

## **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.**

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

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

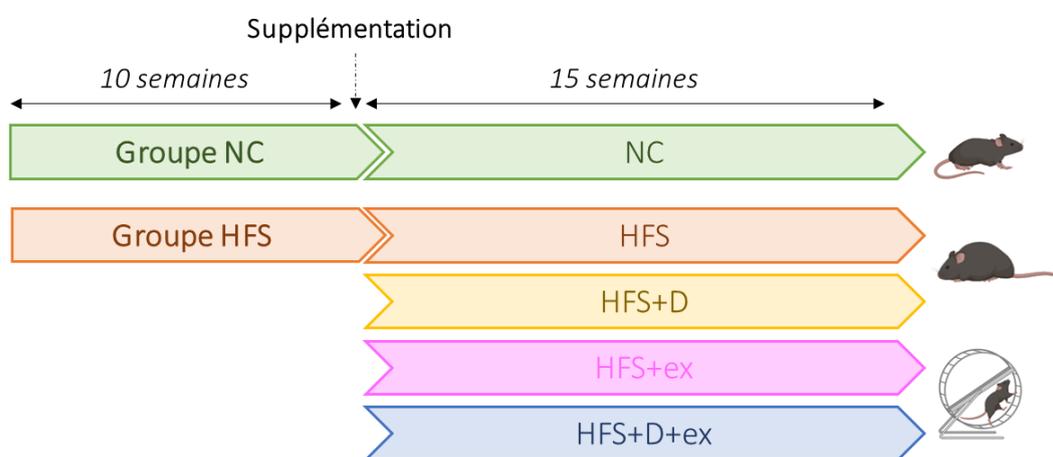


Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées conformément aux Directives Parlementaires Européennes 2013/63/EU (N°CEEA-00322.03) et ont été approuvées par le comité d'évaluation local pour l'expérimentation animale (2017110611453051-RIVA).

## 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).

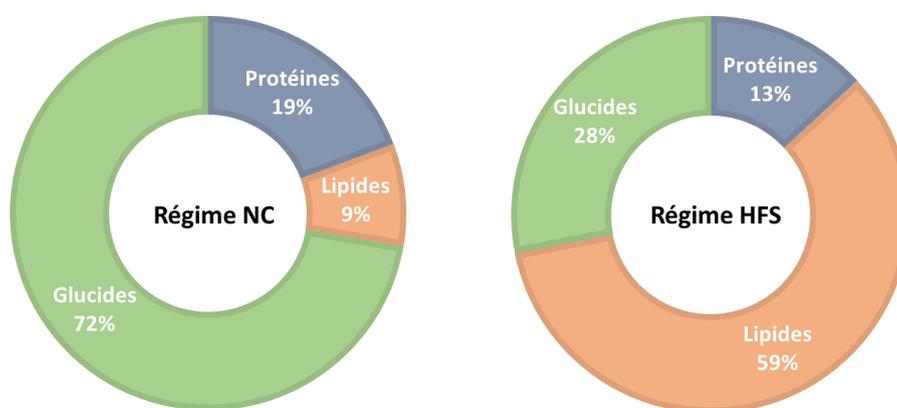
Les expérimentations ont été réalisées sur des souris c57bl/6j âgées de 8 semaines (n=110) et ont été hébergées en animalerie dans des conditions contrôlées avec un cycle de 12 heures lumière-obscurité, avec une humidité avoisinant les 60% ainsi qu'une température d'environ 21 °C. Les souris ont eu un 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 D<sub>3</sub> (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  $1 \text{ UI.kg}^{-1}$  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  $7 \text{ m.min}^{-1}$  puis de niveaux croissants de  $4 \text{ m.min}^{-1}$  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  $-80^\circ\text{C}$  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  $-80^\circ\text{C}$  pour analyse biochimique et moléculaire.

## **4. Mesure des concentrations plasmatiques de vitamine D<sub>3</sub>**

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 D<sub>3</sub>. 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.

