ross T. Nonnutritive sweeteners: where are we today? *Diabetes Spectr* 2012;25:104e10. <https://doi.org/10.2337/diaspect.25.2.104>.
- [8] EU Sci Hub - Eur Comm. Sugars and sweeteners. 2017. <https://ec.europa.eu/jrc/en/health-knowledge-gateway/promotionprevention/nutrition/sugars-sweeteners>. [Accessed 25 March 2019].
- [9] Pepino MY. Metabolic effects of non-nutritive sweeteners. *Physiol Behav* 2015;152:450e5. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.06.024>.
- [10] Azad MB, Abou-Setta AM, Chauhan BF, Rabbani R, Lys J, Copstein L, et al. Nonnutritive sweeteners and cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *Can Med Assoc J* 2017;189: 929e39. <https://doi.org/10.1503/cmaj.161390>.
- [11] Fagherazzi G, Gusto G, Affret A, Mancini FR, Dow C, Balkau B, et al. Chronic consumption of artificial sweetener in packets or tablets and type 2 diabetes risk: evidence from the E3N-European prospective investigation into cancer and nutrition study. *Ann Nutr Metab* 2017;70:51e8. <https://doi.org/10.1159/000458769>.
- [12] Mossavar-Rahmani Yasmin, Kamensky Victor, Manson JoAnn E, Silver Brian, Rapp Stephen R, Haring Bernhard, et al. Artificially sweetened beverages and stroke, coronary heart disease, and allcause mortality in the Women's health initiative. *Stroke* 2019;50: 555e62. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.023100>.
- [13] Risdon S, Roustit M, Meyer G, Walther G. Is fasting blood glucose a reliable parameter to investigate the effect of non-nutritive sweeteners on glucose metabolism? *Eur J Clin Nutr* 2018;73: 331e2. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0366-9>.
- [14] Young RL. Impact of artificial sweeteners on glycaemic control in healthy humans. 2017. <http://www.abstractsonline.com/pp8/#!/4294/presentation/4521>. [Accessed 28 November 2017].
- [15] Schiffman SS, Rother KI. Sucralose, A synthetic organochlorine sweetener: overview of biological issues. *J Toxicol Environ Health Part B* 2013;16:399e451. <https://doi.org/10.1080/10937404.2013.842523>.
- [16] Loader J, Meziat C, Watts R, Lorenzen C, Sigaufo-Roussel D, Stewart S, et al. Effects of sugar-sweetened beverage consumption on microvascular and macrovascular function in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37:1250e60. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308010>.
- [17] Glendinning JI, Hart SA, Lee H, Maleh J, Ortiz G, Sang Ryu Y, et al. Low calorie sweeteners cause only limited metabolic effects in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2019;318:70e80. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00245.2019>.
- [18] Sánchez-Tapia M, Martínez-Medina J, Tovar AR, Torres N. Natural and artificial sweeteners and high fat diet modify differential taste receptors, insulin, and TLR4-mediated inflammatory pathways in adipose tissues of rats. *Nutrients* 2019;11. <https://doi.org/10.3390/nu11040880>. pii:E880.
- [19] Higgins KA, Mattes RD. A randomized controlled trial contrasting the effects of 4 low-calorie sweeteners and sucrose on body weight in adults with overweight or obesity. *Am J Clin Nutr* 2019; 109:1288e301. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy381>.

Résumé

L'obésité est une maladie pandémique résultant de changements comportementaux dus à la modernisation de notre société actuelle, comprenant une augmentation de l'inactivité physique et une surconsommation d'aliments riches en graisse et en sucre mais également pauvres en micronutriments. Dans ce contexte, cette thèse a pour objectif d'évaluer les effets de l'exercice physique associé à la supplémentation en vitamine D en prévention tertiaire dans un modèle expérimental d'obésité. Tout d'abord, la consommation du régime obésogène a conduit au développement de l'obésité caractérisée par une augmentation de l'adiposité, une accumulation de lipides ectopiques dans le foie ainsi qu'à la mise en place d'une résistance à l'insuline et d'une inflammation. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'effet de la vitamine D sur ces différents événements rencontrés au cours de l'obésité. Bien que nous n'ayons pas mis en évidence d'effet de la supplémentation en vitamine D sur les paramètres morphologiques, nous avons montré une baisse de l'inflammation du tissu adipeux par la limitation d'expression des chimiokines et de l'infiltration lipidique au niveau hépatique accompagnée d'une baisse d'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse.

Le deuxième objectif de cette thèse a été d'étudier les effets combinés de la supplémentation en vitamine D et de l'exercice physique volontaire. Contrairement à ce qui a été retrouvé par la supplémentation en vitamine D seule, l'exercice physique a induit une limitation de la prise de poids, accompagnée d'une réduction de l'adiposité médiée par une baisse de l'hypertrophie adipocytaire. De plus, la double intervention a permis de restaurer la sensibilité à l'insuline et d'abolir totalement l'infiltration lipidique au niveau hépatique. Ceci pourrait être expliqué par la diminution de l'inflammation adipocytaire et de la réduction d'infiltration macrophagique retrouvée à la fois dans le tissu adipeux et dans le foie. Ainsi, nos résultats démontrent pour la première fois l'intérêt de coupler l'exercice physique à la supplémentation en vitamine D pour lutter contre l'obésité et désordres métaboliques associés.

Mots clés : obésité, stéatose hépatique, vitamine D, exercice physique, prévention tertiaire.

Abstract

Obesity is a pandemic disease arising from behavioral and social changes which are driven by modernization of actual society. These changes include an increase of physical inactivity and overconsumption of food rich in fat and sugar but also poor in micronutrients. In this context, the aim of this thesis was to evaluate physical exercise and vitamin D supplementation effects in tertiary prevention on an experimental model of obesity. First, obesogenic diet consumption led to obesity development characterized by increased adiposity, ectopic lipid accumulation in the liver as well as insulin resistance and inflammation. Firstly, we investigate vitamin D supplementation on these events occurring during obesity. While we did not observe modification of morphological parameters by vitamin D supplementation, we demonstrated that vitamin D supplementation decreased adipose tissue inflammation by limiting chemokine expression and hepatic lipid infiltration accompanied by decreased gene expression involved in lipogenesis.

The second objective of this thesis was to investigate the combined effects of vitamin D supplementation and voluntary physical exercise. Unlike to what we observed by vitamin D supplementation alone, physical exercise induced a limitation in weight gain, accompanied by a reduction in adiposity mediated by decreased adipocyte hypertrophy. In addition, the double intervention restored insulin sensitivity and completely abolished hepatic lipid infiltration. This could be explained by decreased adipocyte inflammation and decreased macrophage infiltration found in both adipose tissue and liver. Thus, our results demonstrated for the first time the interest of combining physical exercise and vitamin D supplementation to fight obesity and associated metabolic disorders.

Keywords : obesity, hepatic steatosis, vitamin D , physical exercise, tertiary prevention.