



Faculté des sciences
médicales et paramédicales
Aix-Marseille Université



Marseille
Medical
Genetics



Inserm
La science pour la santé
From science to health



Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED62)
UMR 1263 INSERM / 1260 INRA / AMU Centre de Recherche en CardioVasculaire et Nutrition
UMR 1251 Centre de Génétique Médicale de Marseille

THESE

Présentée et publiquement soutenue par

Eva Seipelt

En vue de l'obtention du grade de Docteur d'Aix-Marseille Université

Spécialité « Génétique Humaine et Médicale »

Impacts d'une carence maternelle en vitamine D sur le développement cardiaque et le métabolisme de la descendance

Soutenue le 17 Décembre 2019

Composition du jury :

Mme. Agnès VINET-JULLIAN, Professeure des Universités, Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire, Université d'Avignon

Mme. Sophie NADAUD, Chargée de Recherche, Unité de recherche sur les maladies cardiovasculaires et métabolique, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière Paris

M. Stéphane HATEM, Professeur des Universités – Praticien hospitalier, Unité de recherche sur les maladies cardiovasculaires et métabolique, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière Paris

Mme Nathalie VIGUERIE, Chargée de Recherche, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaire, Université de Toulouse III Paul Sabatier

Mme Lucile MIQUEROL, Chargée de Recherche, Institut de Biologie du Développement de Marseille, AMU

Directeurs de thèse :

M. Jean-François LANDRIER, Directeur de Recherche, Centre de Recherche en Cardiovasculaire et Nutrition, AMU

M. Michel PUCEAT, Directeur de Recherche, Centre de Génétique Médicale de Marseille, AMU

Remerciements

Je tiens à remercier le Pr Marie-Christine Alessi, directrice du « Centre de Recherche en Cardiovasculaire et Nutrition » pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent ensuite à mes directeurs de thèse, le Dr Jean-François Landrier et le Dr. Michel Puceat pour avoir co-dirigé cette thèse et m'avoir permis de la réaliser dans les meilleures conditions.

Plus précisément, je tiens à remercier le Dr Jean-François Landrier pour m'avoir encadrée ces trois dernières années. Tu as réussi à instaurer un climat convivial et de proximité dans notre groupe où l'entraide est de mise. C'était un bonheur de travailler chaque jour dans ces conditions qui sont, j'en suis certaine, plus que rares dans le secteur professionnel. Je te remercie d'avoir su te rendre disponible pour toutes les interrogations que j'ai pu avoir au cours de ces trois ans. Merci pour tous ces échanges et pour avoir eu un encadrement sans failles.

Je remercie également le Dr Michel Puceat pour m'avoir donné la chance d'intégrer son équipe dès mon master 2, sans quoi je n'aurais pas pu entamer ces années de doctorat. Ce fut très enrichissant pour moi d'acquérir activement de nouvelles compétences sur des techniques de pointes et de partager ta passion pour la science.

J'adresse mes remerciements aux membres du jury le Pr Stéphane Hatem, la Dr. Nathalie Viguerie, la Dr Lucile Miquerol et les rapportrices, la Dr Agnès Vinet et la Dr Sophie Nadaud, pour avoir accepté de juger ce travail.

Un grand merci au Dr Franck Tourniaire et au Dr Thomas Moore-Morris pour votre aide tout au long de ma thèse et vos conseils respectifs.

Mes pensées vont maintenant vers notre groupe et plus particulièrement Julien, Charlène, Lourdes, Esma, Laurianne, Laurrine et Alexandra. Julien, je te remercie d'avoir pris le temps de me former dans une discipline qui était nouvelle pour moi, d'avoir répondu à mes questions et d'avoir participé à mes réflexions. Charlène, tu m'as également permis d'acquérir de nouvelles compétences, tu m'as aidée dès que j'en avais besoin, mais plus encore, pour avoir instauré un climat d'amitié entre nous. Lourdes, merci d'amener tant de bonne humeur et d'avoir participé à la construction de ce travail de thèse.

Je remercie également les membres de ma deuxième équipe et plus particulièrement Batoul et Fanny. Les filles, merci pour ces échanges et ces bons moments passés en congrès, que ce soit celui de Montpellier, ou encore celui d'Indianapolis.

Également, je tiens à remercier tous les membres de l'association Hippo'thèse qui ont partagé cette aventure de présidence et vice-présidence avec moi. Grâce à vous mon doctorat a été unique et m'a apporté tellement plus que le seul travail de doctorant. Benjamin, merci d'avoir été mon secrétaire et surtout mon ami pendant ces trois ans, c'est tellement plus facile d'aborder les projets professionnels futurs en discutant avec toi. Florian, mon vice-président, merci pour tous ces rires. Les Alex, Aude et tous les autres, merci pour avoir participé à la vie des doctorants de l'EDSVS mais surtout pour avoir participé à la mienne.

Pour finir, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue en dehors de ce doctorat. Je pense à tous mes amis de la team flamant, avec Aurélie, Marie, Clotilde, Léa, Benoit, Thib, Joachim, Julien, Quentin, Marvin, Eve, Bastien, Fanny et Toinou, ceux de Marseille avec Renaud, Jerem, Ines, Clara et tous les autres du folklore étudiant, mes amis de longue date, Meryll, Maxime et Estelle. Un immense merci pour tous ces moments partagés qui m'ont permis de décompresser et recharger mes batteries. Enfin, je remercie ma famille, pour votre soutien indéfectible, toutes ces années. A ma mère, qui m'a permis d'aller si loin, ce travail est aussi pour toi.

Table des matières

Liste des publications	4
Communications Orales	5
Posters.....	6
Formations suivies	7
Liste des abréviations.....	8
Résumé.....	10
Abstract.....	12
Introduction	13
1. La vitamine D.....	14
1.1 Découverte de la vitamine D	14
1.2 Sources de vitamine D.....	15
1.2.1 Origine endogène de la VD	15
1.2.2 Origine exogène de la VD.....	15
1.3 Métabolisme de la vitamine D	17
1.3.1 Absorption et transport de la VD	17
1.3.2 25-Hydroxylation hépatique.....	17
1.3.3 1,25-Hydroxylation rénale	18
1.3.4 24-Hydroxylation	18
1.4 Sites de stockage de la vitamine D	20
1.5 Apports recommandés et consommation de VD en France	20
1.6 Évaluation du statut en vitamine D.....	22
1.7 Insuffisance et déficience en vitamine D	24
1.7.1 Population globale.....	24
1.7.2 Causes des insuffisances et déficiences	24

1.7.3	La déficience maternelle en vitamine D	26
1.8	Supplémentation en vitamine D	28
1.9	Mécanismes d'action de la VD	29
1.9.1	Effets génomiques de la vitamine D	29
1.9.2	Effets non génomiques de la vitamine D	31
1.9.3	Effets épigénétiques de la vitamine D	31
2.	La vitamine D et ses tissus cibles	37
2.1	Généralités sur les tissus cibles	37
2.2	Le tissu adipeux	37
2.2.1	Description et composition	37
2.2.2	L'adipocyte	39
2.2.3	Effets de la vitamine D sur la biologie du tissu adipeux	40
2.3	Le cœur	46
2.3.1	Description générale du cœur	46
2.3.2	Spécification des lignées cardiaques : le cardiomyocyte	51
2.3.3	Effet de la vitamine D sur le cœur	52
3.	Programmation fœtale et carence maternelle en vitamine D.....	55
3.1	Qu'est-ce que le DOHaD ?.....	55
3.2	Programmation maternelle et obésité.....	60
3.2.1	Généralité sur l'obésité.....	60
3.2.2	Quels facteurs maternels programment l'obésité ?.....	62
3.2.3	Rôle de l'insuffisance maternelle en vitamine D sur l'obésité.....	63
3.3	Programmation maternelle et malformations cardiaques.....	65
3.3.1	Généralités sur les malformations cardiaques	65
3.3.2	Quels facteurs maternels programment des malformations cardiaques et des dysfonctions du cœur ?	67
3.3.3	Rôle de l'insuffisance maternelle en VD sur le risque de CHD chez l'enfant.....	69
	Objectifs de la thèse	71
	Matériels et méthodes	72

Résultats	82
ARTICLE 1 : Prenatal maternal vitamin D deficiency sex-dependently programs adipose tissue metabolism and energy homeostasis in offspring	83
RESULTAT 1 : Étude des profils microARNs dans le tissu adipeux péri gonadique	123
RESULTAT 2 : Maternal vitamin D impairs heart formation in mouse offspring	127
Discussion générale	135
Conclusion et Perspectives	146
Références.....	149

Liste des publications

❖ **Prenatal maternal vitamin D deficiency sex-dependently programs adipose tissue metabolism and energy homeostasis in offspring**

Eva M. Seipelt, Franck Tourniaire, Charlène Couturier, Julien Astier, Béatrice Loriod, Hortense Vachon, Michel Pucéat, Lourdes Mounien, Jean-François Landrier

Communications Orales

- ❖ **4^{ème} congrès SF-DOHAD**, du 8 au 9 novembre 2018, Grenoble : « Impact d'une déficience maternelle en vitamine D sur la cardiogenèse de la descendance »
E Seipelt, JF Landrier, M Pucéat
- ❖ **Fallot Club Meeting**, Séminaire inter-équipe de développement cardiaque, MMG, 2 juillet 2018, Marseille : « Impacts of maternal vitamin D deficiency on cardiac development and metabolism of the offspring »
E Seipelt, JF Landrier, M Pucéat

Posters

- ❖ **Weinstein Congress**, du 09 au 11 mai 2019, Indianapolis, Etats-Unis : « Maternal Vitamin D deficiency impacts cardiogenesis of offspring »
E Seipelt, JF Landrier, M Pucéat

- ❖ **35^{ème} journées scientifiques annuelles de l'AFERO**, du 31 janvier au 1^{er} février 2019, Marseille : « Impacts d'une carence maternelle en vitamine D sur le métabolisme de la descendance »
E Seipelt, L Mounien, J Astier, C Couturier, F Tourniaire, M Pucéat, JF Landrier

- ❖ **4^{ème} congrès SF-DOHAD**, du 8 au 9 novembre 2018, Grenoble : « Impact d'une déficience maternelle en vitamine D sur l'homéostasie énergétique de la descendance »
E Seipelt, L Mounien, J Astier, C Couturier, F Tourniaire, M Pucéat, JF Landrier

- ❖ **26th Doctoral School Symposium**, du 28 au 29 mai 2018, Marseille : « Maternal vitamin D deficiency impacts cardiogenesis in mouse offspring »
E Seipelt, JF Landrier, M Pucéat

- ❖ **Printemps de la Cardiologie**, du 04 au 06 avril 2018, Montpellier : « Impact de la déficience maternelle en vitamine D sur la cardiogenèse murine »
E Seipelt, JF Landrier, M Pucéat

Formations suivies

- ❖ **Intégrité Scientifique** / Research Integrity 2A ,13 novembre 2018, En ligne / On line
- ❖ **Zététique et autodéfense intellectuelle**, 23 octobre 2017, Campus St Charles
- ❖ **Travailler dans le secteur du Conseil après son doctorat : ATELIER**, 17 et 24 janvier 2019, Campus St Charles
- ❖ **Travailler dans le secteur du Conseil après son doctorat : CONFERENCE**, 10 janvier 2019, Campus St Charles
- ❖ **Medias et pseudosciences : quand la science se met en scène**, 24 octobre 2016, Campus St Charles
- ❖ **26th Annual Meeting of Doctoral School**, 28 mai 2018, Site UFR de Médecine, La Timone
- ❖ **Formation spécialisée à l'expérimentation animale (inclus niveau B)**, Faculté de pharmacie de Marseille
- ❖ **1er Rendez-vous de la cohorte : Comment préparer son projet professionnel post-thèse ?** 23 novembre 2016, Technopôle de Chateau-Gombert
- ❖ **Atelier ADOC**, 29 Mai 2018, Marseille
- ❖ **Organisation 25th Annual Meeting of Doctoral School** - 1er et 2 juin 2017, Marseille
- ❖ **DOC2AMU - Career Development for Doctoral Candidates**, 01 avril 2019, ilot Bernard-Dubois
- ❖ **Demi-journée du Salon de la Recherche consacrée au secteur public**, 13 juin 2017, Campus Timone, Faculté de Médecine
- ❖ **Demi-journée HIPPO'THESE consacrée à l'industrie et aux start up**, 23 mai 2017, Campus Timone, Faculté de Médecine
- ❖ **Prendre ses fonctions de doctorant**, 22 novembre 2016, Site Saint-Charles
- ❖ **Sensibilisation management innovant : « Raisonnements et émotions »**, 21 octobre 2016, Campus Saint-Charles
- ❖ **IMéRA séminaire doctoral** : Epistemology of aesthetics: facts, models and theories, 20 octobre 2016, IMéRA, Institut d'études avancées d'Aix-Marseille

Liste des abréviations

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

AVN : Atrioventricular node

CD36 : Cluster of differentiation 36

C/EBP α : CCAAT-enhancer binding proteins

CHD : congenital heart diseases / cardiopathies congénitales

ChIP : Immunoprécipitation de la chromatine

CNV : Copy-number variation

CREB : cAMP response element binding protein

CTCF : CCCTC-binding factor

CYP : Cytochrome P450

DOHaD : Developmental origins of health and diseases

DNMT : DNA méthyltransférases

EFSA : Agence européenne de sécurité des aliments

ECG : Electrocardiogramme

ENNS : Etude nationale nutrition santé

FGF : Fibroblast growth factor

FHF : first heart field

Glut4 : Glucose transporter 4

HAT : Histone acetyltransferase

Hbnp : Human B-type natriuretic peptide

HDAC : Histone désacétylase

HDL : High density lipoprotein

HDM : Histone déméthylase

HMT : Histone méthyltransférase

HOMA-IR : Homeostatic model assessment of insulin resistance

hsCRP : high sensitivity C-reactive protein

IFN- γ : Interferon-gamma

IL : Interleukine

IMC : Indice de masse corporelle

INCA : Etude individuelle nationale des consommations alimentaires

KO : Knock-out

LBB : left bundle branch

LDL : Low-density lipoprotein

LPS : Lipopolysaccharide

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MCP1 : Monocyte chemoattractant protein 1

Mesp1 : Mesoderm posterior 1

miR : microARN

NF- κ B : Nuclear factor-kappa B

NPC1L1 : Niemann-Pick C1 like 1

OMS : Organisation mondiale de la santé

Pdia3 : Proteine disulfide isomerase family
A member 3

POHaD : Paternal origin of health and
diseases

PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated
receptor gamma

PTH : Parathormone

RBB : Right bundle branche

RNP : Référence nutritionnelle pour la
population

RXR : Retinoid X receptor

SAN : Sinoatrial node

SGA : Small for gestational age

SHF : second heart field

SNP : single-nucleotide polymorphism

SR-B1 : Scavenger receptor class B type 1

SREBP-1 : sterol regulatory element
binding protein-1

SRC : steroide receptor coactivators

TA : Tissu adipeux

TAD : Topologically associated domains

Tbx : T-box

TET : ten-eleven translocation

TGF β : Transforming growth factor-beta

TNF α : Tumor necrosis factor alpha

UCP : Uncoupling protein

UI : Unité internationale

UVB : Ultraviolets B

VD : Vitamine D

VDBP : Vitamin D binding protein

VDR : Vitamin D receptor

VDRE : Vitamin D element reponse

VNR : Valeurs nutritionnelles de référence

WNT : wingless integrated

VPO : Viandes poissons oeufs

25(OH)D : 25-hydroxyvitamine D

1,25(OH) $_2$ D : 1,25-dihydroxyvitamine D

Résumé

La vitamine D est une hormone liposoluble, qui intervient dans de nombreux processus physiologiques et dont l'action pléiotropique s'exerce dans divers tissus. Ainsi, le lien entre la vitamine D et le tissu adipeux, son principal site de stockage, a fortement été documenté. De même, il ressort que l'insuffisance en vitamine D est associée à des altérations du métabolisme et de l'obésité. De plus, la vitamine D participe à la formation du cœur, ainsi des cas de déficience en vitamine D ont été associés à des altérations de la morphologie du cœur et de son fonctionnement. L'environnement *in utero* est un facteur crucial pour assurer le développement normal du fœtus, mais il participe également à la susceptibilité à développer des maladies métaboliques et cardiaques tout au long de la vie. Or, la déficience en vitamine D est devenu un problème de santé publique mondiale, notamment pour les femmes enceintes, allaitant et en âge de procréer. Ces femmes exposent ainsi leur enfant à naître à des taux inadéquats en vitamine D. Dans ce contexte, cette thèse a pour objectif de mettre en lumière les interactions existantes entre la déficience maternelle en vitamine D et la programmation du devenir métabolique et cardiaque de la descendance.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'impact d'une carence maternelle en vitamine D sur le métabolisme énergétique de la descendance. Dès l'âge de 5 semaines, on a observé que l'homéostasie énergétique et le poids de la descendance issue de mères carencées étaient altérés de manière sexe-dépendant. A l'âge adulte, une alimentation obésogène combinée à la carence maternelle en vitamine D, altérait le métabolisme général de la descendance mâle (avec une augmentation de la glycémie, de l'insulinémie, de l'insulino-résistance) et promouvait le phénotype obèse (augmentation de la masse grasse). De telles différences n'étaient pas observées chez la descendance femelle. Cela pourrait s'expliquer par des modulations différentielles des taux circulants d'estradiol chez les femelles. De manière générale, ces modifications métaboliques s'accompagnaient de modifications du transcriptome de la descendance au niveau du tissu adipeux. La carence maternelle en vitamine D module donc le devenir métabolique de la descendance, dans des proportions qui sont amplifiées, lorsque celle-ci est exposée à une alimentation obésogène au cours de sa vie.

Ensuite, nous avons étudié l'impact de la carence maternelle en vitamine D sur la cardiogenèse de la descendance, via des mécanismes impliquant le récepteur à la vitamine D (VDR) et observé les effets à long terme. Chez les embryons (à 16,5 jours de développement), la carence maternelle induisait une hypertrophie ventriculaire gauche et modulait le transcriptome cardiaque des embryons, notamment en modulant l'expression de facteurs de transcriptions tels que *Tbx5*, *Gata4*, *Myl2* et aussi le *Vdr*. De telles modifications semblaient être liées, à un enrichissement différentiel en VDR des régions régulatrices de gènes et en particulier au niveau de la boucle chromatinienne incluant *Tbx3* et *Tbx5* chez des ventricules gauches d'embryons issus de mères carencées. La morphologie et le fonctionnement du cœur, étaient également altérés chez la descendance adulte, à l'âge de 2 mois avec un épaississement ventriculaire gauche et une augmentation de la fraction de raccourcissement, puis à l'âge de 6 mois, avec une décompensation du ventricule gauche. La carence maternelle en vitamine D altère donc le développement cardiaque du fœtus en développement et induit des altérations cardiaques jusqu'à l'âge adulte.

Abstract

Vitamin D is a fat-soluble hormone, which is involved in many physiological processes and its pleiotropic action takes place in various tissues. Thus, the association between vitamin D and adipose tissue, its main storage site, is well documented. Also, vitamin D insufficiency is associated with impaired metabolism and obesity. Moreover, vitamin D participates to the cardiogenesis and vitamin D deficiency is associated with cardiac defects. *In utero* environment is crucial to ensure normal development of the foetus and to prevent any metabolic and cardiac diseases throughout the whole life. However, vitamin D deficiency has become a global public health issue, notably for childbearing age, breastfeeding and pregnant women. These women expose their unborn child to inadequate levels of vitamin D. In this context, the objective of this thesis is to highlight the interactions existing between maternal vitamin D deficiency and the potential programming of cardio-metabolic fate of the offspring.

First, we investigated the impact of maternal vitamin D deficiency on the energy metabolism of the offspring. At 5 weeks of age, the energetic homeostasis and the weight of the offspring from deficient mother were sex-dependently altered. In adulthood, an obesogenic diet combined with maternal vitamin D deficiency, modified the metabolism of the male offspring (with increased glycemia, insulinemia, insulin resistance) and promoted the obesogenic phenotype (increased fat pad). This could be explained by differential modulations of circulating levels of estradiol in females. These metabolic changes were associated with transcriptome modifications in adipose tissue. The maternal vitamin D deficiency modulates metabolic fate of the offspring, in exacerbated proportions, when the offspring was exposed to obesogenic diet during adulthood.

Then, we studied the impact of maternal vitamin D deficiency on cardiogenesis of the offspring by mechanisms involving the vitamin D receptor (VDR) and observed long-term effects. In embryos (at 16,5 days of development) maternal vitamin D deficiency induced left ventricular hypertrophy and modulated the cardiac transcriptome of embryos, notably by modulating the expression of transcription factors such as *Tbx5*, *Gata4*, *Myl2* and also the *Vdr*. Such modifications seemed to be related to a differential enrichment in VDR of regulatory regions of these genes and more specifically in the chromatin loop including *Tbx3* and *Tbx5* of embryos from deficient mothers. Also, the morphology and cardiac function were altered in the adult offspring, at 2 months of age, with left ventricular hypertrophy and increased fractional shortening. The 6-months-old offspring presented a decompensation and in turn failing left ventricle. Thus, maternal vitamin D deficiency impairs the cardiac development of the foetus and programs cardiac outcomes in adulthood.

Introduction

1. La vitamine D

1.1 Découverte de la vitamine D

Lors de sa découverte, la vitamine D (VD) a été associée à une maladie, le rachitisme, qui touchait les enfants issus de régions pauvres et faiblement ensoleillées et pour lesquels le squelette était faiblement minéralisé et déformé. Dès 1919, Sir Edward Mellanby (Mellanby 1976) montre chez des beagles l'effet antirachitique de l'huile de foie de morue, puis en 1922, McCollum nommera la substance antirachitique contenue dans l'huile : la vitamine D (McCollum 1922). C'est finalement en 1928, que le chimiste allemand Adolf Windaus élucide la structure de la vitamine D et isole la **vitamine D2**, d'origine végétale (ergocalciférol), de la **vitamine D3**, d'origine animale (cholécalférol).

La vitamine D appartient à la famille des stéroïdes au même titre que le cholestérol, et plus particulièrement à la sous-classe des sécostéroïdes. On la retrouve sous 6 principales formes dans l'organisme (**Figure 1**) : l'ergocalciférol, le cholécalférol (forme native et majoritaire), la 25-hydroxyvitamine D2 et D3 (25(OH)D2, 25(OH)D3) ou calcidiol (forme circulante) et la 1,25-dihydroxyvitamine D2 et D3 (1,25(OH)₂D2, 1,25(OH)₂D3) ou calcitriol (forme active). La vitamine D est le plus souvent stockée sous forme de cholécalférol ou de calcidiol.

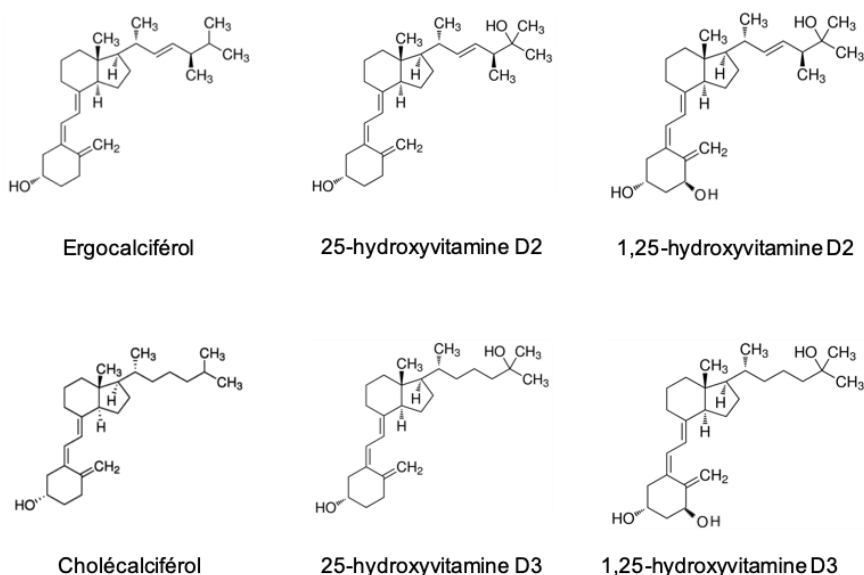


Figure 1 : Structure des différentes formes de la vitamine D

(Adapté de Landrier, Marcotorchino, and Tourniaire 2012)

Le terme « vitamine », c'est-à-dire produit « vital » que l'organisme ne peut pas produire, est inapproprié pour la vitamine D. Contrairement aux autres vitamines, elle a une double origine : endogène via l'exposition de la peau à l'ensoleillement et exogène via l'apport alimentaire.

1.2 Sources de vitamine D

1.2.1 Origine endogène de la VD

La synthèse endogène de la vitamine D est initiée au niveau de l'épiderme qui peut la produire en grande quantité, après une exposition aux rayonnements ultraviolets B (UVB) fournis par l'ensoleillement à une longueur d'onde de 290-315 nm (Holick 2016). Elle est réalisée à partir du 7-déhydrocholestérol, un intermédiaire de synthèse du cholestérol, présent dans les membranes des cellules du derme et de l'épiderme (B. Lehmann and Meurer 2010). L'énergie fournie par les rayons UVB permet sa transformation en pré-vitamine D3, elle-même rapidement convertie, en quelques heures, sous l'effet de la chaleur en vitamine D3, libérée dans la circulation sanguine. Classiquement, on considère que 80-90 % de la vitamine D présente dans l'organisme provient de l'exposition solaire (Holick 2008). Une exposition quotidienne de 7 à 30 minutes, des mains, bras et visage, est recommandée pour maintenir des niveaux suffisants en 25(OH)D en termes de santé osseuse (Bouillon 2017). L'apport endogène est cependant largement remis en cause et des recommandations nutritionnelles sont nécessaires pour un apport suffisant en vitamine D.

1.2.2 Origine exogène de la VD

La vitamine D peut également être apportée par l'alimentation sous la forme de vitamine D2 (ergocalciférol), d'origine végétale, ou de vitamine D3 (cholécalfiérol), d'origine animale, mais son absorption est lente, environ 40% sur 12 heures. Les formes D2 et D3 sont liposolubles et relativement stables à la chaleur. Peu d'aliments contiennent de la vitamine D3, on la retrouve essentiellement dans les huiles de foie de poissons, dans certains poissons gras, dans le jaune d'œuf ou encore dans des aliments enrichis dans la limite de 1.25µg/100g (**Tableau 1**). La vitamine D2 est retrouvée majoritairement dans les champignons (Cardwell et al. 2018).

Aliments	Vitamine D3 (en µg / 100g)	Vitamine D3 en (UI / 100g)
Viandes, œufs, poissons		
Huile de foie de morue	250	10 000
Chinchard	41 – 48	1640 – 1920
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
Champignon (cèpe, morille, girolle)	3.1 - 5.3	124 – 212
Laits et produits laitiers		
Fromage à pâte molle allégée 13 %MG	15	600
Spécialité laitières type encas	2.4	96
Yaourt enrichis en VD	1.4	56
Beurre	1.1	44

Tableau 1 : Principales sources alimentaires de vitamine D3 (1µg = 40 UI)

(D'après la table du Centre d'informations sur la qualité des aliments, Ciqual, 2017)

Un paramètre largement sous-estimé dans le calcul des apports alimentaires en vitamine D est la contribution de la 25(OH)D, naturellement présente dans les aliments. En effet, cette dernière n'est jamais prise en compte dans le calcul des apports exogènes de vitamine D. Pourtant ce métabolite est présent en quantité variable mais non négligeable dans un grand nombre d'aliments de consommation courante (Ovesen, Brot, and Jakobsen 2003; Schmid and Walther 2013). De plus, il semble que l'absorption de la 25(OH)D soit plus efficace que celle de la vitamine D (Desmarchelier et al. 2017). Toutefois la contribution réelle de cette molécule dans le maintien des taux plasmatiques, notamment chez l'Homme, n'est pas complètement établie et devra faire l'objet d'études approfondies (Ovesen, Brot, and Jakobsen 2003), afin d'en tenir éventuellement compte dans les calculs d'apports vitaminiques.

1.3 Métabolisme de la vitamine D

1.3.1 Absorption et transport de la VD

La vitamine D d'origine alimentaire est incorporée dans les micelles mixtes et absorbée dans la partie proximale de l'intestin grêle. Ce processus d'absorption a longtemps été considéré comme exclusivement passif jusqu'à la mise en évidence de l'implication de transporteurs du cholestérol. Ainsi, *Cluster of Differentiation 36* (CD36), *Niemann-Pick C1-Like 1* (NPC1L1) et *Scavenger Receptor class B type 1* (SR-B1) vont également participer à l'absorption de la vitamine D (Reboul et al. 2011). Après son absorption, son transport plasmatique semble être majoritairement dépendant de son incorporation dans les chylomicrons, au sein desquels la vitamine D est véhiculée jusqu'au foie. 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., 1993). Cette protéine lie à la fois la vitamine D mais aussi ces métabolites (25(OH)D et 1,25(OH)₂D).

1.3.2 25-Hydroxylation hépatique

Après transport dans la circulation sanguine, liée aux chylomicrons ou à la VDBP, la vitamine D est captée au niveau hépatique et hydroxylée sur le carbone 25 pour former la 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D) (**Figure 2**) dont la demi-vie est relativement longue (3 à 4 semaines) et la concentration plasmatique moyenne comprise entre 20 et 50 ng/mL (50 à 125 nmol/L). Plusieurs enzymes sont capables de catalyser cette réaction chez l'Homme et la souris comme la CYP2R1, CYP27A1, CYP3A4 (ou CYP3A11 chez la souris) et CYP2J2 (ou CYP2J6 chez la souris) (Schuster, 2011). Elles appartiennent à la famille des cytochromes P450 et ont une localisation mitochondriale (CYP27A1) ou microsomale (CYP2R1, CYP2J2 et CYP3A4). De récents travaux révèlent que CYP2R1 semble être l'enzyme clef de la réaction de 25-hydroxylation de la vitamine D (Zeng et al., 2013). De plus, cette étape hépatique de 25-hydroxylation semble être très peu régulée (Girgis et al., 2013).

La 25(OH)D circulante dans le sang, ainsi que la 1,25(OH)₂D, sont majoritairement liées à la VDBP (environ 88% de la 25(OH)D totale présente dans le plasma) (Bikle et al., 1986), à l'albumine (10-15%) ou sous forme libre (1%) (Bikle et al., 1986). Il est important de souligner que la plupart des cellules sont capables de produire la 25-hydroxyvitamine D et la 1,25-dihydroxyvitamine D pour leurs besoins propres.

1.3.3 1,25-Hydroxylation rénale

Le complexe 25(OH)D-VDBP est endocyté par un complexe faisant intervenir les protéines mégaline, cubuline, *amniololess* et *disabled* au niveau des cellules du tubule proximal du rein. Une fois dans la cellule rénale, la VDBP est dégradée dans le lysosome et la 25(OH)D libérée dans le cytosol de la cellule. Cette 25(OH)D est soit réexcrétée dans le sang, soit hydroxylée en position 1 dans la mitochondrie, aboutissant ainsi à la synthèse de la 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25(OH)₂D) ou calcitriol, considérée comme la principale forme active de la vitamine D (Dusso et al., 2005). Cette hydroxylation en position 1 est assurée par le cytochrome P450 27B1 (CYP27B1) (Schuster, 2011). L'activité du CYP27B1 est très étroitement régulée par différents paramètres du métabolisme phosphocalcique. Elle est principalement stimulée par la parathormone (PTH) et une calcémie basse, tandis qu'elle est inhibée par le *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF23) et la concentration circulante de 1,25(OH)₂D, selon un mécanisme classique de rétrocontrôle négatif. La demi-vie de la 1,25(OH)₂D est très courte (environ 4 heures) et sa concentration est mille fois inférieure à celle de la 25(OH)D. Les divers mécanismes d'action de la 1,25(OH)₂D (effets génomiques, non génomique et épigénétiques) seront développés dans le paragraphe 1.9.

1.3.4 24-Hydroxylation

Enfin, le métabolisme de la vitamine D est autorégulé via une voie d'inactivation (Schuster, 2011). Le calcitriol induit l'expression de la 24-hydroxylase (CYP24A1) qui convertit la 25(OH)D et la 1,25(OH)₂D en métabolites inactifs (24,25(OH)₂D et 1,24,25(OH)₃D) (Holick 2007)

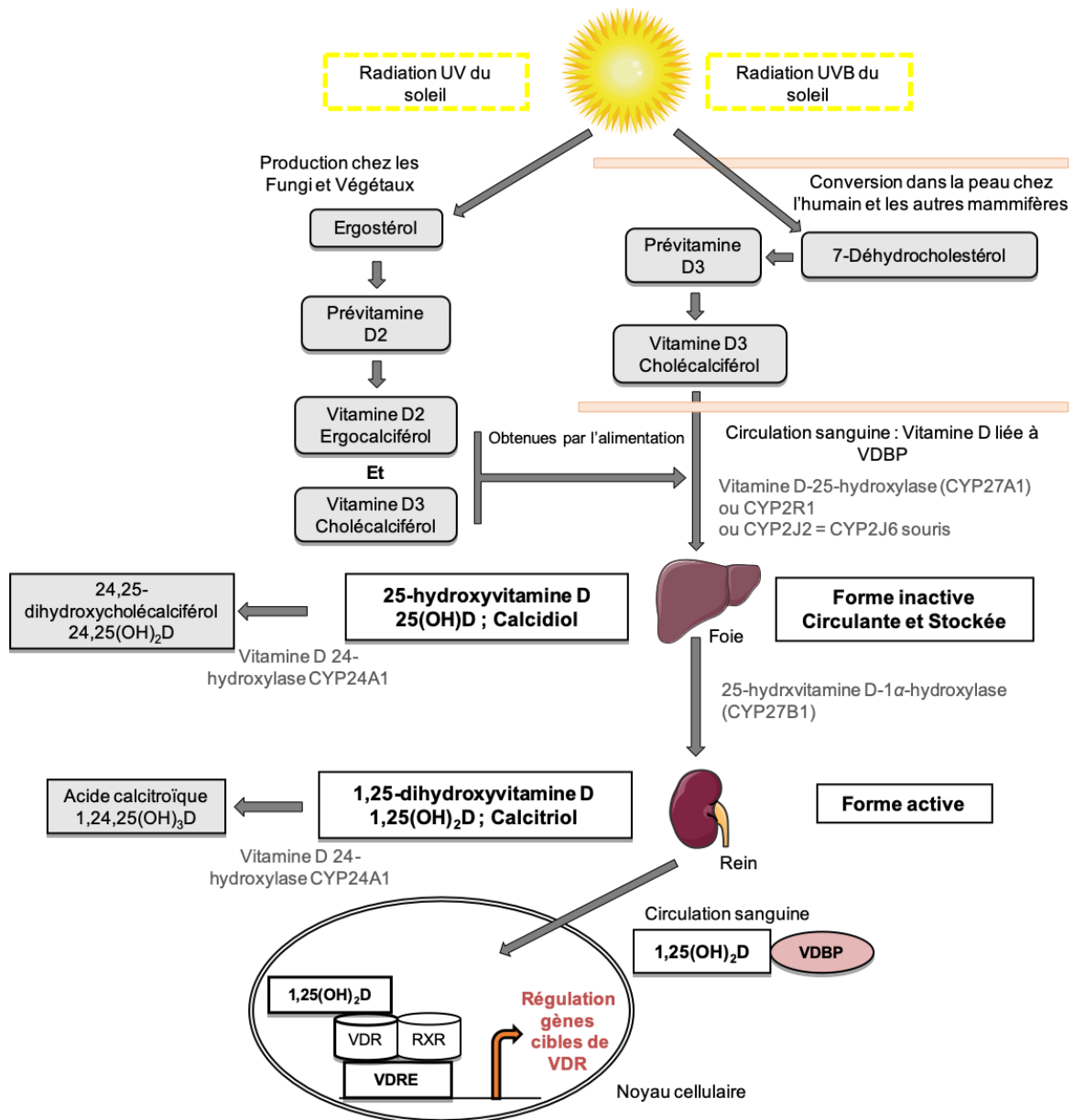


Figure 2 : Métabolisme général de la vitamine D.

La vitamine D provient de l'alimentation, mais principalement de l'exposition aux UVB qui entraînent au niveau de l'épiderme la conversion du 7-déhydrocholestérol en vitamine D3 native. La vitamine D native subit une 25- puis une 1 α -hydroxylation pour devenir biologiquement active, respectivement au niveau du foie puis du rein. Le métabolisme de la vitamine D est autorégulé via une voie d'inactivation impliquant la CYP24A1. Le calcitriol exerce ses effets en se liant à un récepteur spécifique appelé *Vitamin D Receptor* (VDR). Le complexe VDR-1,25(OH)₂D est transloqué dans le noyau de la cellule où il s'associe au récepteur de l'acide rétinoïque, le *Retinoid x Receptor* (RXR). L'hétérodimère RXR-VDR en présence de ligand se lie à l'ADN en des sites appelés éléments de réponse à la vitamine D (VDRE), dans les régions promotrices des gènes dont l'expression est ainsi activée ou réprimée.

1.4 Sites de stockage de la vitamine D

La vitamine D est principalement stockée au niveau du tissu adipeux, sous forme native (cholécalférol) ou sous forme de 25(OH)D ainsi que dans le muscle (**Tableau 2**) (Heaney et al. 2009; Landrier, Marcotorchino, and Tourniaire 2012).

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% et 16% au niveau du tissu adipeux et du muscle, respectivement). En ce qui concerne la forme 25(OH)D, on en trouve 34% dans le tissu adipeux, 30% dans le sérum et 20% dans le muscle.

Tissus	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

Tableau 2 : Principaux sites de stockage de la vitamine D

(D'après (Heaney et al. 2009))

1.5 Apports recommandés et consommation de VD en France

Depuis 2017, l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) utilise la nouvelle appellation « Référence nutritionnelle pour la population » (RNP) pour définir les apports journaliers recommandés en nutriments. La RNP en vitamine D a été fixée en considérant que la synthèse endogène cutanée était nulle, afin de couvrir le besoin nutritionnel de la quasi-totalité de la population française, sans distinction géographique, ou socio-économique. La définition du « besoin nutritionnel » est large, mais l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (WHO/FAO, 2003) considère qu'il correspond à « la quantité minimale d'un nutriment devant être consommé par un individu pour favoriser sa bonne santé » et dans le cadre d'un micronutriment, il est défini comme « le niveau d'apport qui satisfait un critère d'adéquation, diminuant ainsi le risque d'insuffisance ou d'excès d'apport ». Fixer la RNP de la vitamine D en considérant que la synthèse endogène via exposition solaire est absente est une hypothèse extrême.

Elle a cependant été retenue car il est difficile d'estimer le niveau de synthèse endogène de la population, qui peut être variable selon les individus.

Les valeurs de RNP en vitamine D suivent les Valeurs Nutritionnelles de Référence (VNR) de l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA). Elles sont fixées à 15 µg/jour (600 UI/jour) pour les adultes et 10 µg/jour pour les nourrissons (Turck et al. 2016) (**Tableau 3**). L'EFSA a établi ces valeurs seuils d'apport en vitamine D afin d'améliorer la santé musculaire et osseuse mais n'a pas tenu compte d'autres bénéfices supposés de la vitamine D comme les maladies cardiovasculaires et cancers. Selon l'EFSA, cet apport permet à presque tous les européens d'atteindre un taux sanguin minimum de 20 ng/mL (équivalent à 50 nmol/L) en 25(OH)D.

Tranches d'âge	RNP (µg/jour)	RNP (UI/jour)
Nourrisson (7 – 11 mois)	10	400
Enfant (1 – 17 ans)	15	600
Adulte (Homme et Femme)	15	600
Femmes enceintes et allaitantes	15	600

Tableau 3 : Références nutritionnelles en vitamine D pour la population

(1 µg = 40 UI ; Données issues des VNR de l'EFSA, 2016)

Néanmoins, ces valeurs sont bien éloignées de la consommation réelle de vitamine D en France. L'étude INCA3 (Etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 3) menée sur la période 2014-2015, a permis de mettre en évidence que l'apport alimentaire en vitamine D n'est que de 3,1 µg/jour chez l'adulte, et inférieur à 3 µg/jour chez l'enfant contre les 15 µg/jour recommandés. Chez les adultes, l'apport majoritaire en vitamine D provient à 39 % des VPO (viandes, poissons à 19% et œufs) et produits à base de VPO et à 25% des produits laitiers. Respectivement, 16% des VPO et 40% des produits laitiers, chez l'adolescent, 16% et 63% chez l'enfant. (**Tableau 4**)

Tranches d'âge	Apports nutritionnels moyens (µg/jour)
Enfants (1 – 3 ans)	5,2
Enfants (4 – 10 ans)	2,6
Adolescents (11 – 17 ans)	2,9
Adultes (18 – 79 ans)	3,1
Homme (18 – 79 ans)	3,3
Femme (18 – 79 ans)	2,9
Contribution poisson (adulte)	19%
Contribution produits laitiers (adulte)	25%

Tableau 4 : Consommation de vitamine D en France

(Valeurs issues de l'étude INCA3, 2017)

1.6 Évaluation du statut en vitamine D

Le niveau sanguin de 25(OH)D, représentant la vitamine D totale provenant à la fois de la synthèse cutanée et de l'apport alimentaire, est l'indicateur de référence du statut en vitamine D (Seamans and Cashman 2009). La 25(OH)D sérique a une demi longue d'environ 13 à 15 jours (Jones et al. 2014). Établir des valeurs seuils de concentration en 25(OH)D pour définir la carence, la déficience, l'insuffisance et la suffisance en vitamine D est source de débats. Notamment parce que les valeurs en 25(OH)D, liées à la santé musculo-squelettique chez l'adulte, sont variables. Avec des concentrations de 25(OH)D associées à : un risque élevé de perte de densité et de contenu minéral osseux (25(OH)D < 50 nmol/L), d'ostéomalacie (25(OH)D < 20nmol/L) et de malabsorption calcique (25(OH)D < 30 nmol/L). Quant à la fonction musculaire et le risque de chute, les valeurs cibles ne sont pas réellement établies, même s'il est admis qu'atteindre une concentration entre 23-82 nmol/L est bénéfique face au risque de chutes (Turck et al. 2016).

On considèrera classiquement que pour un taux sérique de 25(OH)D supérieur à 30 ng/mL (75 nmol/L), les réserves sont dites « suffisantes » et que le statut vitaminique D peut être qualifié d'« optimal ». À l'inverse, le terme de statut vitaminique D « suboptimal » est souvent utilisé lorsqu'il est inférieur à 30 ng/mL (ou 75nmol/L).

On distinguera également l'insuffisance, définie par un taux de 25(OH)D compris entre 20 et 30 ng/mL, de la carence, définie par un taux inférieur à 10 ng/mL (25 nmol/L) (**Figure 3**).

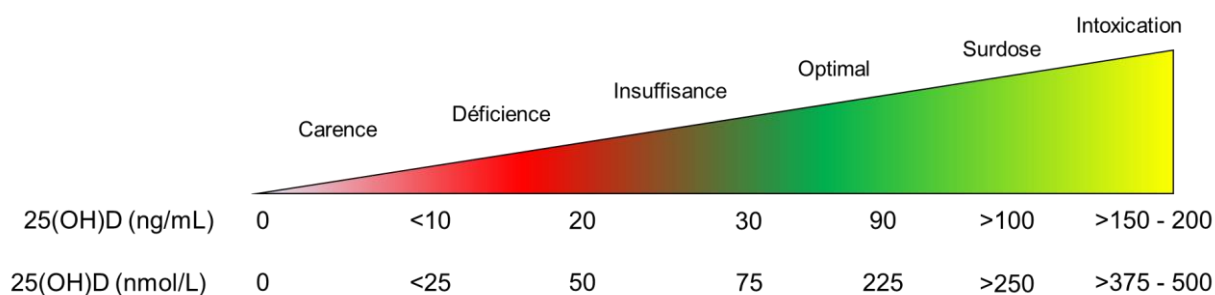


Figure 3 : Valeurs des différents statuts en vitamine D

La 25(OH)D pouvant exister sous forme libre dans la circulation sanguine (Bikle et al. 1986), 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 montré que les taux plasmatiques en 25(OH)D libre étaient fortement corrélés avec les taux plasmatiques en 25(OH)D totale chez l'Homme et que cette corrélation était la même suivant les différentes saisons de l'année (Oleröd et al. 2017). Cependant, des études appropriées seront 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 normaux ainsi que dans diverses pathologies (Bouillon 2016). Plusieurs méthodes sont répertoriées afin de déterminer la concentration sérique de 25(OH)D libre : i) par calcul, en fonction de la mesure des concentrations sériques de la 25(OH)D totale, de la protéine de liaison à la vitamine D (VDBP) ou de l'albumine, ii) par la mesure de l'affinité entre la 25(OH)D et ses protéines de liaison (en situation physiologique) iii) par mesure directe de la dialyse à l'équilibre, de l'ultrafiltration iv) ou par immunodosage. Cependant, ces différentes méthodes doivent encore être standardisées afin d'optimiser les résultats.

1.7 Insuffisance et déficience en vitamine D

1.7.1 Population globale

Malgré la double origine (endogène et exogène) de la vitamine D, la population française dans sa globalité est fortement en déficience ou insuffisance (**Tableau 5**). En effet, à la valeur seuil plasmatique de 25(OH)D de 20 ng/mL, on se rend compte qu'environ 40% de la population française est déficiente, et si l'on se fixe au seuil de 30 ng/mL, près de 80% de la population est alors en situation d'insuffisance, d'après les données de l'Étude Nationale Nutrition Santé (ENNS) effectuée entre 2006-2007 (Vernay et al. 2011).

25(OH)D	Carence	Déficience	Insuffisance
	< 10 ng/mL < 25 nmol/L	< 20 ng/mL < 50 nmol/L	< 30 ng/mL < 75 nmol/L
Homme	3,6%	35,8%	78,7%
Femmes	5,9%	49,0%	81,4%
18 – 29 ans	7,5%	45,9%	79,2%
30 – 54 ans	5,2%	41,4%	79,1%
55 – 74 ans	1,9%	41,7%	82,4%

Tableau 5 : Statut plasmatique en vitamine D de la population française

(D'après (Vernay et al. 2011))

1.7.2 Causes des insuffisances et déficiences

Ces faibles taux en 25(OH)D s'expliquent d'une part par le faible nombre d'aliments riches en vitamine D et leur relative faible consommation. D'autre part, si la néosynthèse cutanée a très longtemps été considérée comme pouvant couvrir 50 à 70 % des besoins en vitamine D, un certain nombre de facteurs dont certains fortement liés à nos modes de vie actuels, font que cette néosynthèse tend à diminuer. Le chiffre de 10 à 25 % des besoins en vitamine D couverts par la synthèse endogène a récemment été avancé (Heaney, Armas, and French 2013).

On sait depuis longtemps que la synthèse endogène de vitamine D est influencée par la saison, l'horaire d'exposition et la latitude. La saison hivernale est associée à une quasi-absence de néosynthèse. Les UVB ne sont suffisants en France, que quelques mois par an (entre avril et octobre à Paris par exemple) et ce n'est qu'à ces périodes que la synthèse cutanée de vitamine D₃ est possible. D'autres paramètres anthropomorphiques, tels que l'âge, la pigmentation de la peau, l'obésité ou le surpoids tendent à réduire la synthèse. En effet, la concentration de 7-déhydrocholestérol dans les couches profondes de l'épiderme diminue avec l'âge ; une personne âgée de 70 ans produit 4 fois moins de vitamine D qu'un sujet âgé de 20 ans. De plus, la mélanine (pigment de la peau) constitue un écran solaire naturel et l'augmentation de cette pigmentation mélanique peut réduire la synthèse de vitamine D (Landrier 2014). Ainsi, la prévalence de l'insuffisance en vitamine D est plus importante chez les sujets de peau noire. Certains facteurs liés au mode de vie moderne favorisent également l'insuffisance, c'est notamment le cas de la sédentarité conduisant à une moindre exposition au soleil, ainsi que l'augmentation de l'utilisation de crèmes solaires, liée à l'application des consignes de photoprotection en prévention des cancers cutanés (Holick 2008). En effet, la synthèse de vitamine D peut être réduite de plus de 90% par les crèmes solaires qui présentent un index de protection supérieur ou égal à 15, ce qui conduit à une prévalence de l'insuffisance en vitamine D paradoxalement plus élevée dans les pays où l'ensoleillement est important du fait d'une forte protection solaire. Le fait de vivre dans une région ensoleillée n'est donc pas obligatoirement synonyme de production optimale de vitamine D. La pollution atmosphérique, en bloquant une partie du rayonnement UVB, participe aussi à la réduction de la synthèse de vitamine D. Enfin, des aspects socioculturels, tels que le port de vêtements couvrants, limitent également la synthèse endogène.

Les manifestations cliniques de l'insuffisance en vitamine D sont le rachitisme chez l'enfant et l'ostéomalacie chez l'adulte. Toutes deux sont causées par des défauts de minéralisation, dus à une absorption inefficace du calcium et du phosphore (Holick 2006; Holick et al. 2012). Les symptômes chez l'adulte, sont moins prononcés que chez l'enfant et peuvent correspondre, en plus des symptômes osseux, à une douleur et une faiblesse musculaire. Lorsque l'insuffisance en vitamine D est prolongée, elle peut conduire à une diminution de la densité osseuse et prédisposer le sujet âgé à développer de l'ostéoporose (Holick 2007).

1.7.3 La déficience maternelle en vitamine D

1.7.3.1 En quelques chiffres

La déficience en vitamine D est devenue un problème de santé publique mondiale (Palacios and Gonzalez 2014; Bendik et al. 2014) notamment pour les femmes en âge de procréer, enceintes, ou allaitantes. En France, près de 50% des femmes sont déficientes en 25(OH)D (< 50nmol/L) et 6% présentent des concentrations plasmatiques en 25(OH)D < 25nmol/L. Une récente méta-analyses regroupant 95 études (Saraf et al. 2016) a permis de définir des concentrations maternelles et chez les nouveau-nés, en 25(OH)D, dans différentes régions du monde. Ces régions sont définies par l'OMS comme étant : les Amériques, l'Europe, l'est Méditerranéen, l'Asie du sud-est et le Pacifique ouest.

Chez les femmes de ces différentes régions la prévalence de 25(OH)D < 50nmol/L et < 25nmol/L sont de respectivement : 64% et 9% pour les Amériques, 57% et 23% pour l'Europe, non documenté et 79% pour l'est Méditerranéen, 87% et non documenté pour l'Asie du sud-est, 83% et 13 % pour le Pacifique ouest.

Chez les nouveau-nés, on retrouve des valeurs de : 30% et 14% pour les Amériques, 73% et 39% pour l'Europe, 60% et non documenté pour l'est Méditerranéen, 96% et 45 % pour l'Asie du sud-est, 54% et 14% pour le Pacifique ouest (**Figure 4**).

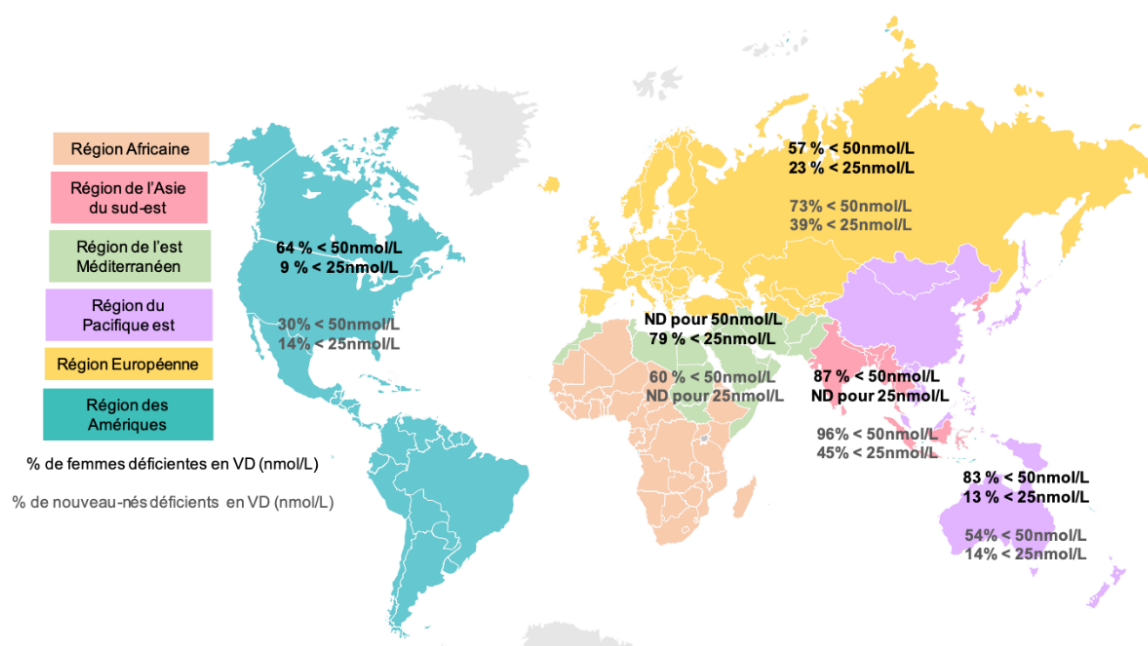


Figure 4 : Statut en 25(OH)D maternel et chez le nouveau-né mondial

(Données issues de l'OMS et Saraf, 2016)

1.7.3.2 La déficience en VD, conséquences pour la mère et l'enfant

Le statut maternel en vitamine D conditionne le statut fœtal et néonatal en vitamine D, puisque le fœtus est totalement dépendant des nutriments provenant du placenta. La 25(OH)D se diffuse via le placenta et il y a une corrélation linéaire directe entre les niveaux de 25(OH)D retrouvés dans le sang ombilical, qui sont plus bas, que ceux retrouvés dans le sérum de la mère (Delvin et al. 1982). De plus, le nouveau-né dispose d'un stock en vitamine D établi *in utero*, lequel pourrait être amoindri en cas d'insuffisance maternelle en vitamine D au cours de la grossesse.

Les concentrations en vitamine D, dans le lait maternel, sont supérieures à celle de la 25(OH)D et de la 1,25(OH)₂D, du fait que la vitamine D passe plus facilement de la circulation sanguine au lait que ces deux métabolites (Hollis, Pittard, and Reinhardt 1986). En moyenne les concentrations en vitamine D dans le lait sont basses, de l'ordre de 0,25 à 2 µg/L. Cela représente environ 0,9 µg/jour de vitamine D sécrétée dans le lait au cours des 6 premiers mois, ce qui n'est donc pas suffisant pour prévenir le rachitisme chez l'enfant allaité (Panel and Nda 2013). La supplémentation en vitamine D serait donc à envisager pour que l'enfant dispose des taux adéquats en vitamine D pour son développement. D'autant plus que les femmes allaitantes semblent présenter un plus grand risque d'être insuffisantes en vitamine D, que les femmes n'allaitant pas, en l'absence de supplémentation (Gellert, Ströhle, and Hahn 2017).

Chez la femme enceinte, des taux de 25(OH)D < 50nmol/L semble être associés à un risque augmenté de pré-éclampsie, qui se caractérise par une augmentation de la pression artérielle et de protéines dans les urines (Scholl, Chen, and Peter Stein 2013). Il est important de souligner que la pré-éclampsie est responsable d'un tiers des grands prématurés en France (entre 6 et 7 mois). C'est également une cause du retard de croissance intra-utérin ou SGA (*Small for Gestational Age*). En effet, des concentrations de 25(OH)D comprises entre 25-37 nmol/L, voire en deçà, semblent augmenter le risque de SGA (Burriss et al. 2012; Gernand et al. 2013). Une étude conduite auprès de 2274 femmes semble également montrer que le faible niveau d'éducation est associé à un taux de 25(OH)D abaissé, lui-même associé à un risque plus élevé de SGA chez la descendance (Berg and Eijdsden 2013). Des taux plasmatiques abaissés en vitamine D au cours de la grossesse (notamment pendant le 3^{ème} trimestre) semblent être associés à un faible poids de naissance (Horan et al. 2015), en lien avec un risque augmenté de SGA (Y. Chen et al. 2017), une diminution de la circonférence crânienne et de la taille du corps (Miliku et al. 2016).

De plus, des concentrations inférieures ou égales à 43 nmol/L pendant la grossesse sont associées à des événements osseux chez le nouveau-né de moins d'un an. Chez l'enfant, l'apparition de rachitisme est associée à des niveaux en 25(OH)D < 30 nmol/L avec des taux adéquats en calcium, cette association n'est pas retrouvée pour des concentrations en 25(OH)D \geq 50 nmol/L. De même, il ne semble pas y avoir de corrélation entre l'absorption en calcium et des taux de 25(OH)D compris entre 30-50 nmol/L (Turck et al. 2016).

En somme, le statut vitaminique D de la mère est un élément essentiel à la bonne santé de la mère, au cours de la grossesse, mais également à celle du nouveau-né.

1.8 Supplémentation en vitamine D

Avant de recourir à l'utilisation d'une supplémentation, diverses recommandations peuvent être formulées. L'exposition aux UVB permet d'augmenter la synthèse de 25(OH)D sans risque d'intoxication, l'excès de vitamine D3 et de pré-vitamine D3 étant transformé en métabolites inactifs (Holick et al. 2007). Une exposition des bras et des jambes pendant 5 à 30 minutes, 2 fois par semaine, entre 10h et 15h, hors période hivernale, permet une augmentation significative des taux plasmatique de 25(OH)D. Une exposition du corps, en une journée, peut apporter 20000 UI de vitamine D. L'utilisation de lampe UV bien qu'envisagée, présente une limite, de par le risque de développer un mélanome (Holick 2011).

La compensation alimentaire en vitamine D présente également des limites, puisque peu d'aliments en contiennent naturellement et de façon significative. De plus, ces aliments présentent souvent une forte teneur en lipides et ne sont donc pas adaptés à une forte consommation : l'ANSES recommande pour la population générale, de limiter la consommation de poissons gras à deux fois par semaine, afin de minimiser les risques d'exposition à certains métaux lourds.

La supplémentation en vitamine D est largement utilisée et les modalités de prescription ont largement été étudiées et débattues. Les formes D3 et D2 présentent une efficacité similaire pour augmenter les niveaux plasmatiques en 25(OH)D, consécutivement à l'administration d'une forte dose (100 000 IU), ou sur une période de supplémentation courte. À long terme, la vitamine D3 semble mieux appropriée que la forme D2 pour maintenir des taux plasmatiques en 25(OH)D au-dessus du seuil optimal, ce qui semble plus pertinent pour médier les effets classiques et non classiques de la vitamine D (Oliveri et al. 2015; U. Lehmann et al. 2013). Une posologie minimale de 800 UI/j de vitamine D3 apparaît nécessaire pour protéger l'os et semble être un prérequis utile en terme de santé publique (Audran and Briot 2010).

Les cas d'hypervitaminoses (ou toxicité de la vitamine D), sont plutôt rare et ont lieu dans le cas d'une supplémentation prolongée et à de fortes doses (Koutkia, Chen, and Holick 2001). Un excès de vitamine D peut entraîner des nausées, vomissements, de la perte de poids, maux de têtes, polyurie, et dans les cas sévères une hypercalcémie pouvant causer des risques rénaux et cardiaques potentiels (lithiase, néphrocalcinose ou arrêt cardiaque).

En ce qui concerne les femmes enceintes, la supplémentation en vitamine D est positivement associée aux concentrations circulantes de 25(OH)D, au poids de naissance et à la taille du nouveau-né (Pasupuleti et al. 2015). En France, les recommandations actuelles de supplémentation en vitamine D, pour les femmes enceintes, sont de 400 UI/j durant le dernier trimestre ou 100 000 UI, en simple dose, à 28 semaines de grossesse (Ceccaldi et al. 2017).

1.9 Mécanismes d'action de la VD

1.9.1 Effets génomiques de la vitamine D

Les effets génomiques de la vitamine D sont bien connus et font intervenir le *Vitamin D Receptor* (VDR) qui appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes. Le VDR s'exprime dans la plupart des tissus humains et dans un grand nombre de types cellulaires (Bouillon et al. 2008; Christakos et al. 2016). Cette distribution ubiquitaire du VDR permet d'expliquer qu'un grand nombre de gènes, entre 0.8%-5% du génome, soient régulés directement ou indirectement par la 1,25(OH)₂D (Bouillon et al. 2008). Dans la cellule, la 1,25(OH)₂D se lie au VDR (qui est sa cible nucléaire exclusive) et le complexe ainsi formé est transloqué dans le noyau, où il peut s'hétérodimériser avec récepteur de l'acide rétinoïque, le RXR. L'hétérodimère RXR-VDR et son ligand se lie à l'ADN sur des sites appelés éléments de réponse à la vitamine D (VDRE), dans les régions promotrices des gènes dont l'expression est ainsi activée ou réprimée. Cette régulation de l'expression des gènes cibles implique le recrutement de coactivateurs ou de corépresseurs lors de la fixation du ligand au VDR (Girgis et al. 2013) (**Figure 5**).

Typiquement en l'absence de ligand ou en présence d'antagoniste, des corépresseurs sont recrutés sur les gènes cibles, tandis que la présence de ligand agoniste, induit des modifications de la structure du VDR permettant l'interactions avec des coactivateurs (Rochel and Molnár 2017).

De même, le niveau de méthylation et d'acétylation de la chromatine sont des éléments qui vont orienter la régulation génique dans le sens de l'induction ou de la répression.

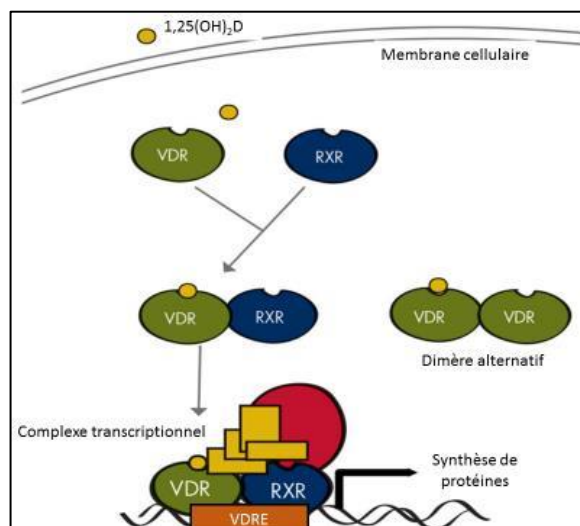


Figure 5 : Voie de signalisation de la vitamine D.

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se lie à son récepteur VDR, qui va s'hétérodimériser avec RXR, au niveau des éléments de réponse à la vitamine D (VDRE) situé sur les promoteurs des gènes cibles de VDR (D'après (Girgis et al. 2013)).

Enfin, le VDR a également la capacité de réguler l'expression génique, indépendamment de la présence de ligand, en s'hétérodimérisant avec RXR sur des régions promotrices. Cependant une méta-analyse sur la liaison entre le VDR et le génome de six modèles cellulaires a montré qu'en présence de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, le nombre de sites ADN se liant au VDR sont augmentés d'un facteur 2.5, comparé au nombre de sites de liaison en l'absence de ligand (Tuoesmäki et al. 2014). Le mode de régulation génique de la vitamine D, via le VDR, est donc multifactoriel et fait intervenir de nombreux cofacteurs de transcription. La vitamine D va, via ce mode de régulation génique, être impliquée dans de nombreuses voies telles que le métabolisme du calcium, la prolifération, la différenciation cellulaire, l'inflammation, l'apoptose ou encore l'angiogenèse (Landrier 2014). De manière générale, les profils d'expressions de gènes, ont permis de montrer les effets antiprolifératif et pro-différentiant suite à un traitement à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Ces effets ont été étudiés pour les cibles classiques de la vitamine D, c'est-à-dire, os, rein, intestin et les cibles non classiques, cellules malignes, musculaires lisses, immunes (Bouillon et al. 2008). Néanmoins il est difficile de comparer de telles études puisque les protocoles expérimentaux peuvent varier selon : les conditions de culture cellulaire, les concentrations en $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ utilisées, le temps de l'administration de la supplémentation. Pour ne citer qu'un exemple, l'absorption intestinale du calcium est en partie régulée par l'action du canal ionique *Transient receptor potential vanilloid type 6* (TRPV6). Son expression est induite directement par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ qui complexée au VDR va se lier sur des VDRE au niveau de régions promotrices de ce gène (Meyer et al. 2006).

1.9.2 Effets non génomiques de la vitamine D

La vitamine D et ses métabolites peuvent également avoir une action non-génomique. Les effets de la 1,25(OH)₂D dépendent du récepteur membranaire : la *Protein disulfide isomerase family A member 3* (Pdia3), également connue sous les noms ERp57, GRP58 et 1,25D3MARRS (Turano et al. 2011). Le rôle de ce récepteur est connu dans l'entérocyte, où il participe au captage rapide du calcium (Nemere et al. 2010).

Ce phénomène a également été décrit dans d'autres types cellulaires, tels que les ostéoblastes, les hépatocytes ou les cellules β du pancréas. Cependant le caractère ubiquitaire de ce type de régulation n'est pas encore établi. Le récepteur Pdia3, après fixation et activation par la 1,25(OH)₂D, active de nombreuses voies de transduction du signal parmi lesquelles : les phospholipases C et A2, les *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK), la protéine kinase C ainsi que les canaux calciques. Elles vont être à l'origine de réponses très rapides, de quelques secondes à quelques minutes, en contraste de la réponse génomique, qui prend généralement quelques heures à quelques jours (Bouillon et al. 2008). Ainsi à titre d'exemple, la 1,25(OH)₂D via Pdia3 va activer la protéine kinase C laquelle est impliquée dans la maturation des ostéoblastes (J. Chen et al. 2010).

Il est important de souligner que des travaux ont montré l'implication du VDR dans cette voie de signalisation rapide (J. Chen et al. 2013), ce qui confirme le rôle central de VDR dans la médiation des effets de la vitamine D.

1.9.3 Effets épigénétiques de la vitamine D

L'embryologiste Conrad Waddington a pour la première fois défini le terme épigénétique comme étant « les processus génétiques autres que le développement et la différenciation cellulaire » (Waddington 1942). Dans une définition plus générale, l'épigénétique regroupe tous les changements fonctionnels du génome, qui n'impliquent pas de changement dans la séquence d'ADN mais peuvent être héréditaires (C. Wu 2001).

Les mécanismes épigénétiques interviennent dans la régulation de nombreux processus biologiques via : la méthylation de l'ADN au niveau des cytosines, préférentiellement sur des séquences appelées « îlots CpG », mais aussi, la modification des histones par acétylation ou méthylation, ou encore les ARN non codants. Pour un promoteur donné, ces mécanismes participent à la modification de l'état conformationnel de la chromatine, qui est le complexe macromoléculaire formé par l'ADN et les histones (petites protéines avec une queue amino-

terminale riche en lysine et arginine). Celle-ci peut être ouverte (activée), on parle alors d'euchromatine ou fermée (réprimée), on parle alors d'hétérochromatine (**Figure 6**).

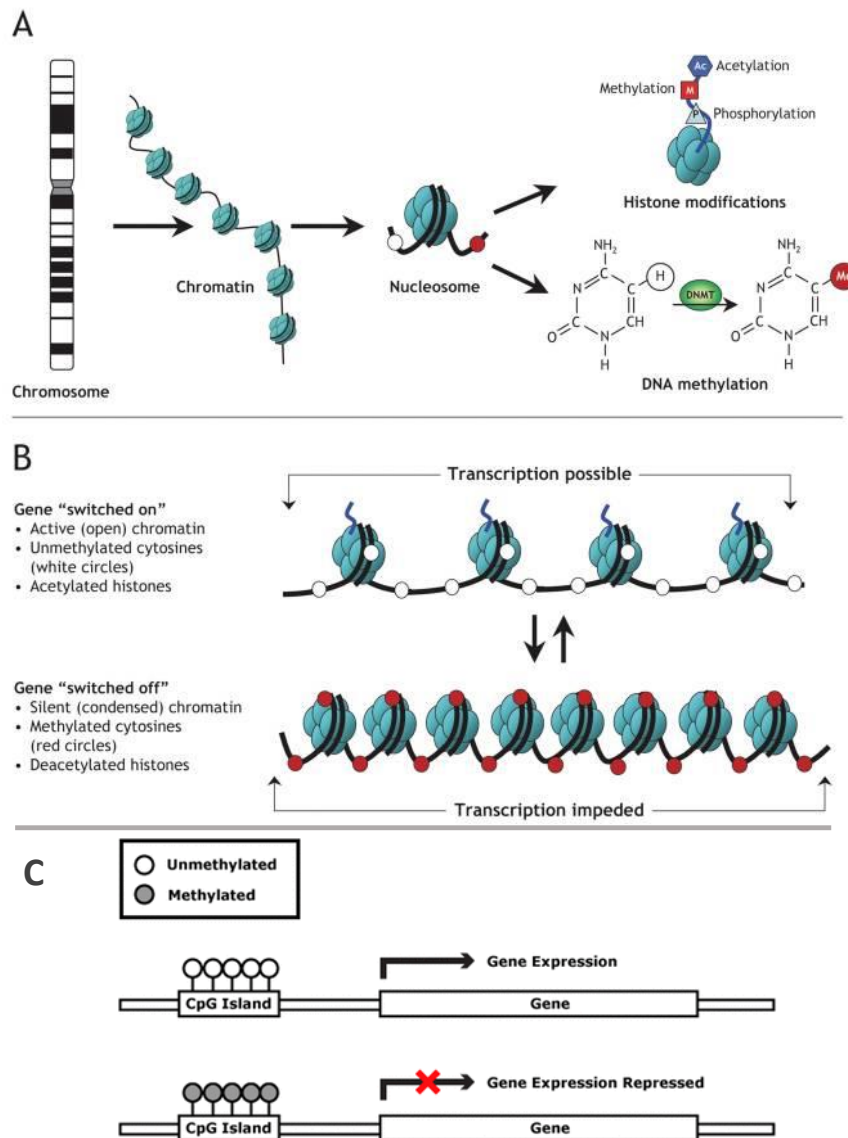


Figure 6 : Mécanismes épigénétiques généraux.

(A) Schéma des modifications épigénétiques. Les brins d'ADN s'enroulent autour de l'octamère d'histones pour former le nucléosome. Les nucléosomes s'organisent en chromatine, formant ainsi les chromosomes. Les modifications des histones (acétylation, méthylation, phosphorylation) sont réversibles et site-spécifiques. La méthylation de l'ADN peut se faire sur position 5' des résidus cytosines dans une réaction catalysée par les DNA méthyltransférases. (B) Schéma des changements réversibles de la conformation de la chromatine qui régulent l'expression des gènes. Les gènes sont exprimés (*switched on*) quand la chromatine est ouverte (active) et sont inactivés (*switched off*) quand la chromatine est condensée (réprimée). Les cercles blancs : cytosines non méthylées ; les cercles rouges : cytosines méthylées. (C) Îlots CpG dans les régions promotrices des gènes. Lorsque ces îlots sont méthylés, l'expression des gènes est réprimée. D'après (Fessele and Wright 2018)

La vitamine D peut, via la régulation génique médiée par le VDR, avoir des effets épigénétiques et donc interagir avec l'épigénome (Carlberg 2017). La première mise en évidence de cet effet épigénétique par la 1,25(OH)₂D, concernait l'hypométhylation du promoteur de l'ostéocalcine, qui induit l'expression du gène de l'ostéocalcine (Haslberger, Varga, and Karlic 2006).

Le premier niveau d'interaction entre la vitamine D et l'épigénome concerne le degré de méthylation de l'ADN, au niveau des îlots CpG, grâce à la modulation des DNA methyltransférases (DNMTs) (Fetahu, Höbaus, and Kállay 2014). Ainsi, la méthylation d'îlots CpG des gènes codant pour les protéines clefs, impliquées dans le métabolisme de la vitamine D, à savoir : VDR, CYP2R1, CYP27B1 et CYP24A1, conduit à une répression de leur expression. Inversement, les protéines *ten-eleven translocation* (TET) sont généralement impliquées dans la déméthylation des îlots CpG (Karlic and Varga 2011; Carlberg 2017). Il semblerait que la 1,25(OH)₂D soit capable d'induire la déméthylation de l'ADN, mais les mécanismes mis en jeu sont encore peu connus. Dans la plupart des cas, une déméthylation passive au cours des différents cycles de réplication aurait lieu. Cependant dans certains cas, il s'agirait d'une déméthylation active (de 1 à 4 heures) (Doig et al. 2013).

Le deuxième niveau, concerne les interactions protéines-protéines entre le VDR et les histones, par le biais de la régulation de leur niveau d'acétylation. D'une part, le VDR peut se lier à des coactivateurs, tels que les coactivateurs de la famille CPB/p300 ou de la famille p160 (les *steroïde receptor coactivators* (SRCs)), qui ont une activité d'histones acétyltransférases (HATs), vont donc permettre l'ouverture de la chromatine en acétylant la queue des histones (Bouillon et al. 2008). D'autre part, en association avec le VDR, des corépresseurs tels que NCoR1 (Herdick and Carlberg 2000), qui présentent une activité d'histones désacétylases (HDACs) aboutissant à la fermeture de la chromatine (**Figure 7**). La 1,25(OH)₂D participe ainsi à la régulation de l'activation et la répression de la chromatine, par le biais de ces coactivateurs et corépresseurs (Meyer and Pike 2013).

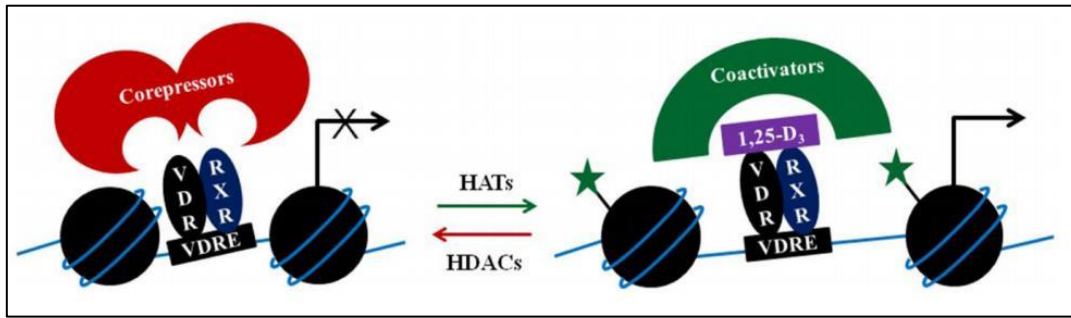


Figure 7 : Illustration simplifiée d'un modèle de co-régulation à deux étapes

Le complexe VDR/RXR en l'absence de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ peut se lier aux corépresseurs qui pourraient conduire ou maintenir la répression des gènes, en partie par l'attraction des histones désacétylases (HDAC). Lorsque le ligand se lie au complexe VDR/RXR, les corépresseurs sont remplacés par des coactivateurs, comme par exemple les histones acétyltransférases (HAT). L'acétylation des histones (indiquée par les étoiles vertes) permet la relaxation de la chromatine et la transcription du gène. D'après (Fetahu, Höbaus, and Kállay 2014)

Le troisième niveau concerne la régulation de la méthylation des histones au niveau des gènes cibles du VDR. Après liaison de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ au VDR, l'activation ou la répression de l'expression de ces gènes, dépendra notamment : i) du site au niveau de l'histone qui est méthylé ; ii) du degré de méthylation (mono-méthylation, di-méthylation, tri-méthylation) ; iii) des résidus amino-acides concernés ; iv) de leur position dans la queue de l'histone. Ce processus dynamique fait intervenir des histones methyltransférases (HMTs) et histones demethylases (HDMs) (Fetahu, Höbaus, and Kállay 2014; B. Fu et al. 2013; Pereira et al. 2012) (**Figure 8**).

Enfin, la vitamine D via le VDR est également capable de réguler l'expression d'ARN non codant, notamment des microARNs (miRs), directement ou indirectement, en modulant l'activité de facteurs de transcription (Lisse, Adams, and Hewison 2013; Karkeni et al. 2018).

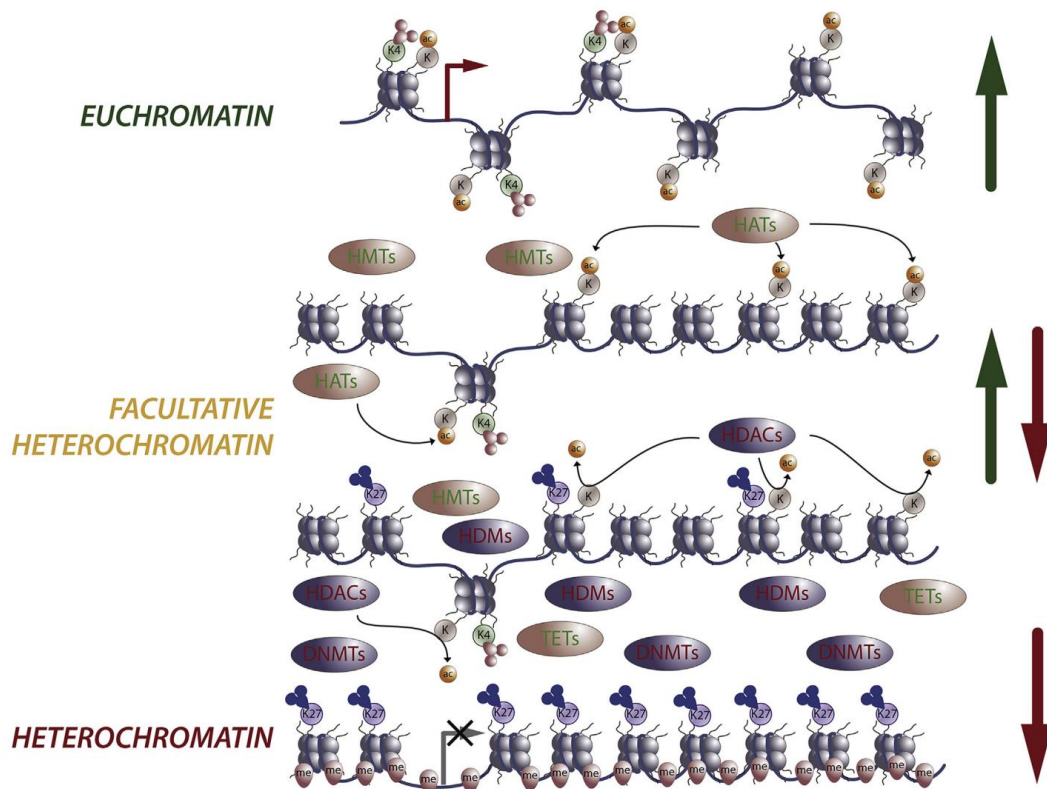


Figure 8 : Les différents états de la chromatine.

Association d'enzyme activant les gènes (HAT, HMT, TET) et réprimant les gènes (HDAC, HDM, DNMT) de l'euchromatine et de l'hétérochromatine (et deux des nombreux états intermédiaires de l'hétérochromatine facultative). Quelques marques d'histones sont représentées. L'acétylation des histones peut avoir lieu sur plusieurs résidus de lysines de la queue de l'histone. La méthylation des histones peut être la marque d'une chromatine active (ex : H3K4me3) ou d'une chromatine réprimée (H3K27me3). D'après (Carlberg 2017)

Récemment, de nombreuses avancées technologiques ont été faites et permettent une étude approfondie de la transcription. Ces avancées sont basées sur les techniques d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), où un facteur protéique peut être *cross-linké*, c'est-à-dire lié chimiquement, à son élément de réponse et utilisé pour immuno-précipiter de petits fragments d'ADN auxquels il s'était associé.

Alors que la quantification des ADN précipités (et donc amplifiés) était évaluée en utilisant des jeux d'amorces directement dirigés contre une région prédéterminée du génome (analyse ChIP-PCR), cette limitation de la position à définir a été outrepassée en hybridant les segments d'ADN sur des microarrays (ChIP on ChIP) et plus récemment en utilisant le séquençage (ChIP-seq). Ainsi l'analyse ChIP-seq permet de générer des informations mécanistiques précises à l'échelle du génome (Pike 2011).

L'utilisation de cette technique appliquée au VDR a permis de montrer que : i) en absence de ligand, le VDR se lie à un nombre de loci limités, au sein de la chromatine ouverte ; ii) que la présence du ligand ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) augmente le nombre de site où le VDR se lie à l'ADN ; iii) que des facteurs de transcription favorisent l'accès du VDR à l'ADN génomique ; iv) que la fixation du VDR résulte en une ouverture locale de la chromatine.

Au-delà de la capacité du VDR à se lier à l'ADN et à modifier la conformation chromatiniennne, comme décrit précédemment, la présence de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ va également impacter la configuration spatiale de la chromatine et donc réguler l'expression génique. En effet, elle va stimuler la formation de boucles CTCF formant des *Topological associated Domains* (TAD), en amont ou en aval des sites de liaison du VDR à l'ADN. Les TAD représentent des boucles génomiques de quelques centaines de kilobases à quelques mégabases (Hansen et al. 2018). Ils correspondent à un rapprochement local, préférentiel, entre deux loci (comme un *enhancer* et un promoteur) et vont ainsi organiser le génome humain en près de 20000 régions actives et inactives. En moyenne chaque cellule contient 20000 sites CTCF (*CTCF-binding factor*) dont environ 15% sont impliqués dans la formation et le maintien des régions TAD. La protéine CTCF étant un facteur de transcription dont la particularité est qu'il est hautement conservé entre les divers tissus et types cellulaires (Carlberg 2017). Par ce biais, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ va donc contribuer à l'architecture de la chromatine et ainsi réguler l'action transcriptionnelle du VDR, traduisant sa capacité à moduler l'épigénome des cellules et tissus cibles du VDR.

2. La vitamine D et ses tissus cibles

2.1 Généralités sur les tissus cibles

La principale fonction biologique de la vitamine D sous forme active est de maintenir l'homéostasie phosphocalcique dans la circulation sanguine, en association avec la PTH. Elle va ainsi exercer son action principalement sur l'intestin, les reins et l'os.

Dans l'intestin, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se lie au VDR pour faciliter l'absorption du calcium et du phosphore par un transport actif. Dans les reins, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ stimule aussi l'absorption tubulaire du calcium sous l'action de la PTH, laquelle induit la production de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ à partir de la $25(\text{OH})\text{D}$ dans le tubule proximale (Wysolmerski 2018).

Aussi, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ exerce un rétrocontrôle négatif sur la CYP27B1 (responsable de la conversion de la $25(\text{OH})\text{D}$ en $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ dans le rein). Dans l'os, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ et la PTH activent les ostéoclastes, responsables de la résorption osseuse et à terme entraînent le relargage de calcium et de phosphore dans la circulation sanguine à partir de la matrice osseuse (Holick 2006, 2007). La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ exerce également son action endocrine dans d'autres tissus qui expriment le VDR et la 1α -hydroxylase, tels que la glande parathyroïde où elle inhibe l'expression du gène de la PTH et ainsi inhibe la prolifération des cellules parathyroïdes (Bouillon et al. 2008). D'autres tissus seront moins spécifiquement ciblés par l'action de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ tels que la peau, le muscle, les cellules immunitaires, la prostate et les glandes mammaires (Girgis et al. 2013).

2.2 Le tissu adipeux

2.2.1 Description et composition

Le tissu adipeux est un organe à part entière qui regroupe deux types de tissus : le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc (forme majoritaire chez l'adulte). Il participe activement au maintien de l'homéostasie générale et par son expansion, au développement de l'obésité. Le tissu adipeux brun est majoritairement impliqué dans le contrôle de la thermogenèse, tandis que le tissu adipeux blanc, stocke l'énergie sous forme de triglycérides et la redistribue en fonction des besoins de l'organisme. Le tissu adipeux blanc se localise à 80% en position sous cutanée et à 20% en position intra-abdominale (tissu profond) (Lafontan and Berlan 2003).

Le tissu intra-abdominal se subdivise également en tissu adipeux viscéral (80%) et en tissu adipeux rétropéritonéale et périrénal (20%). La répartition du tissu adipeux est sexe-dépendant avec une accumulation environ 2 fois plus importante, chez la femme au niveau inférieur du corps (bassin, hanches et cuisses ; adiposité gynoïde), tandis qu'on retrouve cette accumulation au niveau de l'abdomen et du torse chez l'homme (adiposité androïde) (**Figure 9**).

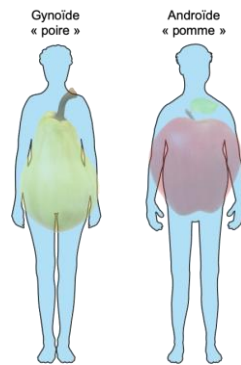


Figure 9 : Répartition du tissu adipeux en fonction du sexe : adiposité gynoïde et androïde

Le tissu adipeux blanc est constitué de deux populations cellulaires : les adipocytes (majoritaires) et la fraction stroma-vasculaire. L'adipocyte est une cellule de grande taille, provenant des cellules souches mésenchymateuses et composée d'une grande gouttelette lipidique uniloculaire (contenant les triglycérides) et de cytoplasme. La fraction stroma-vasculaire contient des leucocytes, macrophages, fibroblastes, préadipocytes, des cellules endothéliales et neuronales (**Figure 10**) (Ouchi et al. 2011; Cohen and Spiegelman 2016)

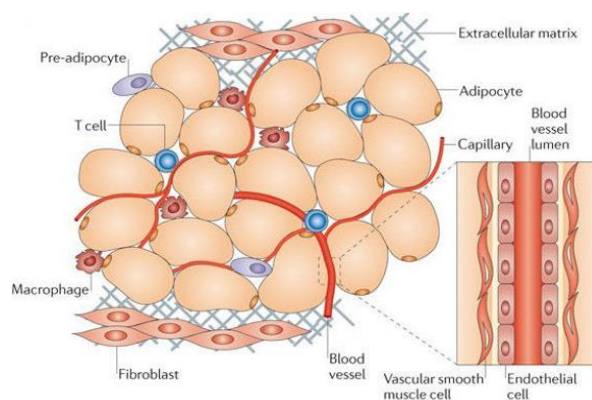


Figure 10 : Composition cellulaire du tissu adipeux blanc.

Les adipocytes constituent la population cellulaire majoritaire, et la fraction stroma-vasculaire comprend les autres types cellulaires dont les préadipocytes, les fibroblastes, les cellules vasculaires et immunitaires. Les cellules vasculaires comprennent les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses qui sont associées aux vaisseaux sanguins. D'après (Ouchi et al. 2011)

2.2.2 L'adipocyte

L'adipocyte est une cellule ronde, extensible, dont la majorité de l'espace intracellulaire est composé de plusieurs vacuoles lipidiques qui fusionnent en une et repousse donc le noyau et les autres organites vers la périphérie. Les adipocytes stockent 85% de la fraction lipidique sous forme de triglycérides (Trayhurn 2007). Le processus séquentiel de différenciation cellulaire permettant la formation des adipocytes matures est appelé adipogénèse. Initialement, c'est à partir des cellules souches mésenchymateuses que se développent les préadipocytes qui deviendront des adipocytes, par différenciation terminale. L'adipogénèse implique principalement des facteurs de transcriptions membres de la famille CREB (*cAMP Response Element Binding protein*), les *CCAAT-Enhancer binding Proteins* (C-EBP α), le *Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ (PPAR γ) et le *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1* (SREBP-1) (Fève 2005) (**Figure 11**).*

L'expression séquentielle de ces facteurs de transcription conduit à l'expression de gènes permettant l'acquisition par l'adipocyte de fonctions caractéristiques, comme la capacité à synthétiser et à hydrolyser les triglycérides, mais aussi, à sécréter des adipokines. Le sécrétome adipeux est en partie constitué des produits sécrétoires de l'adipocyte mais aussi de ceux de la fraction stroma-vasculaire (Esteve Ràfols 2014). Tous ces facteurs peuvent influencer les comportements alimentaires, la régulation énergétique, l'oxydation des lipides, la fonction vasculaire et immune, la situation hormonale, etc.

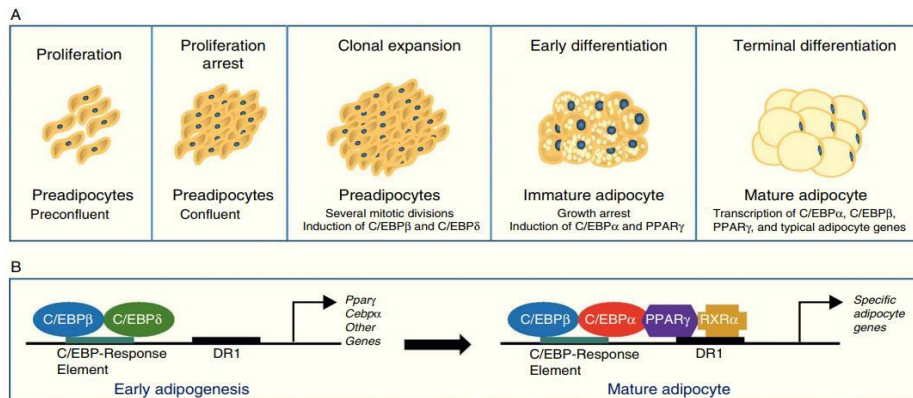


Figure 11 : Différenciation des préadipocytes en adipocytes.

(A) Différenciation du préadipocytes en adipocyte mature. (B) Modèle séquentiel de contrôle transcriptionnel de l'adipogénèse. D'après (Esteve Ràfols 2014)

Au cours de l'obésité, le tissu adipeux blanc peut voir sa masse augmenter par deux phénomènes : l'hyperplasie, c'est-à-dire une augmentation du nombre d'adipocytes par différenciation et l'hypertrophie (phénomène prépondérant) qui correspond à une augmentation

de la taille des adipocytes (Spalding et al. 2008). L'hypertrophie (résultant d'une accumulation de triglycérides) précède l'hyperplasie puisqu'à partir d'une certaine taille l'adipocyte ne grossit plus. Le tissu adipeux et l'adipocyte, dans le contexte d'obésité, seront confrontés aux phénomènes d'hypoxie, d'inflammation, de stress du réticulum endoplasmique, d'infiltration leucocytaire, d'accumulation des acides gras libres et de stress oxydant.

2.2.3 Effets de la vitamine D sur la biologie du tissu adipeux

2.2.3.1 Métabolisme de la vitamine D dans le tissu adipeux

La plupart des enzymes nécessaires au métabolisme de la vitamine D sont présentes dans le tissu adipeux (**Figure 12**) (Wamberg et al. 2013).

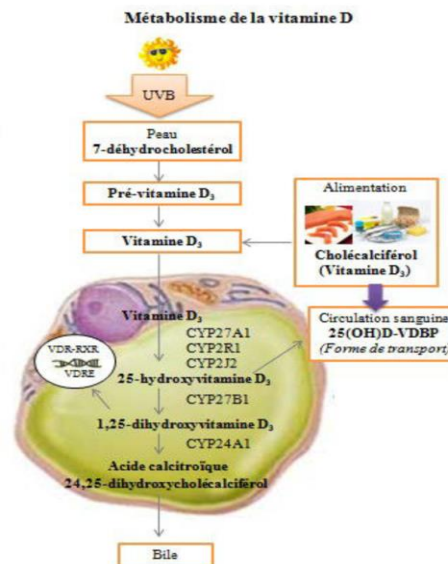


Figure 12 : Métabolisme de la VD dans le tissu adipeux.

La vitamine D est 25- et 1 α - hydroxylée dans le tissu adipeux. Ses métabolites sont inactivés par la CYP24A1. La 1,25(OH) $_2$ D peut se lier au VDR, être transloquée dans le noyau de l'adipocyte et s'hétérodimériser avec le RXR pour réguler l'expression de ses gènes cibles.

En effet, l'ajout de vitamine D dans un milieu de culture contenant des adipocytes promeut la sécrétion de 25(OH)D, par conversion de la vitamine D et met en jeu une 25-hydroxylation fonctionnelle (Zoico et al. 2014). La 25(OH)D peut être convertie en 1,25(OH) $_2$ D par la 1- α -hydroxylase qui est exprimée dans le tissu adipeux et fonctionnelle sur culture d'adipocytes (J. Li et al. 2008; Ching et al. 2011; Nimitphong et al. 2012). L'expression du VDR a également été reportée dans des adipocytes 3T3-L1, des lignées cellulaires humaines de préadipocytes

et d'adipocytes différenciés, ou encore, les adipocytes mammaires. Il est aussi exprimé dans le tissu adipeux (sous-cutané et viscéral) et son expression est régulée positivement par la présence de 1,25(OH)₂D (Ding et al. 2012; Kamei et al. 1993; Trayhurn, O'Hara, and Bing 2011).

De plus, notre groupe a mis en évidence que : i) toutes les enzymes nécessaires au métabolisme de la vitamine D sont présentes dans le tissu adipeux et l'adipocyte murin et certaines sont régulées par la 1,25(OH)₂D (Bonnet et al. 2018); ii) l'absorption de 25(OH)D au niveau des adipocytes murins 3T3-L1 est médiée en partie par la cubiline, une protéine d'endocytose (Bonnet et al. 2018); iii) le tissu adipeux et l'adipocyte en particulier jouent un rôle actif dans la production et le stockage de 25(OH)D, par modulation de l'expression des enzymes impliquées dans la 25- et 1,25-hydroxylation (Bonnet, Hachemi, et al. 2019). Globalement, on constate donc que des métabolites actifs sont produits par l'adipocyte et médient des effets biologiques sur l'adipocyte et plus généralement sur le tissu adipeux lui-même.

2.2.3.2 Effets anti-inflammatoires de la vitamine D

In vitro, la 1,25(OH)₂D diminue significativement la libération d'IL8, MCP1, IL6 par les préadipocytes humains (Gao, Trayhurn, and Bing 2013) et MCP1 par les adipocytes humains (Lorente-Cebrián et al. 2012) et les adipocytes murins (Marcotorchino et al. 2012). D'autres études ont également permis de montrer l'action anti-inflammatoire de la 1,25(OH)₂D sur le tissu adipeux et l'adipocyte conduisant à une diminution de l'expression de chimiokines, diminuant ainsi la migration de macrophages et de l'infiltration leucocytaire (Zoico et al. 2014; Karkeni et al. 2015; Lira et al. 2011). Notre groupe a participé à la description des mécanismes moléculaires médiant les effets anti-inflammatoires de la vitamine D, qui sont principalement liés à une inhibition des voies de signalisation NFκB et MAPK (Marcotorchino et al. 2012; Mutt et al. 2012) et une modulation de microARNs pro-inflammatoires (Karkeni et al. 2018).

2.2.3.3 Effets adipogéniques et métaboliques de la vitamine D

Les études *in vitro* ont montré que la 1,25(OH)₂D contrôle la différenciation et la prolifération des préadipocytes murins (Mutt et al. 2014) : en faible concentration, elle inhibe l'adipogénèse et réduit l'accumulation des triglycérides dans l'adipocyte (Kong and Li 2006). Les mécanismes moléculaires mis en jeu font intervenir une diminution de l'expression de régulateurs clés de l'adipogénèse, tels que C/EBP α et PPAR γ . D'autres mécanismes sont impliqués comme l'antagonisation de PPAR γ et la stabilisation de la protéine VDR (Blumberg et al. 2006; Kong and Li 2006). Cet effet inhibiteur de la 1,25(OH)₂D est controversé et varie en fonction du modèle utilisé. Ainsi, d'autres études ont montré que la 1,25(OH)₂D accroît la différenciation et l'accumulation lipidique dans l'adipocyte humain et dans les primocultures de préadipocytes murins (Nimitphong et al. 2012), et qu'elle induit l'adipogénèse dans les cellules souches humaines de tissu adipeux (Narvaez et al. 2013). Ces différences peuvent s'expliquer, en partie, par l'effet génomique du VDR dont l'action peut différer selon les coactivateurs recrutés et avoir donc des effets opposés dans la transcription génique (Silvagno and Pescarmona 2017). De plus, il semble que la 1,25(OH)₂D induit une augmentation significative de l'activité et de l'expression de la lipoprotéine lipase, dans les adipocytes 3T3-L1 (Querfeld et al. 1999) et qu'elle régule négativement la *fatty acid synthase* qui catalyse la lipogénèse (Kong and Li 2006).

La vitamine D et plus particulièrement la 1,25(OH)₂D est capable de réguler l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme énergétique du tissu adipeux. La 1,25(OH)₂D régule positivement l'expression et la sécrétion de leptine (Kong et al. 2013). De plus, notre groupe a montré qu'elle améliore l'absorption du glucose par les adipocytes (Marcotorchino et al. 2012). Celle-ci pourrait être liée à une induction de l'expression de la protéine *glucose transporter 4* (Glut4) et sa translocation dans les adipocytes 3T3-L1 (Manna and Jain 2012). Dans des études *in vivo*, la déficience en 1,25(OH)₂D ou en VDR a été associée à une diminution des taux de leptine, de l'adiposité, du poids et une augmentation de l'expression des *Uncoupling Proteins* (UCP). Les modèles de rats déficients en 1,25(OH)₂D, présentent également une réduction de l'adipogénèse, en lien avec une diminution de l'expression de PPAR γ et de la *fatty acid synthase*, mais aussi, une diminution de la masse musculaire menant à un phénotype cachectique (Bhat et al. 2014, 2013). D'autres études chez le rat déficient en vitamine D mettent, à contrario, en évidence que cette déficience est associée à une augmentation de la masse grasse (Domingues-Faria et al. 2014; Chanet et al. 2017).

La déficience en vitamine D chez la souris est également associée à une plus grande insulino-résistance et à une accumulation de graisses au niveau hépatique, chez les femelles (Giblin et al. 2017).

L'utilisation de modèles transgénique a également permis d'expliciter l'impact de la 1,25(OH)₂D et du VDR, sur le métabolisme énergétique, notamment lors de l'obésité. Ainsi, des souris VDR^{-/-} ou CYP27B1^{-/-}, qui ne synthétisent donc pas de 1,25(OH)₂D, présentent une résistance face à un régime obésogène (Narvaez et al. 2009). Ce phénotype (de type cachectique) est lié à une induction de la β-oxydation et de l'expression des UCP (1, 2 et 3) dans le tissu adipeux, conduisant à une augmentation de la dépense énergétique, de la consommation d'oxygène et de la dépense de CO₂ chez ces souris (Wong et al. 2009; Welsh et al. 2011). Aussi, les souris VDR^{-/-} accumulent moins de graisses dans le temps, en réponse à un régime riche en graisses (Weber and Erben 2013). Inversement, une surexpression du VDR humain, chez la souris, induit un phénotype obèse caractérisé par une augmentation du poids et de la masse grasse, due à une diminution de la dépense énergétique, une réduction de la β-oxydation des acides gras et une lipolyse (Wong et al. 2011). Ces données suggèrent donc un impact de la 1,25(OH)₂D et du VDR sur le métabolisme énergétique, par le biais d'une action sur le tissu adipeux blanc (Landrier et al. 2015). Cependant, il faut garder à l'esprit que ces phénotypes sont observés sur des animaux présentant des invalidations ou des surexpressions non-tissus spécifiques, ce qui complique l'analyse et ne permet pas de déterminer la contribution réelle du tissu adipeux. De plus pour rester en vie, ces animaux sont alimentés avec des régimes très riches en calcium, qui est également connu pour moduler l'homéostasie énergétique (Soares et al. 2012). Enfin, le VDR, en l'absence de son ligand, est capable de réguler négativement UCP1 (Malloy and Feldman 2013). Chez les souris VDR^{-/-}, l'expression de UCP1, conduisant à une résistance face à l'obésité, serait donc indépendante de la présence de ligand de VDR (Wong et al. 2009).

Ainsi, l'utilisation d'une supplémentation en vitamine D, dans le cadre de l'obésité, aura des effets variables sur le métabolisme du tissu adipeux en fonction : i) de l'espèce animale utilisée, ii) de la supplémentation administrée, iii) du temps d'exposition au régime riche en graisse. Ainsi des souris exposées pendant un an à un régime riche en graisse et faible en vitamine D présentent une diminution de la dépense énergétique, de la consommation d'oxygène, une altération de la glycémie et une élévation de la réponse inflammatoire. Lorsque ces souris sont supplémentées en vitamine D, le poids et l'adiposité sont augmentés, avec une aggravation du syndrome métabolique (Bastie et al. 2012).

A contrario, notre groupe a montré qu'une supplémentation en vitamine D pendant 10 semaines chez la souris limite l'expansion du tissu adipeux, l'augmentation des taux de glucose et d'insuline plasmatiques, et la prise de poids (Marcotorchino et al. 2014). Ceci est associé à une augmentation de la dépense énergétique due à une oxydation accrue de lipides.

En effet, l'expression de gènes impliqués dans l'oxydation des lipides et dans le métabolisme mitochondrial, est fortement induite dans le foie, le tissu adipeux brun ou encore le muscle des souris supplémentées en vitamine D. Cette activation de l'oxydation des lipides par la vitamine D dans le tissu adipeux a récemment été confirmée chez le poisson zèbre (Peng et al. 2017). De nombreuses études ont confirmé nos résultats et mis en évidence une limitation de la prise de poids en réponse à une supplémentation en vitamine D. Des résultats similaires ont été rapportés chez la souris (Sergeev and Song 2014), chez le rat jeune (Farhangi et al. 2017; Yin et al. 2012) ou âgé (Chanet et al. 2017). De plus, de façon cohérente, une augmentation de la masse grasse a été observée chez des rats déficients en vitamine D (Chanet et al. 2017; Domingues-Faria et al. 2014).

2.2.3.4 Les effets de la vitamine D en clinique

L'obésité est associée à de faibles concentrations plasmatiques en 25(OH)D et trois hypothèses semblent pouvoir expliquer cette association : i) la biodisponibilité de la VD dans l'organisme est diminuée par séquestration de la VD dans le tissu adipeux (Wortsman et al. 2000) ; ii) la dilution volumétrique de la VD dans le plasma, qui semble devenir l'hypothèse prépondérante (Drincic et al. 2012) ; iii) le métabolisme de la VD est modifié dans le tissu adipeux de patients obèses (Wamberg et al. 2013).

Les concentrations plasmatiques en 25(OH)D sont également inversement corrélées à des paramètres en lien avec l'obésité tels que le pourcentage de masse grasse (García, Long, and Rosado 2009; Vilarrasa et al. 2007; Gilbert-Diamond et al. 2010; Vitezova et al. 2017), l'IMC, l'HOMA-IR, la circonférence de la taille et les concentrations en marqueurs de l'inflammation (tels que IL-6, *high sensitivity C-reactive protein* hsCRP) (Jackson et al. 2016) (McGill et al. 2008). De plus, plusieurs études ont montré qu'une perte de poids et une diminution du pourcentage d'adiposité, sont associées à une augmentation des taux circulants de 25(OH)D plus ou moins marqués chez l'adulte obèse (Wamberg et al. 2013; Gangloff et al. 2015). La perte de poids combinée à une supplémentation en vitamine D semble également améliorer le statut vitaminique D de la personne obèse.

Néanmoins, la supplémentation en VD, à elle seule, n'entraîne pas de perte de poids de la personne obèse (Landrier et al. 2016), bien que le pourcentage de masse grasse semble être réduit (Salehpour et al. 2012; Himbert et al. 2017).

Chez l'Homme, l'impact de la vitamine D sur la régulation du métabolisme énergétique n'est pas très clair. Il semblerait que les taux de 25(OH)D soient liés à la thermogenèse et à l'oxydation lipidique (Teegarden et al. 2008) et donc que de faibles concentrations en 25(OH)D soient associées un déséquilibre de la balance énergétique.

De plus, les taux plasmatiques en vitamine D sont inversement corrélés avec les taux de lipoprotéines et de triglycérides circulants, ainsi qu'à une plus forte résistance à l'insuline (Reddy Vanga et al. 2010). Dans ce cadre, des études interventionnelles et essais cliniques randomisés semblent être en faveur d'un effet bénéfique de la vitamine D sur une amélioration de la résistance à l'insuline chez le patient diabétique (Seida et al. 2014; Mirhosseini et al. 2017) .

2.3 Le cœur

2.3.1 Description générale du cœur

2.3.1.1 Généralité sur le cœur mature

Le cœur est un muscle creux (myocarde) qui est recouvert par deux enveloppes : une externe nommée épicarde et une interne nommée endocarde. Il consomme à lui seul 10% de l'oxygène fournis par l'organisme et pèse environ 300 grammes chez l'adulte. Le cœur mature est constitué de plusieurs structures qui ont une forme et une fonction unique : i) le septum permet de séparer les 2 chambres et les flux sanguins artériels et veineux, ii) les valves assurent la bonne direction des flux, iii) les chambres se contractent pour pomper le sang, iv) le nœud sinusal (situé au sommet de l'oreillette droite) va générer un signal électrique, lequel va se propager grâce au système de conduction, pour permettre la contraction du muscle par le système de couplage excitation-contraction. Si l'une de ces structures ne se développe pas correctement le cœur présentera des dysfonctions sévères (Barnett, den Boogaard, and Christoffels 2012).

Les quatre chambres du cœur sont couplées deux à deux, formant le cœur droit et le cœur gauche avec une oreillette et un ventricule de chaque côté. Ces deux pompes fonctionnent en parallèle et permettent la circulation du sang (Kirby 2007). Le cœur droit réceptionne le sang veineux (ou sang bleu, flèche bleue dans la figure), pauvre en oxygène et riche en oxyde de carbone, au niveau de l'oreillette en provenance des divers organes du corps grâce à la veine cave supérieure et inférieure. De l'oreillette le sang bleu passe dans le ventricule, par la valve tricuspide, avant de rejoindre l'artère pulmonaire en direction des poumons. Le sang rouge, ré-oxygéné dans les poumons, rejoint l'oreillette gauche par les veines pulmonaires, passe dans le ventricule gauche par la valve mitrale et est éjecté dans l'aorte (via la valve aortique) pour rejoindre le reste de l'organisme (Rickert-Sperling, Kelly, and Driscoll 2016) (**Figure 13**).

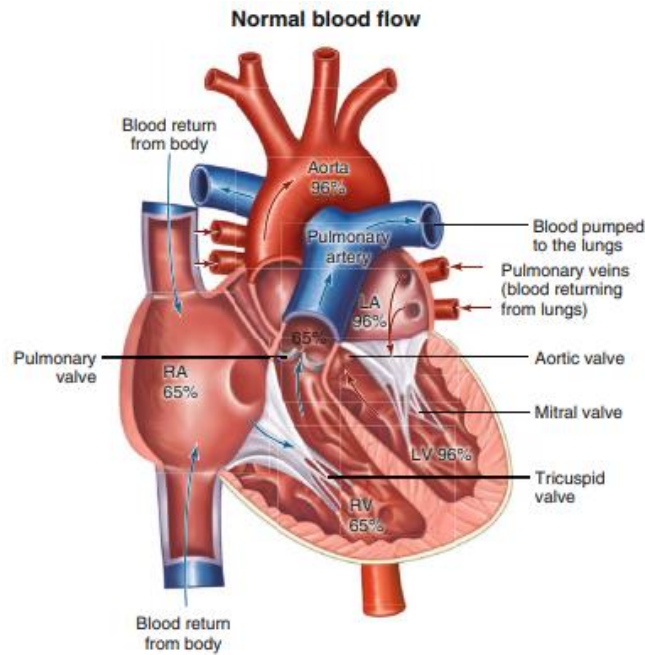


Figure 13 : Schéma représentant la morphologie des 4 chambres cardiaques, la saturation en oxygène et les flux sanguins.

La saturation en oxygène du sang est de 65% en retour des organes du corps, vers le cœur au niveau de l'oreillette droite et demeure à ce pourcentage dans le ventricule droit, puis dans l'artère pulmonaire en direction des poumons. Puisque dans les poumons, le sang devient oxygéné, il retourne dans l'oreillette gauche avec 96% d'oxygène et demeure à ce pourcentage jusque dans le ventricule gauche où il est pompé dans l'aorte jusqu'au reste du corps. RA : *right atrium* (oreillette droite), RV : *right ventricle* (ventricule droit), LA : *left atrium* (oreillette gauche), LV : *left ventricle* (ventricule gauche), pulm v. : *pulmonary valve* (valve pulmonaire), ao v. : *aortic valve* (valve aortique), tric v : *tricuspid valve* (valve tricuspide), mitral v : *mitral valve* (valve mitrale). D'après (Rickert-Sperling, Kelly, and Driscoll 2016)

Le cœur mature est composé de plusieurs types cellulaires : les cardiomyocytes (population cellulaire majoritaire et spécifique du cœur) (P. Zhou and Pu 2016), les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules du système de conduction (Nandi and Mishra 2015). La masse du cœur peut se voir augmentée par 2 phénomènes, comme précédemment décrit dans le tissu adipeux : par hypertrophie (taille augmentée) mais également par hyperplasie (nombre augmenté) des cardiomyocytes (Gezmish and Black 2013). Chez l'Homme, les cardiomyocytes prolifèrent par hyperplasie jusqu'à la naissance, puis, majoritairement par hypertrophie après la naissance (Mayhew et al. 1997). Chez le rat et la souris, jusqu'à 2 semaines après la naissance, les cardiomyocytes prolifèrent encore par hyperplasie, puis par hypertrophie (Leu, Ehler, and Perriard 2001).

2.3.1.2 Cardiogenèse embryonnaire : description générale

Le cœur est le premier organe fonctionnel à se développer dans l'embryon (Schleich et al. 2013). Il est formé, lors de la gastrulation, à partir de progéniteurs cardiaques issus du mésoderme qui vont se condenser pour former le croissant cardiaque. Celui-ci inclut les lignées précurseurs du myocarde (lesquelles donnent les cellules des chambres ainsi que les cellules de l'endocarde et les cellules conductrices (S. M. Wu et al. 2006)) dès 15 jours de gestation. Ce croissant est également connu sous le nom de *first heart field* (FHF). À 3 semaines, les précurseurs localisés bilatéralement vont migrer au centre pour former un tube cardiaque primitif linéaire qui est composé d'une couche endothéliale séparée par une « gelée » cardiaque de la couche myocardique. Le cœur commence à battre dès le 22^{ème} jour chez l'Homme (6^{ème} jour chez la souris). Le tube va s'allonger au fur-à-mesure que les cellules des champs secondaires ou *second heart field-derived* (SHF) s'ajoutent aux pôles caudal et crânien pour former une boucle ou « *looping* ». Les cellules du SHF expriment le facteur de transcription Islet-1 et vont se différencier en cardiomyocytes, cellules musculaires lisses et cellules endothéliales (Cai et al. 2003). À ce stade, le cœur devient fonctionnel puisque le sang est pompé du pôle veineux au pôle artériel. Pendant la 6^{ème} et 7^{ème} semaine de développement, les cellules endocardiques subissent une transition épithélio-mésenchymateuse et forment des bourrelets endocardiques dans le tronc efférent et dans le canal atrio-ventriculaire commun. La croissance de ces bourrelets va permettre la septation du cœur en 4 chambres distinctes et la séparation du tronc efférent en aorte et artère pulmonaire. Par la suite seront formés les valves et un système de conduction fonctionnel. Le cœur est totalement formé à 8 semaines (Miquerol and Kelly 2013) (**Figure 14**).

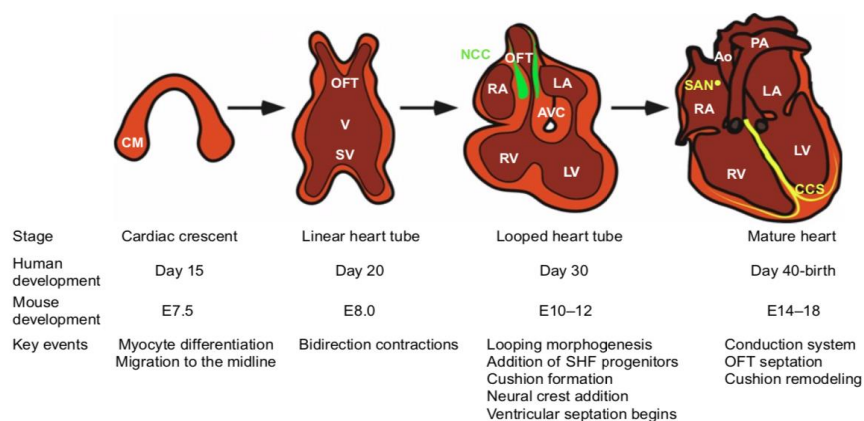


Figure 14 : Développement schématique du cœur chez les mammifères.

Le développement murin est annoté en jour embryonnaire (E). Ao : aorte; AVC, canal atrio-ventriculaire; CCS, système de conduction cardiaque; CM, mésoderme cardiaque; LA, oreillette gauche; LV, ventricule gauche; NCC, cellules de la crête neurale; OFT, *tronc efférent*; PA, artère pulmonaire; RA, oreillette droite; RV, ventricule droit; SAN, nœud sino-atrial; SV, sinus veineux; V, ventricule (McCulley and Black 2012).

La maturation des 4 chambres cardiaques s'effectue dès l'étape de *looping*, en parallèle de la septation atrio-ventriculaire, et se compose de deux processus distincts :

- La trabéculatation

Cette étape correspond à la formation de trabécules qui sont des projections du myocarde (dès E9.5 chez la souris) (Sedmera and Thompson 2011). Ces trabécules vont ensuite se propager dans le lumen, puis se remodeler, c'est-à-dire s'épaissir radialement, ce qui correspond à une phase de compaction (indépendamment de l'étape décrite ci-dessous). Cette étape se termine vers E.14.5 chez la souris. Des défauts dans ces étapes se traduisent par des trabécules fins, trop longs, qui peuvent être séparés par des invaginations profondes dans le mur myocardique (Sedmera et al. 2000).

- L'épaississement de la partie compacte du myocarde, c'est-à-dire du mur myocardique

L'étape de trabéculatation permet l'augmentation de la masse de cardiomyocytes durant l'embryogenèse, mais la partie compacte du myocarde représentera la plus grande partie myocardique du cœur adulte. Cette zone représente la partie la plus distale du myocarde qui va lentement proliférer en parallèle de la trabéculatation jusqu'au développement post-natal. Des défauts durant cette étape se traduisent par une mauvaise compaction du mur, telles que les non-compactions du mur ventriculaire gauche (Samsa, Yang, and Liu 2013; Sedmera and Thompson 2011).

2.3.1.3 Contribution du FHF et du SHF à la formation du cœur

Les cellules du SHF régionalisées en champ antérieur et postérieur participent à la formation des 4 chambres du cœur. D'une part, les cellules dans la partie antérieure du SHF contribuent aux cellules myocardiques du ventricule droit et du tronc efférent, ainsi qu'aux cellules musculaires lisses à la base de l'aorte et de l'artère pulmonaire. D'autre part les cellules postérieures du SHF contribuent aux cellules myocardiques des murs atriaux, du septum atrial et des cellules musculaires lisses des murs des veines systémiques et pulmonaires. Les cellules du FHF permettent de maintenir en formation les cellules du SHF et forment le ventricule gauche (Schleich et al. 2013; Kelly, Buckingham, and Moorman 2014) (**Figure 15**).

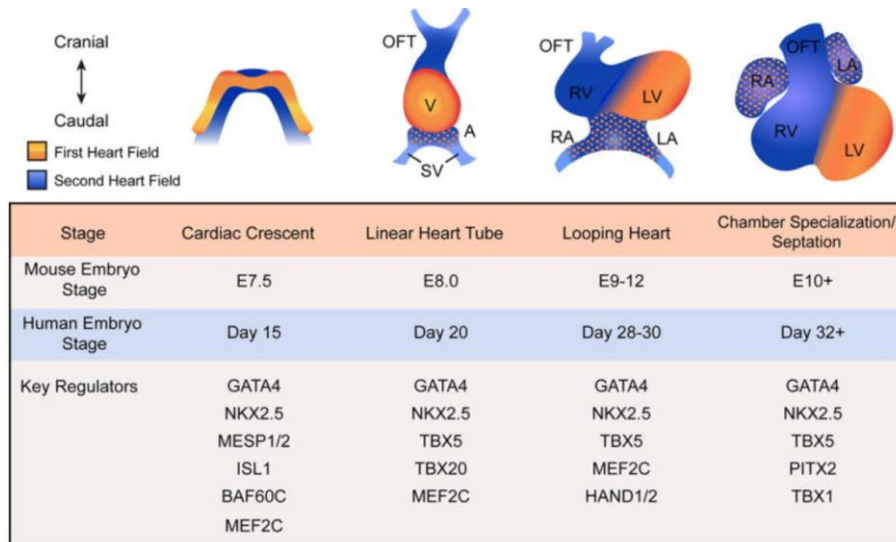


Figure 15 : Schéma global de la formation du cœur embryonnaire par le FHF et SHF

Le croissant cardiaque constitué par les progéniteurs cardiaques du FHF et du SHF est constitué pendant la gastrulation. La prolifération et différenciation des cellules en FHF conduit à la formation du tube linéaire cardiaque, donnant initialement naissance au ventricule gauche et une portion de l'oreillette. Les progéniteurs cardiaques antérieurs du SHF contribuent à la formation du ventricule droit, et du tronc efférent alors que les cellules postérieures du SHF forment l'oreillette et le tronc afférent. L'extension et le *looping* du tube permet le positionnement crânien des oreillettes par rapport aux ventricules. Des événements de remodelages vont moduler la formation et la septation des chambres et le développement des valves, résultant en la formation de quatre chambres cardiaques. Les facteurs de transcriptions qui régulent chaque étape du développement sont listées. FHF et ses dérivés sont en orange, le SHF et ses dérivés sont en bleu.

Plusieurs facteurs de transcription vont être impliqués dans la formation du cœur et les principaux sont : l'homéo-domaine protéine Nkx2.5, *GATA family zinc finger proteins* GATA4, 5 et 6 ; les facteurs MEF2 et SRF (*MADS box proteins*) ; facteurs T-box incluant Tbx1, Tbx2, Tbx5, Tbx18 et Tbx20 et le *Lim-homodomain protein* Isl. Ces facteurs de transcription vont interagir entre eux et avec beaucoup d'autres facteurs pour contrôler la formation du cœur, la maturation des chambre cardiaques, le système de conduction. Ainsi, des mutations dans les gènes codant pour ces facteurs de transcription (comme Nkx2-5, GATA4, Tbx5) vont être associées à des malformations cardiaques congénitales (McCulley and Black 2012). Se référer au point 3.3.1

2.3.2 Spécification des lignées cardiaques : le cardiomyocyte

La plupart des lignées cardiaques proviennent initialement de progéniteurs cardiaques, qui sont des cellules multipotentes issues du mésoderme. Celles-ci vont se différencier en cellules myocardiques (cardiomyocytes ou myocytes cardiaques), endothéliales, ou musculaires lisses par un phénomène qui se nomme *progressive lineage restriction* (Epstein 2010). La première distinction du mésoderme en mésoderme cardiaque avec ses progéniteurs est contrôlée par 3 familles de molécules de signalisation extra-cellulaire : *wingless integrated* (WNT), *fibroblast growth factor* (FGF) et *transforming growth factor-beta* (TGF β) (Noseda et al. 2011). Par la suite les différents types cellulaires seront issus des cellules mésodermique Mesp1+ (*mesoderm posterior 1*) du champs cardiaque primaire FHF puis du champs cardiaque secondaire SHF (Später et al. 2014; Brade et al. 2013; Lescroart et al. 2014) (**Figure 16**).

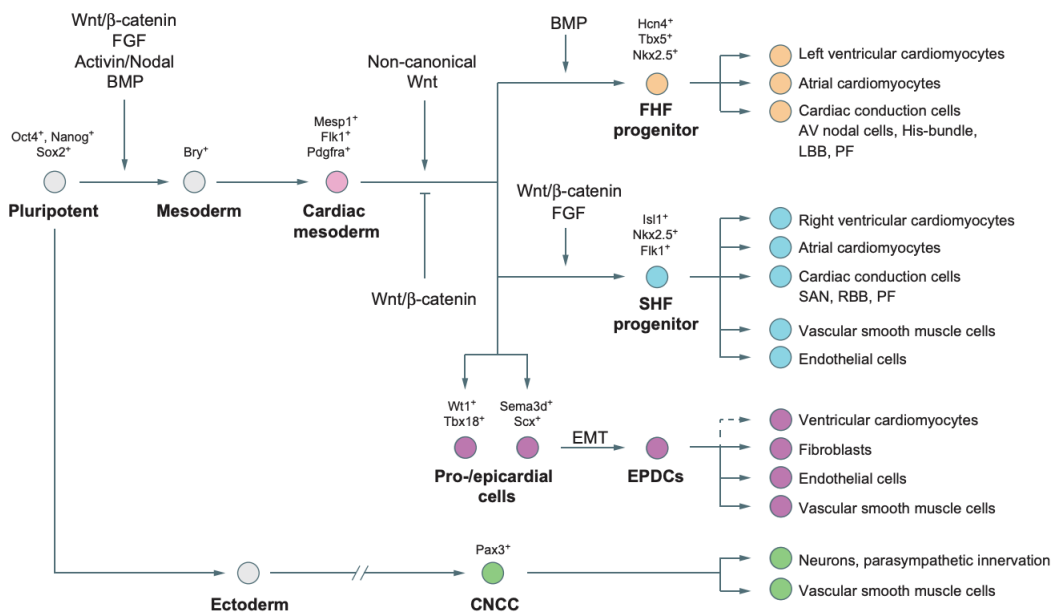


Figure 16 : Spécification des lignées cardiaques au cours du développement.

Différentes étapes permettent la transformation des cellules pluripotentes en cellules cardiaques matures. Les étapes intermédiaires peuvent être caractérisées par des signatures moléculaires spécifiques et la différenciation est influencée par des voies de signalisations variées. EPDC : *epicardium-derived cells*, EMT : *endothelial-to-mesenchymal transition*, SAN : *sinoatrial node*, RBB : *right bundle branch*, LBB : *left bundle branch*, PF : *purkinje fibers*, AV : *atrioventricular*. D'après (Später et al. 2014)

Le lignage cardiomyocytaire est donc hautement spécialisé et se compose de plusieurs sous-types caractérisés à la fois par leur localisation et leur fonction (Später et al. 2014). Les différents sous-types de myocytes cardiaques sont : les cardiomyocytes (ventriculaires ou atriales) et les cellules conductrices. Parmi les cellules conductrices, on trouve les cellules du nœud sino-atrial (SAN), du nœud atrio-ventriculaire (AVN), le faisceau de His, les branches gauches et droites du faisceau (LBB et RBB), et les fibres de Purkinje. De plus, les cardiomyocytes, comme toutes cellules musculaires, sont capables de se contracter mais également de conduire le signal électrique déclenchant la contraction. La fréquence selon laquelle le cœur se contracte est déterminée par les cellules *pacemaker* du SAN qui génère un potentiel d'action spontanée entraînant la dépolarisation et la contraction de l'oreillette. L'impulsion électrique converge vers le AVN et se répand dans le ventricule entraînant la dépolarisation des cardiomyocytes, assurant ainsi la contraction (Miquerol, Beyer, and Kelly 2011; van Weerd and Christoffels 2016).

Aussi, les myocytes cardiaques vont participer à la formation du cœur embryonnaire par 2 processus : la différenciation des précurseurs cardiaques et la division des cardiomyocytes préexistants. Dans le premier cas, les précurseurs participent à la formation du croissant et du tube primaire. Dans le deuxième, les cardiomyocytes *de novo* découlent de la différenciation de ces précurseurs et du champs cardiaque secondaire dans le mésoderme pharyngé (Foglia and Poss 2016).

2.3.3 Effet de la vitamine D sur le cœur

2.3.3.1 Études cliniques

De manière générale la vitamine D pourrait avoir un effet protecteur contre les événements cardiaques (infarctus du myocarde, malformations cardiaques) puisqu'elle : i) joue un rôle dans la fonction contractile du myocarde, ii) agit sur le remodelage de la matrice extracellulaire, iii) régule la sécrétion des hormone natriurétiques, iv) réduit l'hypertrophie ventriculaire gauche et v) régule l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Reddy Vanga et al. 2010). Une action indirecte de la vitamine D peut aussi affecter la fonction cardiaque, puisqu'elle régule les niveaux d'hormones parathyroïde et de calcium circulants (McGonigle et al. 1984). Chez l'Homme, de faibles taux de vitamine D sont associés à de l'hypertrophie ventriculaire gauche et une performance myocardique altérée (Seker et al. 2015).

Cette observation a été confirmée dans une étude regroupant 711 participants, où une association inverse entre les taux de vitamine D et l'hypertrophie ventriculaire gauche, mais aussi l'hypertension, a été objectivée (Ameri et al. 2013). De plus, des niveaux abaissés de 1,25(OH)₂D et 25(OH)D (<25nmol/L) sont également associés à une dysfonction du ventricule gauche (Pilz et al. 2008) et à une hypertrophie du ventricule gauche dans le cas de patient hypertendus (Seker et al. 2015). Enfin, une cohorte de 5108 sujets adultes en bonne santé, a permis de montrer que les individus ayant des concentrations en 25(OH)D < 20ng/ml (soit 50 nmol/L), présentent des anomalies de la fonction cardiaque, après analyse de leur électrocardiogramme (Tuliani et al. 2014).

2.3.3.2 Études in vitro et in vivo

La culture de cardiomyocytes a permis de montrer que l'ajout de 1,25(OH)₂D : i) inhibe la prolifération cellulaire (myocytes) sans promouvoir l'apoptose, ii) réduit l'expression de gènes liés à la régulation du cycle cellulaire, iii) promeut la formation des cardiomyotubes, iv) induit l'expression de la *Casein kinase-1- α 1* qui va donc réguler négativement la voie de signalisation canonique Wnt (essentielle dans le cœur en développement), iv) augmente l'expression de Wnt11 qui promeut la différenciation cardiaque (Hlaing et al. 2014; Meems et al. 2011) et v) promeut la contractilité des cardiomyocytes (Tishkoff et al. 2008).

La vitamine D semble donc jouer un rôle important dans le contrôle de la fonction cardiaque, en régulant l'expression de divers gènes et participant à la croissance et la différenciation des cardiomyocytes. De nombreuses études montrent notamment que la 1,25(OH)₂D, via le VDR, joue un rôle anti-hypertrophique. Le VDR peut se lier directement au niveau du promoteur du gène *human B-type natriuretic peptide* (hbnp) lequel est un marqueur transcriptionnel de la réponse à l'hypertrophie (S. Chen et al. 2008; Q. Li and Gardner 1994; J. Wu et al. 1996). Cette action est possible puisque le VDR est présent dans les noyaux des myocytes, des fibroblastes et dans le myocarde ventriculaire chez l'Homme et le rongeur. De plus la 1- α -hydroxylase et la 24-hydroxylase impliquées dans la synthèse et le métabolisme de la 1,25(OH)₂D sont également présentes dans le cœur (données dans le cœur de rat) (S. Chen et al. 2008). Chez le *zebrafish*, la vitamine D promeut la prolifération des cardiomyocytes, dans différents contextes (régénération et croissance du cœur) et la modulation tissu-spécifique de son activité contrôle la taille du cœur (Han et al. 2019). Aussi, la supplémentation en vitamine D chez le rat diabétique, réduit le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche et atténue l'expression de TNF α en inhibant la voie de signalisation NF- κ B/p65 (Al-Rasheed et al. 2015).

D'autres études animales ont également permis de suggérer le rôle de la vitamine D et/ou du VDR, en condition d'hypertrophie cardiaque. Tout d'abord, lors d'une induction de l'hypertrophie dans les myocytes *in vivo* et *in vitro*, l'expression en ARNm du VDR et de la quantité de protéines VDR sont augmentées (S. Chen et al. 2008). De plus, des modèles de souris VDR^{-/-}, présentent une hypertrophie ventriculaire gauche mais également une augmentation de la taille des cardiomyocytes (Rahman et al. 2007), ces malformations sont également retrouvées dans les modèles de souris KO pour l'enzyme 1 α -hydroxylase (Meems et al. 2011). Un modèle KO anti-sens pour le VDR dans le cœur de *zebrafish* a confirmé l'importance du VDR dans le développement cardiaque, avec dans ce modèle, l'apparition d'un phénotype caractérisé par un œdème péricardique, un rythme cardiaque ralenti et des défauts de latéralité (Kwon 2016).

De même, des rats déficients en vitamine D présentent une hypertrophie cardiaque (indépendante des taux plasmatiques de calcium), avec une diminution de l'aire totale occupée par les myofibrilles dans le myocarde, une augmentation de l'espace extracellulaire et une augmentation du collagène myocardique (Weishaar and Simpson 1989; Fraga et al. 2002). Chez des mâles rats Wistar, ont été étudiés les effets de la carence en vitamine D (induite par la nutrition) sur le métabolisme, la morphologie et la fonction cardiaque. Une association significative entre la carence en vitamine D et l'inflammation cardiaque, le stress oxydatif, des changements dans le métabolisme énergétique, l'hypertrophie cardiaque, des altérations de l'oreillette et ventricule gauche, de la fibrose, de l'apoptose et une dysfonction systolique a été rapportée. Ces résultats ont été associés à une augmentation de la sécrétion de cytokines, telles que TNF α et IFN- γ (*interferon-gamma*) (Assalin et al. 2013).

Toutes ces études suggèrent donc un rôle pathogénique de la carence en vitamine D sur l'hypertrophie ventriculaire gauche et la fonction cardiaque. *A contrario*, la supplémentation en vitamine D aurait un effet cardio-protecteur.

3. Programmation foetale et carence maternelle en vitamine D

3.1 Qu'est-ce que le DOHaD ?

L'origine développementale de la santé et des maladies ou « DOHaD » pour *developmental origins of health and diseases*, est un concept selon lequel l'environnement précoce de la vie peut impacter le risque de développer des maladies chroniques, anciennement qualifiées de maladies non transmissibles, de l'enfance à l'âge adulte. En d'autres termes le DOHaD correspond à la programmation foetale ou développementale. C'est dans les années 1980 que les études épidémiologiques de Barker et son équipe ont, pour la première fois, associées le faible poids de naissance (comme indicateur d'une nutrition foetal altérée) et une augmentation du risque de développer du diabète de type 2 et de l'hypertension (Hales et al. 1991; Barker 1986). Outre le faible poids de naissance, d'autres conditions ont été associées à un risque de développer une pathologie à l'âge adulte. Ainsi, un fort poids de naissance a été associé chez les enfants issus de mères présentant un diabète (type 1 et 2) avec une incidence augmentée d'obésité et d'intolérance au glucose (McCance et al. 1994). De même, des travaux portant sur la descendance de femmes Néerlandaises enceintes lors de l'épisode la famine de 1944, ont montré l'influence du stade d'exposition au facteur de risque (famine/sous nutrition) durant la période péri-conceptionnelle. Ainsi, une exposition précoce au cours de la grossesse, semble être plus critique, qu'une exposition tardive à la famine. En effet, dans le premier cas, elle a été associée chez la descendance à de l'intolérance au glucose, des cancers du sein, de la sensibilité au stress, des altérations de la coagulation sanguine, tandis qu'une exposition tardive n'était associée qu'à l'intolérance au glucose (Roseboom, de Rooij, and Painter 2006) (**Figure 17**).

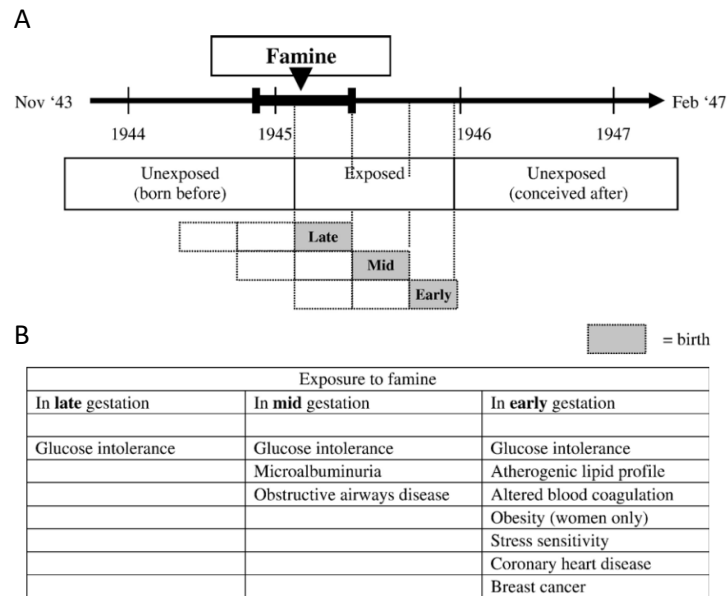


Figure 17 : Cohorte des naissances de la famine Hollandaise et impacts à long terme.

(A) Naissance et temps d'exposition à la famine. (B) Conséquences à long terme de l'exposition à la famine en fonction du stade d'exposition durant la grossesse. Adapté d'après (Roseboom, de Rooij, and Painter 2006).

Le terme « programmation nutritionnelle précoce » est maintenant largement utilisé pour désigner l'impact de la nutrition dans sa globalité sur le devenir de la descendance (**Figure 18**). Il a été utilisé pour la première fois au cours d'expérimentations mettant en lien l'utilisation de différentes préparations de laits chez les nouveau-nés prématurés et un bénéfice sur le développement cognitif de ces enfants à l'âge de 8 ans (Lucas, Morley, and Isaacs 2009). Chez l'Homme, cette programmation pendant la phase de périconception (de la fécondation jusqu'au stade embryonnaire de blastocyste), s'étend à la période dite des 1000 jours, qui englobent le début de la grossesse à la 2^{ème} année de vie de l'enfant. Ainsi plusieurs publications ont suggéré qu'une prise de poids rapide pendant les premiers mois de vie, était un facteur de risque de développer de l'obésité chez l'enfant (Druet et al. 2012; Botton et al. 2008; Stettler et al. 2002).

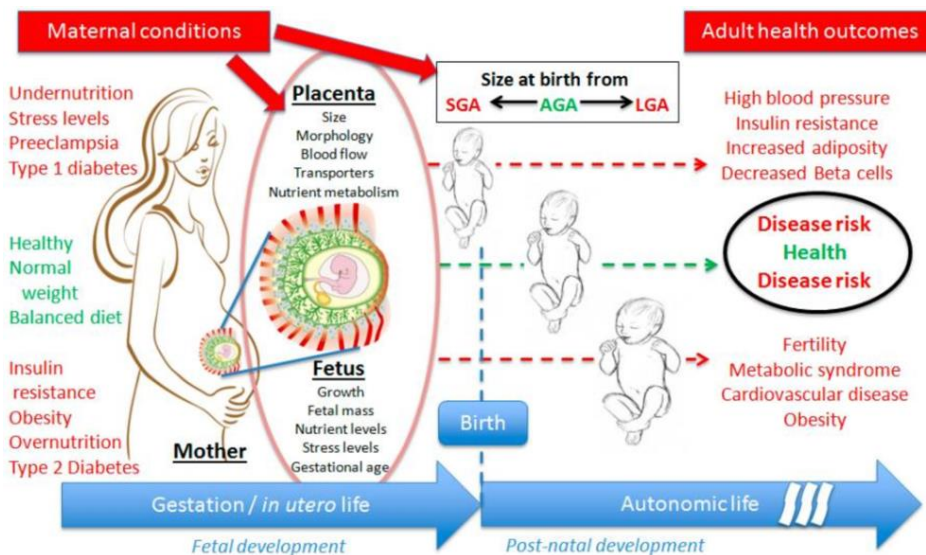


Figure 18 : Représentation schématique du DOHAD chez l'humain.

Plusieurs facteurs (non exhaustifs) au cours de la grossesse vont affecter la taille du nouveau-né (*Small for Gestational Age to Large for Gestational Age*) et avoir des impacts sur sa santé à long terme (Chavatte-Palmer, Tarrade, and Rousseau-Ralliard 2016).

Dans la littérature, les données issues des travaux épidémiologiques ont donc contribué à identifier, de nombreux autres facteurs qui pourraient influencer des processus biologiques, eux même susceptible d'influencer l'état de santé du futur individu, notamment : i) le mode de vie parental. ii) L'état nutritionnel et métabolique parental (surpoids, obésité, diabète de type 2), iii) Le statut socio-économique, qui renvoie à la notion d'intégration biologique ou « *embodiment* », c'est-à-dire, comment le milieu social devient biologique (Krieger 2005). Ainsi, des études ont montré que l'environnement socio-économique précoce peut perturber, à l'âge adulte, les systèmes de réponse au stress, inflammatoire et métabolique (Miller et al. 2009; Moisan and Le Moal 2012; Stringhini et al. 2013). iv) Le contexte psychologique (Rincel et al. 2016), qui ne sont que quelques exemples (**Tableau 6**).

Causes précoces	Conséquences à l'âge adulte
Restriction de croissance intra-utérine, faible poids de naissance	Diabète de type 2, surcharge adipeuse abdominale, hypertension artérielle, maladies cardiovasculaire, maladie rénale chronique, bronchopathies obstructives
Diabète gestationnel, obésité maternelle pendant la grossesse, prise de poids gestationnelle excessive	Obésité, insulino-résistance, diabète de type 2
Prématurité	Retard cognitif et moteur, diabète de type 2, hypertension,
Croissance post natale ralentie	Diabète de type 2, maladies cardiovasculaires
Croissance post natale excessive	Obésité, cancer
Exposition de la mère et du jeune enfant à des toxiques	Retard cognitif et moteur, obésité, puberté précoce, infertilité, cancer, hypertension, maladies cardiovasculaires
Infection maternelle pendant la grossesse, infections précoces de l'enfant	Asthme, maladies cardiovasculaires, autisme, schizophrénie
Situation psychosociale dans l'enfance difficile, carence affective	Retard cognitif et moteur, troubles émotionnels et comportementaux, obésité

Tableau 6 : Relations entre causes précoces et maladies survenues à l'âge adulte décrites dans la littérature.

Malgré l'accumulation d'études épidémiologiques, de type rétrospectives ou prospectives, l'utilisation de modèles animaux a été nécessaire pour confirmer le concept de programmation, développementale et nutritionnelle précoce, notamment dans le cadre de maladies métaboliques et cardiovasculaires (Chavatte-Palmer, Tarrade, and Rousseau-Ralliard 2016; Charles, Delpierre, and Bréant 2016). Parmi ces modèles animaux on retrouve : la restriction alimentaire *in utero* (restriction calorique ou protéique) (Snoeck et al. 1990; Dahri et al. 1991; Garofano, Czernichow, and Bréant 1999), la restriction utéroplacentaire (Simmons, Templeton, and Gertz 2001) et l'exposition au stress (par exemple au glucocorticoïdes) (Reinisch et al. 1978; Moisan and Le Moal 2012).

De façon intéressante, l'étude de Reichetzeder et al., combinant une étude clinique et pré-clinique démontre l'importance de la micronutrition maternelle au cours de la gestation. Il y est en effet suggéré qu'une déficience sévère en vitamine D chez la femme, est associée à un faible poids de naissance lié à un retard de croissance gestationnel. Chez l'animal, il n'y a pas de différence de poids observée à la naissance, mais les souris issues de femelles carencées sont plus petites à 15 jours, ont une mortalité augmentée avant sevrage et présentent un défaut de tolérance au glucose (Reichetzeder et al. 2014).

Enfin, le dernier facteur ayant consolidé le concept de DOHaD est l'épigénétique. Tout d'abord, parce qu'un plus grand nombre de marques épigénétiques se mettent en place pendant la périconception (Chavatte-Palmer et al. 2016).

En effet, les génomes hérités des gamètes parentaux ou génomes parentaux, vont tout d'abord être reprogrammés, par déméthylation de l'ADN et des histones ou acétylation des histones, pour constituer le génome embryonnaire (Gabory and Dandolo 2005). De plus suite à l'implantation embryonnaire, une reméthylation du génome a lieu (Chavatte-Palmer et al. 2016). Ensuite, l'environnement parental peut également altérer ces marques épigénétiques, lesquelles seront héritées par la descendance selon plusieurs modes de transmission (Junien 2011; Hanson and Gluckman 2014) (**Figure 19**).

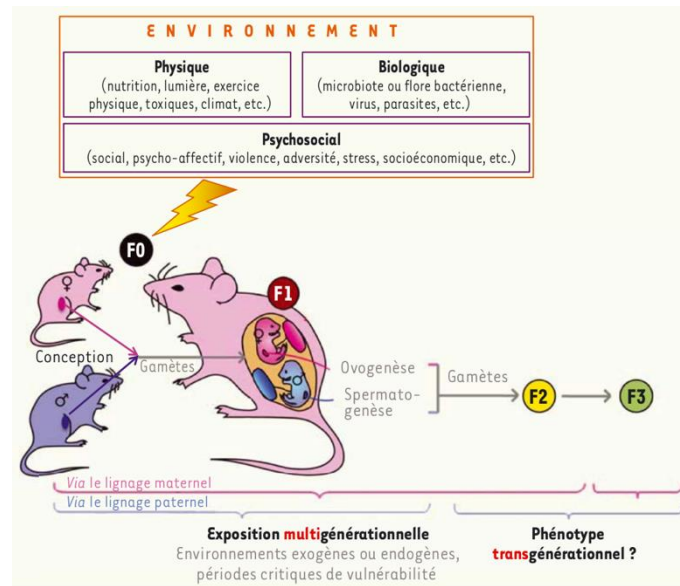


Figure 19 : La transmission multigénérationnelle et transgénérationnelle des expositions à l'environnement diffère en fonction du sexe des parents.

D'après (Junien, Panchenko, Fneich, et al. 2016)

On parle de transmission multigénérationnelle entre les générations (F0) à (F2) en cas d'exposition maternelle et entre les générations (F0) à (F1) en cas d'exposition paternelle. La transmission transgénérationnelle, c'est-à-dire méiotique, n'est visible que sur la génération (F3) pour un lignage maternel (F0) et (F2) pour un lignage paternel (F0). Les effets observés en deçà sont appelés intergénérationnels (Gabory et al. 2013; Junien, Panchenko, Pirola, et al. 2016).

3.2 Programmation maternelle et obésité

3.2.1 Généralité sur l'obésité

Selon l'OMS, l'obésité se définit comme « une accumulation anormale ou excessive de masse grasse constituant un risque pour la santé ». Cette pathologie est causée par une augmentation de l'apport énergétique associée à diminution de la dépense énergétique, conduisant à une augmentation de la masse du tissu adipeux. Les complications associées à l'obésités sont bien connues, on retrouve l'insulino-résistance pouvant aboutir à un diabète de type 2 et le syndrome métabolique. L'obésité semble également être un facteur de risque des maladies cardiovasculaires. En 2016, d'après les données de l'OMS, plus de 1,9 milliard d'adultes (> 18 ans) dans le monde sont en surpoids (soit 1 individu sur 5), parmi lesquels 650 millions sont obèses. Cela correspond à 39% des adultes âgés de plus de 18 ans pour les chiffres en lien avec le surpoids (38% des hommes et 40% des femmes) et 13% pour ceux en lien avec l'obésité (11% des hommes et 15% des femmes). L'obésité et le surpoids constituent la 5^{ème} cause de mortalité à l'échelle planétaire, ce qui correspond à 2,8 millions de morts chaque année.

De manière plus préoccupante, en 2016 il a été estimé que près de 50 millions de filles et 75 millions de garçons âgés de 5 à 19 ans sont atteints d'obésité dans le monde (Abarca-Gómez et al. 2017). Les enfants en surpoids ou affecté par l'obésité ont un risque accru de développer un diabète de type 2, de l'insulino-résistance (Hannon 2005) et des maladies cardiovasculaires à l'âge adulte (avec une augmentation des facteurs de risques associés, comme l'hypertension et l'hypercholestérolémie) (Umer et al. 2017).

L'Indice de masse corporelle (IMC) est un indice simple qui permet d'estimer le surpoids et l'obésité chez l'adulte, quels que soient le sexe ou l'âge de l'individu (Figure 20). Il donne toutefois une indication approximative car il ne correspond pas forcément au même degré d'adiposité d'un individu à l'autre et peut être biaisé par certaines situations physiologiques comme le vieillissement, la grossesse, la pratique de sport de haut niveau. Son calcul suit la formule : poids (en kilogramme) divisé par le carré de la taille (en mètre). En complément, un tour de taille supérieur à 102 cm chez l'homme et à 88 cm chez la femme, est un indicateur de l'obésité et est associé à un risque élevé de diabète et de maladies cardiovasculaires.

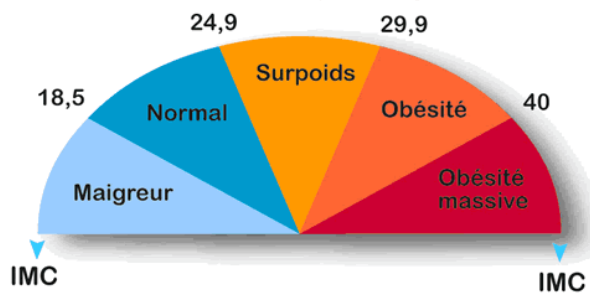


Figure 20 : Classification des individus en fonction de leur IMC

Plusieurs facteurs semblent interagir lors de la mise en place de l'obésité :

- Des facteurs environnementaux

Comme précédemment évoqué, l'obésité est causée principalement par un déséquilibre énergétique entre les calories consommées et dépensées. En d'autres termes une plus grande consommation d'aliments caloriques riches en graisses et en sucres mais pauvres en vitamines, en minéraux et autres micronutriments. Plusieurs autres facteurs de risques sont également suspectés (liste non exhaustive) : la pollution environnementale, la prise de médicaments, une faible activité physique liée à la sédentarisation, le manque de sommeil, le stress et l'anxiété (Wells 2013), le niveau d'étude (d'après l'étude ESTEBAN 2014-2016 en France).

- Des facteurs biologiques

Tels que l'âge, le sexe (bien que cette tendance s'amenuise), la présence de désordres physiopathologiques (ex : hypothyroïdisme), la modification du microbiote intestinal.

- Des facteurs génétiques

Perte de fonction de protéines impliquées dans le comportement alimentaire (ex : la leptine et son récepteur, la pro-opiomelanocrotine etc), l'identification de certains *single-nucleotides polymorphism* (SNP) répartis sur le génome humain, ou encore, la présence de certains *copy number variation* (CNV), résultants de réarrangements chromosomiques (avec par exemple l'association entre le CNV 10q11.22 et le gène *neuropeptide Y receptor*) (Aerts et al. 2016)

3.2.2 Quels facteurs maternels programment l'obésité ?

Au-delà des classiques facteurs de risque, on peut aussi s'interroger sur la place de la programmation maternelle dans l'étiologie de l'obésité. L'obésité maternelle est un premier paramètre pouvant entraîner des complications de la grossesse, susceptibles de retentir sur la croissance fœtale et la santé à long terme de l'enfant (Guelinckx et al. 2008), en augmentant notamment le risque pour l'enfant de développer lui-même de l'obésité (Whitaker 2004; Wang et al. 2017; Nicholas et al. 2016). La prise de poids excessive durant la grossesse est également associée à une plus grande adiposité de l'enfant à sa naissance (Crozier et al. 2010) et de manière plus générale au risque d'obésité chez l'enfant (Woo Baidal et al. 2016a). Plus récemment des études longitudinales ont permis de montrer que des expériences traumatisantes pendant l'enfance de la mère (tel que les violences physiques, l'alcoolisme, les maladies mentales dans le milieu familial) peuvent être associées à de forts IMC maternels, une prise de poids excessive durant la grossesse (Ranchod et al. 2016; Diesel et al. 2016; Nagl et al. 2016) et à terme, un risque d'obésité chez la descendance (Roberts et al. 2014; Leonard et al. 2017). D'autres facteurs tels que : i) l'utilisation de compléments alimentaires, ii) la consommation excessive d'alcool et de drogues, iii) la prise de certains médicaments (notamment antiépileptiques) (Camió, Milagro, and Martínez 2010; McAllister et al. 2009; Veiby et al. 2014), iv) le tabagisme, v) l'hyperglycémie pendant la grossesse (Trandafir and Temneanu 2016), vi) l'exposition à une mauvaise qualité de l'air, au trafic routier (bruit, les oxyde d'azote Nox) (Wilding et al. 2019) et plus globalement à un environnement pollué (Woo Baidal et al. 2016b), peuvent impacter le poids de naissance, l'adiposité et le risque d'obésité de la descendance. Cela montre l'importance du parcours de vie de la mère pour son enfant. Le diabète gestationnel semble également être un facteur qui promeut le développement de l'obésité, ainsi que des altérations du métabolisme glucidique chez la descendance (Metzger 2007), au même titre que l'obésité maternelle. Enfin, l'exposition maternelle à des perturbateurs endocriniens connus comme étant obésogènes (tributyltine, bisphénol A), qui semblent promouvoir la prise de poids et l'obésité, pourraient également avoir des effets tout au long de la vie de la descendance (Grün and Blumberg 2009).

Au-delà de l'impact de l'environnement maternel, le concept de POHaD a récemment émergé (pour *paternal origins of health ad diseases*) et met également en évidence l'impact du surpoids et de l'obésité paternelle sur la santé et le développement de la descendance. De nouvelles études chez la souris soumises à une alimentation induisant l'obésité, mettent notamment en évidence que les microARNs du sperme paternel peuvent être modifiés par ce changement environnemental et induire des marques épigénétiques chez la descendance. (Dupont et al. 2019).

3.2.3 Rôle de l'insuffisance maternelle en vitamine D sur l'obésité

3.2.3.1 Études chez cliniques

Au cours des dernières années, l'étude de grandes cohortes mères-enfants ont suggéré des associations entre teneur plasmatique en 25(OH)D chez la mère et différents paramètres caractérisant l'obésité chez l'enfant. Ainsi, de faibles concentrations en 25(OH)D durant la grossesse sont associées à : i) de faibles pourcentages de masse grasse à la naissance, ii) de forts pourcentages de masse grasse chez l'enfant âgé de 4 et 6 ans (Crozier et al. 2012; Boyle et al. 2017), iii) de plus faibles pourcentages de masse maigre chez l'enfant âgé de 6 ans et 9.5 ans (Miliku et al. 2018; Krishnaveni et al. 2011), iv) une plus forte insulino-résistance (Krishnaveni et al. 2011). Dans une plus petite cohorte, de faibles taux maternels en 25(OH)D ont été associés à une plus grande adiposité sous-cutanée et viscérale du nouveau-né (Tint et al. 2018). Enfin, d'autres données humaines associent le statut maternel en vitamine D avec l'IMC, le poids et le tour de taille de l'enfant. En effet, les concentrations en 25(OH)D durant la grossesse sont inversement corrélées à l'IMC et au tour de taille chez les enfants âgés de 4 et 6 ans (Daraki et al. 2018), mais aussi à un risque élevé de surpoids fœtal et néonatal (sans retrouver une telle association à 4 ans) (Morales, Rodriguez, et al. 2015).

Toutes ces études cliniques tendent donc à confirmer le rôle de la vitamine D sur programmation développementale de l'obésité chez la descendance. Cependant, des études sur le long terme (suivi jusqu'à l'adulte) n'ont pas encore été menées et les mécanismes précoces mis en jeu dans cette programmation restent encore à élucider.

3.2.3.2 Études animales

Une étude menée chez le rat montre que la carence maternelle en vitamine D, induite avant et pendant la gestation, semble promouvoir la différenciation et la prolifération des adipocytes et des préadipocytes chez la descendance male. Ce phénomène semble être associé à des modifications épigénétiques (méthylation d'îlots CpG), conduisant à un phénotype obèse (masse corporelle et adiposité augmentées) chez la descendance issue de femelles carencées (Wen et al. 2018). Chez la souris, la carence maternelle en vitamine D est également associé à un phénotype obèse chez la descendance mâle (masse corporelle plus élevée, adiposité, intolérance au glucose). Ces résultats ne sont pas conservés sur une deuxième génération (Nascimento et al. 2013).

Dans une seconde étude transgénérationnelle, une carence maternelle en vitamine D induite par un régime déficient en vitamine D (5 semaines avant l'accouplement jusqu'au sevrage) entraîne des perturbations de la méthylation de l'ADN dans les cellules somatiques du foie et germinale (du sperme) sur deux générations successives. Ces modifications épigénétiques sont associées à des différences au niveau du poids du corps et le ratio masse maigre/masse grasse sur les deux générations (Xue et al. 2016).

Cependant, cette association entre carence maternelle en vitamine D et phénotype obèse chez la descendance n'est pas systématiquement observée. Ainsi, dans une étude menée sur des rats mâles Sprague-Dawley issus de mères carencées en vitamine D au cours de la gestation, aucune différence de masse corporelle n'a été rapportée. Cependant ces animaux présentent une insulino-résistance (HOMA-IR élevée et tolérance au glucose abaissée) associée à une l'inflammation persistante (avec notamment des concentrations élevées dans le plasma et le foie de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) (Zhang et al. 2014). De même, des souris mâles issues de mères carencées présentant un retard de croissance intra-utérin et une croissance accélérée en début de vie, ne présentent pas une masse plus élevée à l'âge adulte. Néanmoins, ces animaux sont prédisposés à développer une hypertrophie adipocytaire suite à une régime riche en graisse (Belenchia et al. 2017).

Toutes ces données laissent donc à penser que la carence maternelle en vitamine D et l'environnement à l'âge adulte sont des paramètres à prendre en compte pour étudier la mise en place du phénotype obèse chez la descendance. De plus, cette programmation semble dépendre des modèles et régimes utilisés.

3.3 Programmation maternelle et malformations cardiaques

3.3.1 Généralités sur les malformations cardiaques

Les malformations cardiaques congénitales ou cardiopathies congénitales (CHD) se mettent en place au cours du développement fœtal, et correspondent aux anomalies congénitales les plus communes à la naissance (Sun et al. 2015). Ces altérations dans la construction du cœur surviennent lors des premières semaines de grossesse. Les malformations cardiaques incluent sous cette terminologie sont variées, on retrouve de manière non exhaustive : des malformations au niveau des valves, au niveau de septation atrio-ventriculaire (défaut de la septation ventriculaire, de la septation atriale, Tétralogie de Fallot), les sténoses (pulmonaire, aortique), l'inversion des grandes artères (nécessitant une intervention chirurgicale), mais aussi des défauts électriques tels que la bradycardie (rythme cardiaque trop lent) ou l'arythmie (rythme trop rapide), etc. (Sun et al. 2015) (**Figure 21**)

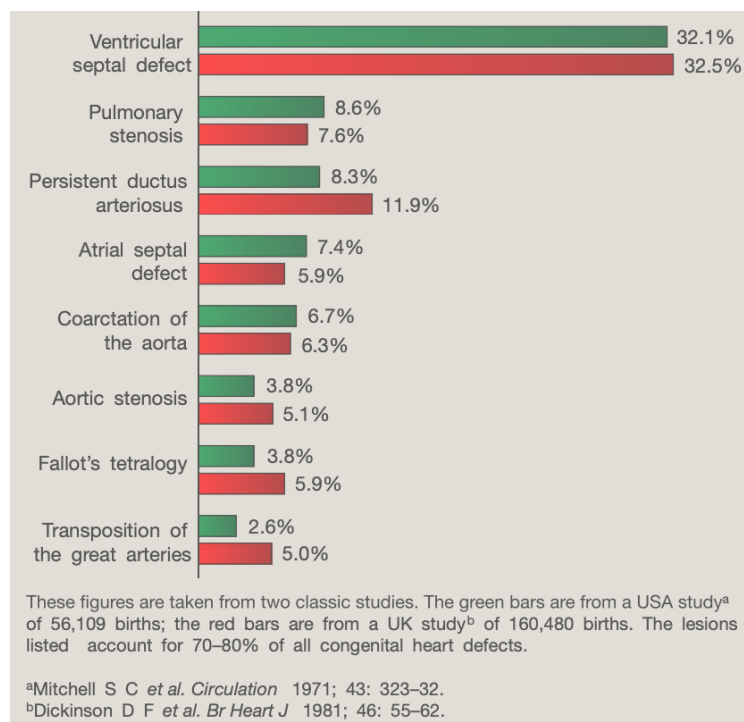


Figure 21 : Cardiopathies congénitales les plus communes.

Données issues de 2 études une américaine sur 56109 naissances (vert) et une anglaise sur 160480 naissances (rouge) D'après (Bellsham-Revell and Burch 2018)

Ces CHD affectent 8 nouveaux nés sur 1000 naissances. Ces chiffres n'incluent pas les malformations mineures qui peuvent se présenter plus tard au cours de l'enfance ou dans la vie, comme par exemple la présence d'une bicuspidie valvulaire aortique (normalement sous forme tricuspide) qui apparaît pour une personne sur 100 dans la population. Les cardiopathies congénitales sont plus communes pendant la période anténatale (de la conception à la naissance), puisque leur présence se traduit le plus souvent par une grande incidence d'avortements spontanés, de mort-nés et parfois le diagnostic prénatal à partir duquel une interruption de grossesse peut être émise (Bellsham-Revell and Burch 2018).

Néanmoins, les avancées dans la chirurgie pédiatriques ont permis de voir un nombre augmenté d'enfants atteints de cardiopathies congénitales survivre jusqu'à l'âge adulte, puisqu'en Europe on retrouve une plus grande population d'adultes atteints de CHD (environ 2.3 millions) que de population pédiatrique (environ 1.9 millions). Dans les années 50, près de 90% des nouveaux nés présentant une CHD mouraient pendant l'enfance alors que dans les années 80 leur survie s'est étendue au-delà de 18 ans (Fitzsimmons and Salmon 2018).

D'après la *Fédération Française de Cardiologie*, dans 9 cas sur 10, il est impossible de déterminer les causes des malformations. Dans les cas restants, plusieurs facteurs semblent être mis en cause tels que (Barnett, den Boogaard, and Christoffels 2012; Bellsham-Revell and Burch 2018) :

- Génétique

Plusieurs cardiopathies congénitales sont typiquement liées à une mutation d'un seul gène autosomal dominant. Par exemple le syndrome de Marfan associé à une mutation dans le gène de la fibrilline sur le chromosome 15q, les syndromes de Holt-Oram et Noonan a des lésions au niveau du chromosomes 12q. Il semblerait que près de 400 gènes soient impliqués dans le développement de CHD (Blue et al. 2017) comme les gènes codants pour les facteurs de transcription : Nkx2-5, dont l'absence est létale chez la souris (défaut de *looping* du cœur en formation et de différenciation cardiaque). Chez l'homme cela conduit à des défauts de septation, de compaction, de conduction (Lyons et al. 1995; Tanaka et al. 1999). Tbx5 dont la surexpression peut induire une inhibition de la maturation ventriculaire et dont la sous-expression induit des défauts similaires à l'absence de Nkx2-5 (Bruneau et al. 2001). Encore beaucoup d'autres gènes restent à identifier.

- Épigénétique (Barnett, den Boogaard, and Christoffels 2012)

Des études NGS (*next generation sequencing*) ont permis d'identifier des modifications d'histones associées à des CHD. Le remodelage de la chromatine semble être impliqué dans environ 3% des cas de CHD (Saliba et al. 2019). De plus, certains ARNs non codants (microARNs, lncARNs, circARNs) seraient impliqués dans des cardiopathies congénitales (Chahal, Tyagi, and Ramialison 2019).

- Chromosomale

La plus connue étant la trisomie 21, ou syndrome de Down, provoquée par la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. Elle est associée à 5% des CHD avec une incidence de 1/700 naissances. 40% des personnes présentant ce syndrome ont des CHD, qui dans 40% des cas sont des défauts de la septation atrio-ventriculaire.

- Infection virale (rubéoles),
- Intoxication (alcoolisme, tabagisme, toxicomanie)

L'apparition de ces différents facteurs au cours de premier trimestre de la grossesse, constitue un risque augmenté de CHD chez l'enfant, lequel est majoré lorsqu'un des parents présente également une CHD (Sun et al. 2015). En effet, le risque de récurrence de CHD est de 4-6 %, si les femmes ont une CHD ou histoire familiale de CHD (contre 0.8% dans la population générale). De plus les femmes atteintes de CHD, associée à une mutation d'un seul gène, ont 50% de risque de transmettre une CHD à leurs enfants (Thorne 2018).

3.3.2 Quels facteurs maternels programment des malformations cardiaques et des dysfonctions du cœur ?

De manière générale, une étude regroupant près de 1 387 650 naissances a permis de montrer que lorsque la mère est atteinte de maladies chroniques (incluant le diabète de type 1 et 2, les CHD, l'anémie, l'épilepsie, les maladies liées au tissu conjonctif, etc), l'enfant est exposé à un risque accru de développer des CHD (Chou et al. 2016).

De même, l'obésité maternelle est un paramètre affectant le développement cardiaque dès le 1^{er} trimestre et tout au long de la gestation. Grâce à l'échocardiographie plusieurs paramètres ont pu être identifiés comme étant perturbés par l'obésité maternelle : les dimensions

ventriculaires, la vélocité dans les tissus ventriculaires, le rythme du cycle cardiaque et les flux sanguins. Chez l'Homme, l'obésité maternelle entraîne des problèmes dans la formation et la fonction du cœur en affectant à la fois le ventricule droit et le ventricule gauche au premier trimestre, induisant progressivement un déclin de fonction pendant le 2^{ème} et 3^{ème} trimestre. L'épaississement des parois ventriculaires commencent pendant le 3^{ème} trimestre alors que la fonction diastolique est elle aussi altérée (Ahmed and Delgado-Olguin 2019). Dans les modèles animaux cette obésité maternelle est associée à un élargissement du cœur fœtal avec une augmentation des poids des ventricules gauche et droit, et une augmentation de la taille des parois ventriculaires associée à une hypertrophie des myofibrilles en milieu de gestation (Fan et al. 2011; Kandadi et al. 2013). Ainsi l'obésité maternelle programme chez l'adulte un risque accru de cardiomyopathies hypertrophiques, notamment du ventricule gauche (Ahmed and Delgado-Olguin 2019).

Le diabète maternel est également un paramètre qui peut perturber la formation et la fonction du cœur de la descendance. En effet, les nouveau-nés âgés de 2 jours, issus de mères diabétiques, ont tendance à présenter des concentrations plus élevées de troponine cardiaque que les enfants issus de mères non diabétiques. Ces taux élevés en troponine sont positivement corrélés avec le diamètre diastolique ventriculaire gauche et le diamètre interventriculaire septale. Tous deux sont marqueurs de la dysfonction ventriculaire gauche et de l'hypertrophie cardiomyopathique (Korraa et al. 2012). D'autres études ont également mis en lien des CHD (par exemple l'hypertrophie cardiomyopathique) avec le diabète maternelle (El-Ganzoury et al. 2012) de même que l'hyperglycémie maternelle avec ou sans diabète maternelle (Basu et al. 2017; Helle et al. 2018) . De plus, sur une cohorte de 2060 enfants, il a été déterminé que le diabète gestationnel, la sévérité du diabète et l'IMC avant grossesse sont considérés comme des prédicteurs des malformations congénitales, avec l'IMC comme étant le plus important (García-Patterson et al. 2004).

D'autres paramètres environnementaux semblent être des facteurs de risque de CHD pour l'enfant comme le tabagisme actif (Lee and Lupo 2013), mais aussi le tabagisme passif, le faible niveau d'éducation, la consommation d'alcool (Liu et al. 2018), un niveau socio-économique faible (Yu et al. 2014), l'exposition à certains médicaments (traitement de l'infertilité) (Fung et al. 2013), l'âge maternel (Jay et al. 2016) et le stress gestationnel (Shi et al. 2016). De même, l'exposition à des pesticides non persistants au cours de la grossesse (Inserm 2013), mais également l'exposition à certains composants environnementaux tels que les solvants organiques ou un environnement bruyant (Gong et al. 2017), certaines particules (plomb, cadmium) (Ou et al. 2017), la pollution ou le virus de la grippe (Yuan et al. 2015; Agay-Shay et al. 2013), sont autant de facteurs de risques de CHD.

3.3.3 Rôle de l'insuffisance maternelle en VD sur le risque de CHD chez l'enfant

3.3.3.1 Études cliniques

Encore peu d'études cliniques se sont intéressées à un lien entre le statut en vitamine D maternel et le risque de développer des maladies cardiaques congénitales (telles que l'hypertrophie ventriculaire) chez la descendance.

Néanmoins dans une récente étude de cas témoins regroupant 345 mères d'enfants atteints de CHD et 432 mères d'enfants non atteints, Koster et al. ont mis en évidence que des statuts maternels en vitamine D inférieurs à 50 nmol/L sont associés à un facteur de risque deux fois augmenté de CHD chez l'enfant (Koster et al. 2018). Une seconde étude, bien que de taille réduite (n=50), a également associé de faibles taux maternels en vitamine D, ainsi qu'un polymorphisme du gène VDR, à un risque de CHD pour l'enfant (Mokhtar et al. 2019).

Ces résultats semblent se confirmer dans une 3^{ème} cohorte où le statut maternel en vitamine D est inversement associé au risque de CHD chez l'enfant (Dilli et al. 2018).

L'étude de la programmation maternelle de CHD en lien avec le statut maternel en vitamine D est un champ d'investigation nouveau. Néanmoins quelques études animales permettent de compléter les données issues des études cliniques.

3.3.3.2 Études animales

Dès 1995, une étude menée sur le rat illustre l'importance de la nutrition maternelle périnatale sur le développement d'évènements cardiaques chez la descendance. Les descendants de femelles soumises à un régime supplémenté (3000 IU de vitamine D /kg) ou appauvri en vitamine D (< 200 IU) sont comparés. A 21 jours, les rats issus de mères déficientes présentent un retard du développement cardiaque (Morris et al. 1995). Depuis, la carence maternelle en vitamine D induite par l'alimentation, bien que n'entraînant pas de défauts cardiaques chez la descendance à 3 jours, a été associée à des malformations cardiaques chez la descendance (mâle et femelle) âgée de 4 semaines (comparé à la descendance issue de mères contrôles, non supplémentées soit 1000 UI de VD / kg). Ces malformations consistent en une augmentation de la taille de la paroi ventriculaire gauche s'accompagnant d'une augmentation de la taille et du nombre de cardiomyocytes (Gezmish et al. 2010).

Il semble donc que la carence maternelle en vitamine D a un impact précoce sur le développement cardiaque qui se traduit par des malformations du cœur chez la descendance.

Cependant aucune étude au cours de l'embryogénèse ou à long terme ne permet encore d'expliquer quels sont les mécanismes précoces impliqués et les altérations cardiaques résultantes chez l'adulte.

Objectifs de la thèse

Au cours de cette introduction, nous avons évoqué le rôle clef de la vitamine D dans la mise en place de nombreux mécanismes essentiels au développement de l'organisme et au maintien d'une bonne santé tout au long de la vie. En effet, l'action de ce micronutriment est pléiotropique et les tissus cibles nombreux. D'une part, le lien entre la vitamine D et le tissu adipeux, son principal site de stockage, a été fortement documenté et il apparaît que les cas d'insuffisance en vitamine D sont associés à des phénotypes obèses et des altérations du métabolisme énergétique. D'autre part, la vitamine D participe à la formation du cœur ainsi que la fonction cardiaque et l'insuffisance en vitamine D est associée à des altérations de la morphologie du cœur et de son fonctionnement.

De plus nous avons évoqué l'importance de la nutrition maternelle, au cours de la période périnatale, comme étant elle aussi un élément décisif de la programmation développementale vis-à-vis de certaines pathologies. La prévalence du nombre de femmes enceintes présentant des taux inadéquats en vitamine D étant important dans notre société actuelle, de même que la forte prévalence d'obésité dans la population générale et de cas de CHD chez l'enfant et désormais les adultes, nous avons décidé d'étudier les associations existantes entre la carence maternelle en vitamine D et une potentielle programmation face à des maladies métaboliques telles que l'obésité ou encore des malformations cardiaques congénitales (CHD) chez la descendance.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à l'impact de la carence maternelle sur le devenir métabolique et énergétique de la descendance, précocement (dans les premières semaines de vie) mais également lorsque celle-ci est exposée, ou non, à un contexte d'obésité à l'âge adulte. Nous nous sommes également intéressés à la différence de réponse métabolique en fonction du sexe de la descendance, ce qui n'avait à ce jour jamais été étudiée. (**Article 1**).

En parallèle, nous avons étudié l'impact de cette carence maternelle en vitamine D lors de la formation du cœur embryonnaire ainsi que les mécanismes mis en jeu impliqués dans une programmation à long terme des altérations cardiaques (**Résultat 2**).

Matériels et méthodes

1. Expérimentation animale (Article 1, Résultats 1 & 2)

Des souris mâles et femelles C57BL/6J (Janvier Lab) âgées de 8 semaines ont été nourries *ad libitum* avec un régime contrôle (A04, Safe Diet), pendant une semaine d'acclimation et ont eu accès l'eau. Les animaux ont eu une photopériode contrôlée de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité et ont été maintenus à une température constante de 22°C. Les femelles (15 par groupe) ont aléatoirement été assignées à l'un des deux groupes expérimentaux : contrôle (CTRL, AIN-93G avec de la vitamine D3, 1.0 UI/g) ou déficient en vitamine D (VDD, AIN-93G sans vitamine D3, 0.0 UI/g) pendant 8 semaines, puis ont été mises en accouplement avec les mâles. La masse corporelle a été mesurée une fois par semaine et la prise alimentaire a été mesurée à 3 semaines de régime (pré-accouplement), puis à 5 jours et 15 jours de gestation (**Figure 22**).

Étude de la carence en vitamine D associée à un régime obésogène chez la descendance juvénile et adulte (Article 1 & Résultat 1) : Après la naissance les femelles (10 par groupe) ont toutes été alimentées avec le régime contrôle (AIN-93G) jusqu'au sevrage de la descendance. Toutes les semaines la masse des animaux était mesurée (du sevrage jusqu'à la fin du protocole). Les mâles et femelles de la descendance, âgés de 6 semaines, ont aléatoirement été assignés pour recevoir un régime contrôle (LF, AIN-93M) ou riche en lipides (HF, 45 % d'énergie sous forme lipide) pendant 8 semaines. A la fin du protocole, après avoir été mises à jeun la nuit, le sang des souris a été collecté par ponction cardiaque, après anesthésie. Le sérum a été isolé par centrifugation à 3000 rpm pour 15 min à 4°C et stocké à -80°C. Les animaux ont été euthanasiés par dislocation cervicale et les divers tissus (foie, rate, hypothalamus et dépôts de tissus adipeux blancs) ont été collectés, pesés et stockés à -80°C. Quatre groupes (femelles et males) sont formés : CTRL-LF, VDD-LF, CTRL-HF, VDD-HF

Étude de la carence en vitamine D embryonnaire et de la fonction cardiaque chez l'adulte (Résultat 2) : Quatre femelles de chaque groupe (CTRL et VDD) ont été euthanasiées par dislocation cervicale à un stade de gestation de 16,5 jours (E16.5). Une partie des cœurs (15 par groupe) a été conservée pour les analyses d'histologie et d'immunofluorescence. Les autres cœurs (16 par groupe) ont été disséqués pour conserver les ventricules gauches puis,

ont été congelés à -80°C pour les expérimentations de *ARN-sequencing*, PCR en temps réel et *ChIP-sequencing*. Après la naissance, les femelles des groupes CTRL et VDD ont reçu une alimentation contrôle (A04). Leurs descendants ont été maintenus sous régime contrôle jusqu'à la fin du protocole (6 mois) et ont été utilisés pour des échocardiographies (à 2 mois et 6 mois).

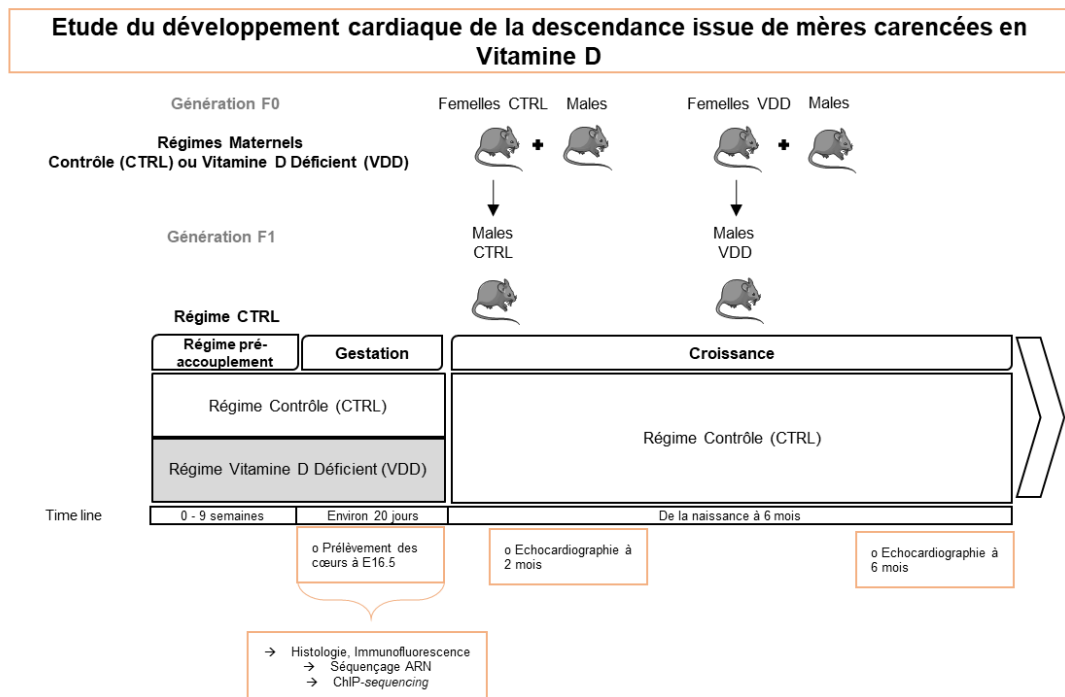
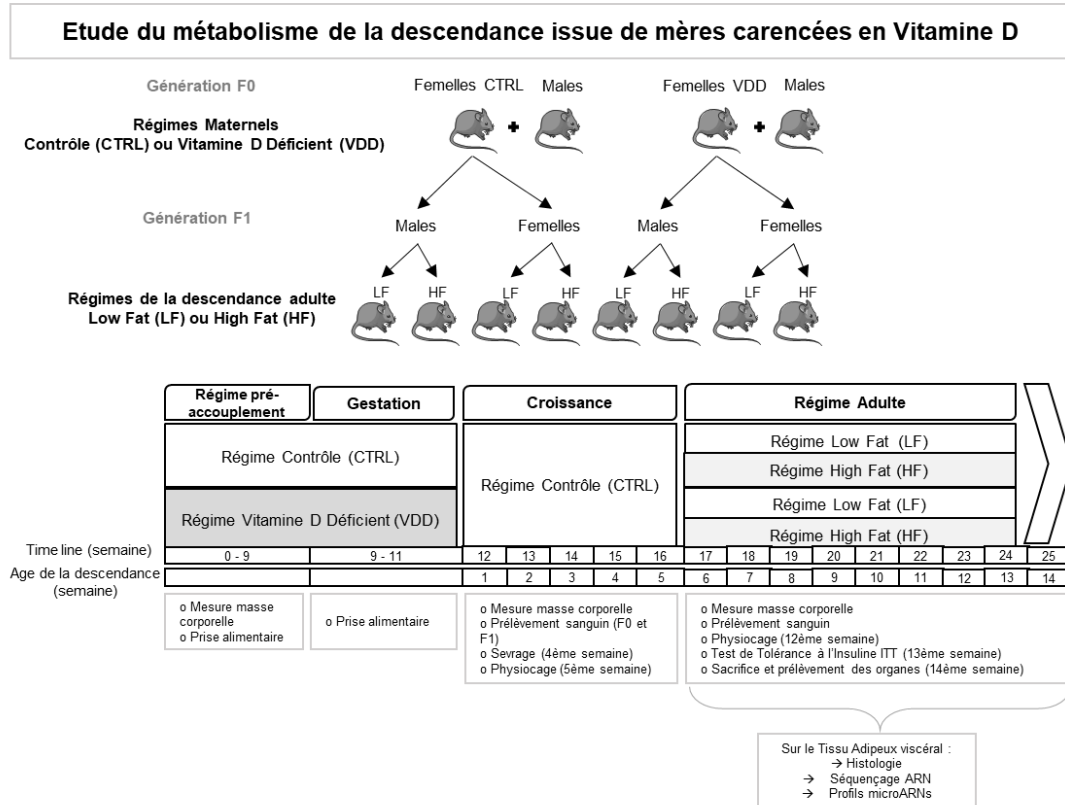


Figure 22 : Schéma récapitulatif des protocoles expérimentaux.

2. Analyses biochimiques (Article 1)

Pour confirmer le statut vitaminique D maternel et de la descendance, les concentrations en 25(OH)D dans le sérum ont été mesurées en utilisant le kit de diagnostic enzymatique *in vitro* 25-OH Vitamin D (direct) ELISA kit (PromoKine). L'insuline et le 17 β -estradiol ont été mesurés dans le plasma en utilisant des kits de dosage immuno-enzymatiques ELISA (ALPCO Diagnostics ; ab 108667, Abcam, respectivement). Les protocoles fournis ont été suivis. Pour les concentrations en glucose, les souris ont été mises à jeun pendant 5 h, puis la glycémie a été mesurée à partir du sang de leur queue (glucomètre Accu-Check). L'index HOMA-IR a été calculé selon la formule : $\text{insuline (microU/L)} \times \text{glucose (nmol/L)} / 22.5$

3. Calorimétrie indirecte (Article 1)

A 5 et 12 semaines la descendance a été mise en acclimatation dans des cages de calorimétrie indirecte pendant 24h (Physiocage). Le dispositif calorimétrique était composé d'un analyseur de gaz (O₂, CO₂, VO₂, VCO₂) et enregistreur d'activité. La température de la salle contenant le dispositif a été maintenue à 22°C. Quatre cages ont été connectées à l'analyseur de gaz. Les gaz ont été analysés en continu avec la séquence suivante : 3 min dans la cage 1, 3 min dans la cage 2, 3 min dans la cage 3, 3 min dans la cage 4, puis 3 min de l'air de la pièce. Ainsi le volume (mL / min) d'O₂ consommés (VO₂) et le CO₂ produit (VCO₂) ont été mesurés pour chaque souris. La dépense énergétique (EE) a été calculée comme suit ($EE = (16.3 \times VO_2 + 4.57 \times VCO_2) / 60$ (watts)). L'oxydation des lipides (LOX) et des glucides (GOX) a été calculée selon les équations suivantes : $LOX = (1,69 \times VO_2 - 1,69 \times VCO_2) (9,46 \times 4,186 / 60)$ (watt) et $GOX = (4,57 \times VCO_2 - 3,23 \times VO_2) (3,74 \times 4,186 / 60)$ (watt). L'activité totale a été évaluée en faisant la somme de l'activité spontanée et de l'activité d'élevage mesurées dans les cages calorimétriques indirectes (Physiocage, Bioseb, Vitrolles, France), puis normalisées à la valeur du contrôle.

4. Test de tolérance à l'insuline (ITT) (Article 1)

Une semaine avant la fin du protocole, les souris ont été soumises à l'ITT. Elles ont été mises à jeun pendant 5 h et gavées avec solution d'insuline (0,05 UI / mL) préparée dans une solution saline (0,5 UI / kg de poids corporel). La glycémie a été mesurée à partir du sang de la queue à 0, 15, 30, 60, 90, 120 minutes après l'injection (glucomètre, Accu-Check).

5. Échocardiographie (Résultat 2)

La fonction cardiaque a été évaluée sur les mâles à 2 mois et 6 mois en utilisant un échographe Affiniti 50G (Philips) équipé d'un transducteur linéaire de 11MHz (L12-4). Les souris ont été anesthésiées par isoflurane 1.5%, puis leur thorax a été rasé. L'échocardiographie a été réalisée en M mode qui permet de mesurer la dimension diastolique du ventricule gauche (LVEDD) et la dimension systolique du ventricule gauche (LVESD). Ainsi le pourcentage de fraction de raccourcissement (FS) a été calculée d'après la formule : $FS = ((LVEDD - LVESD) / LVEDD) \times 100$.

6. Fixation des cœurs et histologie (Résultat 2)

Les cœurs E16.5 (12 pour chaque groupe) ont été fixés avec 4% de paraformaldéhyde toute la nuit à 4°C sous agitation, lavés en PBS 1X, puis déshydratés avec 50%, 90%, 100% d'éthanol (respectivement 3 fois 1 h) et xylène (2 fois 1 h), puis inclus en paraffine (3 bains de 1h à 60°C) dans des moules. Par la suite, chaque cœur a été coupé à 8µm (Microtome, Leica) et coloré en Eosine-Hématoxyline (*Harris Hematoxylin Solution Modified*, Sigma), selon le protocole suivant : 2 min hématoxyline, 30 s solution de différenciation, rinçage H₂O, 2 min éosine, 1 min éthanol 70%, 1 min éthanol 95%, 3 bains de 3 min en xylène. Ensuite, les lames sont montées avec un milieu de montage contenant du xylène (*Eukitt Quick hardening*, Sigma). Les diverses mesures d'épaisseur (ventricules, septum) sont calculées à partir de la moyenne de 3 coupes consécutives pour chaque cœur sous le logiciel ZEN (Zeiss) avec un Axioscan.Z1 (Zen).

7. Fixation des cœurs et Immunofluorescence (Résultat 2)

Les cœurs (3 par groupe) ont été fixés en 4% paraformaldéhyde (4°C toute la nuit), lavés en PBS 1X. Par la suite ils sont lavés dans des bains de sucrose (10% sucrose, puis 20% sucrose, sur la nuit à 4°C) puis fixés en OCT-sucrose (50% OCT, 10% sucrose, 40% PBS). Les échantillons dans leurs moules sont déposés sur la carboglace, le temps d'être fixés, puis stockés à -80°C avant d'être coupés à 8µm, -20°C (Cryostat CM3050S, Leica). Les lames ont ensuite été séchées, puis lavées avec du PBS 1X et rincées pendant 10 min avec du PBS-Triton 0.1%. Les lames ont été bloquées avec 4,5 ml de PBS-Triton 0,1%, 0,1 g de BSA avec le WGA conjugué Alexa Fluor 488 (In vitrogene) et une solution DAPI 1X conformément aux protocoles du fabricant, pendant 20 min. Les lames ont été lavées avec du PBS 1X et montées avec du milieu de montage (*fluoromount mounting medium*, Southern-Biotec). Pour chaque

ventricule gauche nous avons calculé l'aire de 100 cardiomyocytes dans 3 différentes régions du ventricule en utilisant le logiciel ImageJ.

8. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-sequencing)

Le protocole jove précédemment décrit (Jebeniani, Leschik, and Puceat 2016b) est suivi.

ADN-protéine cross-linking : Les ventricules gauches congelés (pour chaque groupe, VDD ou CTRL) ont été rincés au PBS 1X puis suspendu dans 1 mL de tampon de *cross-link* (comme précédemment décrit (Jebeniani, Leschik, and Puceat 2016a)) avec 1% de formaldéhyde. Les échantillons ont été agités à 60 rpm pendant 10 min, puis la réaction a été arrêtée en ajoutant de la glycine (125 mM) pendant 5 min (**Figure 23**).

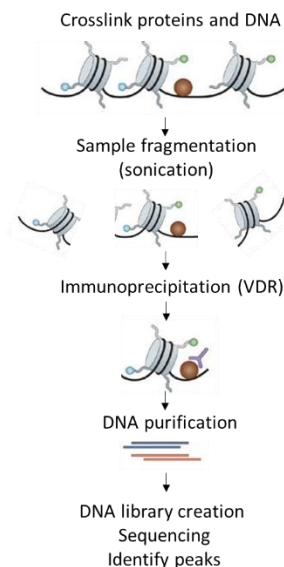


Figure 23 : Schéma d'immunoprécipitation de VDR à partir de la chromatine (ChIP-seq)

Lyse cellulaire et fragmentation de la chromatine : Les échantillons ont été lavés avec du PBS 1X puis centrifugés à 1000 g, à 4°C, pendant 5 min. Des inhibiteurs de protéases ajoutés au tampon de perméabilisation ont permis de re-suspendre les culots. Le tout a été homogénéisé avec une seringue. Après centrifugation, les culots ont été re-suspendus dans un tampon de lyse/sonication contenant des inhibiteurs de protéases. Puis les échantillons ont été fragmentés dans un sonicateur (Misonics 3000) (21 cycles, chaque cycle faisant 30 s *on* / 30 s *off*). Après centrifugation le surnageant qui contenait la chromatine et les protéines a été conservé, et la densité optique évaluée au spectrophotomètre (nanodrop). Cela nous a permis de calculer la concentration en protéines d'après la formule $1.55 \times DO_{280} - 0.76 \times DO_{260}$.

Immunoprécipitation de VDR à partir de la chromatine lavages : En parallèle, on a rincé 3 fois les billes de protéine A (100 μ L) avec le *ChIP buffer* (1 mL). Ensuite, les billes (40 μ L) ont été incubées avec l'anticorps anti-VDR (15 μ L, sc-13133, Santacruz) dans le *ChIP buffer* (300 μ L) pendant 2h à 4°C et agitées à 40 rpm. Puis le complexe formé par les billes de protéine A-anticorps a été rincé 3 fois avec le *ChIP buffer*.

Deux tubes (pour chaque condition, VDD ou CTRL) ont été préparés avec dans un cas, 150 μ g de chromatine avec 150 μ L de complexe billes-anticorps, dans l'autre cas, avec 150 μ g de chromatine et 150 μ L de billes lavées (échantillon nommé INPUT qui est le contrôle interne). Chaque tube a ensuite été incubé avec 1mL de *ChIP buffer* contenant des inhibiteurs de protéases, toute la nuit à 4°C sous agitation 40 rpm.

Élution de l'ADN, *cross-link* inversé, et digestion par la protéinase K : Les échantillons ont été élués avec 150 μ L de solution d'éluion (1% SDS, 100 mM NaHCO₃) pendant 20 min sur un bloc chauffant à 50°C. Puis ils ont été vortexés et mis sur un rack magnétique afin de récupérer les surnageants dans des nouveaux tubes. Aux surnageants ont été ajoutés 200 mM de NaCl toute la nuit à 65°C. Le lendemain, dans chaque échantillon 250 mM d'EDTA ont été rajoutés et 12.5 mM de protéinase K, pour une concentration finale de 250 μ g/mL de matériel de ChIP, pour 2 h à 55°C.

Extraction de l'ADN : La préparation des billes permettant d'extraire l'ADN est décrite dans le protocole (Jebeniani, Leschik, and Puceat 2016a). Chaque échantillon a été re-suspendu dans 2,5 volumes de billes, incubé 10 min à température ambiante, puis placé sur un rack magnétique. Le surnageant a été aspiré et jeté, puis 600 μ L d'éthanol 80% ont été ajoutés. De nouveau le surnageant a été aspiré puis jeté, après une rapide centrifugation les dernières gouttelettes d'éthanol ont été retirées. L'ADN a finalement été élué avec 20 μ L d'eau ARN/ADN *free*. La qualité des ADN a été testée sur puces ADN Chip avec un Bioanalyseur 2100 (Agilent).

Par la suite la création de la librairie, le séquençage et l'analyse du *ChIP-sequencing* à partir des échantillons d'ADN ont été réalisés par des prestataires (Integragen, Evry).

9. Extraction des ARN totaux (Article 1, Résultats 1 & 2)

Pour les tissus adipeux et l'hypothalamus : L'extraction a été réalisée par l'ajout de 1 mL de TRI Reagent (Invitrogen) dans chaque prélèvement de tissu adipeux ou d'hypothalamus. Les échantillons ont été mélangés à 200 µL de chloroforme et centrifugés (12000 g, 15 min, 4°C). La phase supérieure contenant les ARN a été récupérée et mélangée à 500 µL d'isopropanol. Après une centrifugation (12000 g, 30 min, 4°C), le surnageant a été jeté et le culot d'ARN a été lavé avec 1mL d'éthanol 80 %. Les échantillons ont ensuite été centrifugés (10 min, 12000 g, 4°C) et les culots ont été séchés avant d'être repris dans l'eau ARN/ADN *free*. La quantité et la pureté des ARN extraits ont été mesurées par spectrophotométrie (nanodrop).

Pour les ventricules gauches E16.5 : L'extraction a été réalisée à partir des ventricules gauches en utilisant et suivant le protocole du kit ZR RNA Miniprep (Zigmo Research Corp). La quantité et la pureté des ARN extraits ont été mesurées par spectrophotométrie (nanodrop).

10. Transcription inverse (Article 1, Résultats 1 & 2)

Pour les miRs (Résultat 1) : La transcription inverse a été réalisée dans un volume final de 20 µL. 250 ng d'ARN totaux ont été ajoutés à un mélange contenant 4 µL de tampon miscript Hispec Buffer, 2 µL de Nucleics Mix et 2 µL de miScript transcriptase reverse (Qiagen) (qsp H₂O). La synthèse a été réalisée à 37°C pendant 60 min et suivie d'une inactivation pendant 5 min à 95°C. Les ADNc obtenus ont été dilués avec 200 µL d'eau ARN/ADN *free*.

Pour les ARNm (Article 1 & Résultat 2) : Le kit utilisé était le M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Invitrogen). La transcription inverse a été réalisée dans un volume final de 20 µL. 1 µg d'ARN totaux a été ajouté à un mélange contenant 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 ont été dilués cinq fois.

11. PCR quantitative en temps réel (Article 1, Résultats 1 & 2)

Les PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant le *Mx3005P Real-Time PCR Système* (Stratagene)

Pour les miRs (Résultat 1) : Nous avons utilisé le kit *miScript PCR arrays* (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les réactions ont été faites dans un volume de 2750 μ L contenant 1375 μ L de 2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Courtaboeuf, France), 275 μ L de 10X miScript Universal Primer (Qiagen, Courtaboeuf, France), en présence de 100 μ L cDNA (250 ng d'ARN totaux). Après une étape initiale d'incubation de 15 min à 95°C, la réaction d'amplification a été effectuée sur 40 cycles, comprenant 3 étapes (95°C, 15 s ; 55°C, 30 s et 70°C, 30 s). Pour chaque condition, l'expression est quantifiée à partir de 5 répliques biologiques et les SNORD6, RNU6-6P ont été utilisés comme contrôles endogènes dans la méthode comparative des cycles threshold (Ct) (Livak and Schmittgen 2001). La technique de miScript PCR arrays permet de quantifier différents miRs d'intérêt dans une plaque précoâtée (Figure 24).

mmu-miR-142a-5p	mmu-miR-16-5p	mmu-miR-142a-3p	mmu-miR-21a-5p	mmu-miR-124-3p	mmu-miR-126a-3p	mmu-miR-15a-5p	mmu-miR-29b-3p	mmu-miR-9-5p	mmu-let-7c-5p	mmu-miR-24-3p	mmu-miR-27a-3p
mmu-miR-30e-5p	mmu-miR-22-3p	mmu-miR-30a-5p	mmu-let-7a-5p	mmu-miR-30d-5p	mmu-miR-140-5p	mmu-let-7f-5p	mmu-miR-155-5p	mmu-miR-130a-3p	mmu-let-7b-5p	mmu-miR-322-5p	mmu-miR-17-5p
mmu-miR-27b-3p	mmu-miR-125b-5p	mmu-miR-29a-3p	mmu-miR-872-5p	mmu-miR-32-5p	mmu-miR-19b-3p	mmu-miR-191-5p	mmu-miR-126a-5p	mmu-miR-93-5p	mmu-miR-146a-5p	mmu-miR-196b-5p	mmu-let-7i-5p
mmu-miR-20a-5p	mmu-miR-18a-5p	mmu-miR-28c	mmu-miR-23b-3p	mmu-miR-150-5p	mmu-miR-92a-3p	mmu-miR-10a-5p	mmu-let-7d-5p	mmu-miR-196a-5p	mmu-miR-23a-3p	mmu-miR-106b-5p	mmu-miR-34c-5p
mmu-miR-503-5p	mmu-miR-25-3p	mmu-let-7g-5p	mmu-miR-96-5p	mmu-miR-31-5p	mmu-miR-30c-5p	mmu-miR-15b-5p	mmu-miR-10b-5p	mmu-miR-144-3p	mmu-miR-467e-5p	mmu-miR-125a-5p	mmu-miR-99a-5p
mmu-miR-880-3p	mmu-miR-19a-3p	mmu-miR-199a-5p	mmu-miR-488-3p	mmu-miR-182-5p	mmu-miR-291a-3p	mmu-miR-186-5p	mmu-miR-541-5p	mmu-miR-302d-3p	mmu-miR-183-5p	mmu-let-7e-5p	mmu-miR-140-3p
mmu-miR-411-5p	mmu-miR-295-3p	mmu-miR-1a-3p	mmu-miR-214-3p	mmu-miR-138-5p	mmu-miR-425-5p	mmu-miR-218-5p	mmu-miR-335-5p	mmu-miR-101a-3p	mmu-miR-141-3p	mmu-miR-744-5p	mmu-miR-467c-5p
cel-miR-39-3p	cel-miR-39-3p	SNORD6 1	SNORD6 8	SNORD7 2	SNORD95	SNORD9 6A	RNU6-6P	miRTC	miRTC	PPC	PPC

Figure 24 : Plan de plaque des miRs testés

Pour les ARNm (Article 1 & Résultat 2) : L'amplification a été réalisée avec 2,5 μ L d'ADNc dilués dans un volume final de 12,5 μ L contenant 6,25 μ L de SYBR Green (Eurogentec), 0,375 μ L de chacun des deux amorces sens et antisens à 10 pmol/ μ L et 3 μ L d'eau bidistillée. Après 2 min à 50°C puis 10 min à 95°C, la réaction d'amplification s'effectuait en 40 cycles

comprenant 2 étapes : dénaturation de l'ADNc (15 sec à 95°C), hybridation des amorces (1 min à 60°C). Les résultats ont été exprimés par rapport à l'ARN ribosomal 18S.

12. Séquençage ARN (Article 1 & Résultats 2)

Pour le tissu adipeux rétropéritonéale (Article 1) : L'ARN total a été isolé pour 3 souris par groupe.

Pour les ventricule gauche E16.5 (Résultat 2) : L'ARN total a été isolé pour 5 ventricules gauche par groupe et poolé pour chacun des groupes.

Les ARNs ont ensuite été utilisé pour la préparation de la librairie de ARN-seq en utilisant le kit TruSeq Stranded mRNA by Illumina. Les librairies ont été séquencées (en *paired-end*) sur le séquenceur Illumina NextSeq 500 (par le TGML, Marseille). Les lectures (*reads*) avec un score exprimé inférieur à 20 et inférieur à 25 pb ont été supprimées à l'aide de Sickle (v1,33). La qualité des lectures de rognage a été vérifiée à l'aide de multiQC (v1.0). Les *reads* rognés ont été alignés sous STAR (v2.7.0d) avec les arguments «outFilterMismatchNoverLmax» et «outFilterMultimapNmax» définis sur 0.08 et 1, respectivement. La découverte des transcrits a été réalisée par Cufflinks (v2.2.1) avec l'argument «*library-type*» défini sur fr-firststrand, et d'un fichier GTF obtenu de GENCODE («Annotation génique de gène», vM1) fourni en tant qu'annotation génomique. Les fichiers GTF produits pour chaque échantillon par Cufflinks ont été combinés à l'aide de Cuffmerge. Le «*class code*» attribué à chaque transcrit par Cuffmerge a été utilisé pour définir des transcrits inconnus (code de classe «u»). Seuls les transcrits *de novo* avec des comptes supérieurs à 0 dans au moins un échantillon d'ARN-seq ont été conservés pour des analyses ultérieures. Ces transcrits *de novo* ont été combinés au fichier GENCODE GTF pour produire l'annotation génomique finale fournie à FeatureCounts (v1.6.1) pour la quantification.

L'expression génique différentielle a été réalisée à l'aide de DESEQ2 entre les conditions. Pour créer des fichiers bigwig, les *reads* ont été sélectionnés à l'aide de SAMtools (v1.9) et fournis au script bam2wig.py à partir de la suite de programmes RseQC (v2.6.4). Les profils d'ARN-seq ont été visualisés à l'aide du navigateur de génome IGV.

13. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Article 1, Résultats 1 & 2)

L'expression différentiel entre les gènes (avec une p-value ajustée < 0.05) obtenue à partir de l'analyse RNA-seq entre nos diverses conditions, a été utilisée dans le logiciel IPA pour identifier les voies canoniques différentiellement impactées par le régime maternel.

14. Analyses statistiques (Article 1, Résultats 1 & 2)

Les données sont toutes exprimées en moyenne \pm SEM. Les différences significatives ont toutes été déterminées par le test t de Student ou un ANOVA suivi du test post hoc LSD de Fisher. Une p-value < 0.05 a été considérée comme statistiquement significative.

Résultats

ARTICLE 1 : Prenatal maternal vitamin D deficiency sex-dependently programs adipose tissue metabolism and energy homeostasis in offspring

Soumis, 2019

La vitamine D est un micronutriment essentiel dont l'action pléiotropique s'exerce dans divers tissus et est suspectée de jouer un rôle majeur dans plusieurs processus physiologiques, dont le contrôle du métabolisme du tissu adipeux. Ainsi, la déficience en vitamine D, définie pour une valeur seuil de 25-hydroxyvitamine (25(OH)D) < 50nmol/L, est devenu un problème de santé publique mondial, incluant les femmes en âge de procréer, enceintes et allaitant. A l'aide d'un modèle murin, nous avons souhaité évaluer l'impact d'une carence maternelle en vitamine D (VDD), sur le métabolisme et l'homéostasie énergétique de la descendance juvénile (5 semaines). Puis, associée à un contexte nutritionnel normal (LF) et obésogène (HF, riche en lipides à 45% pendant 8 semaines) chez la descendance adulte (12 – 14 semaines). Afin d'étudier les différents paramètres métaboliques nous avons utilisé de la calorimétrie indirecte, à 5 et 12 semaines, nous permettant d'évaluer les données de poids, d'activité spontanée et de dépense énergétique. Nous avons également étudié les paramètres en lien avec l'homéostasie glucidique (glycémie, insulinémie, HOMA-IR, insulino-résistance/sensibilité), et l'adiposité (index d'adiposité et cellularité adipocytaire). Ensuite nous avons proposé d'expliquer ces phénotypes par une approche transcriptomique, menée sur le tissu adipeux viscéral (**Tableau 7**).

Ainsi nous sommes les premiers à mettre en évidence que le poids, l'activité spontanée et la dépense énergétique diffèrent chez la descendance VDD juvénile, de manière sexe-spécifique. A l'âge adulte, la VDD maternelle en contexte LF n'impacte pas la descendance adulte sur les paramètres métaboliques, énergétiques et morphologiques. Cependant, lorsque les animaux VDD (âgés de 12 semaines) sont challengés avec le régime HF, on observe des perturbations de poids associées à des perturbations du métabolisme énergétique de manière sexe-spécifique. De plus, les mâles VDD-HF voient leur homéostasie glucidique et adiposité altérées, contrairement aux femelles. Ces phénotypes sont associés à des modulations des voies canoniques transcriptomiques, mais également à des modulations des concentrations plasmatiques de 17 β -œstradiol. Ainsi la VDD maternelle module le devenir métabolique de la descendance de manière sexe-spécifique notamment dans un contexte obésogène.

Paramètres étudiés	5 semaines	12 semaines	13 semaines	14 semaines
Masse corporelle	VDD < CTRL (M) VDD = CTRL (F)	VDD-LF = CTRL-LF (M et F) VDD-HF < CTRL-HF (M et F)		VDD-LF = CTRL-LF (M et F) VDD-HF = CTRL-HF (M) VDD-HF < CTRL-HF (F)
Prise alimentaire	VDD = CTRL (M et F)	VDD-LF = CTRL-LF (M et F) VDD-HF > CTRL-HF (M et F)		
Activité	VDD > CTRL (M et F)	VDD-LF = CTRL-LF (M et F) VDD-HF = CTRL-HF (M) VDD-HF < CTRL-HF (F)		
Dépense énergétique	VDD > CTRL (M) VDD = CTRL (F)	VDD-LF = CTRL-LF (M et F) VDD-HF > CTRL-HF (M et F)		
Glycémie et insulinémie			VDD-LF = CTRL-LF (M et F, glycémie, insulinémie, HOMA-IR) VDD-HF = CTRL-HF (M, glycémie) VDD-HF > CTRL-HF (M, insulinémie, HOMA-IR) VDD-HF < CTRL-HF (F, glycémie, insulinémie, HOMA-IR)	
Homéostasie glucidique			VDD-LF = CTRL-LF (M et F, insulino-résistant) VDD-HF > CTRL-HF (M, insulino-résistant) VDD-HF < CTRL-HF (F, insulino-résistante)	
Adiposité				VDD-LF = CTRL-LF (M et F) VDD-HF > CTRL-HF (M) VDD-HF < CTRL-HF (F)
Cellularité adipocytaire				VDD-LF = CTRL-LF (M et F) VDD-HF = CTRL-HF (M) VDD-HF < CTRL-HF (F)
17β-oestradiol				LF = HF (M) CTRL-LF = CTRL-HF (F) VDD-LF < CTRL-HF(F)

Tableau 7 : Récapitulatif des principaux résultats de l'article 1 en fonction de l'âge de la descendance.

Abréviations : M : Mâle ; F : Femelle ; CTRL : contrôle ; VDD : déficient en vitamine D ; LF : *low fat* ; HF : *high fat*

Prenatal maternal vitamin D deficiency sex-dependently programs adipose tissue metabolism and energy homeostasis in offspring

Eva M. Seipelt^{1,4}, Franck Tourniaire^{1,2}, Charlène Couturier¹, Julien Astier¹, Béatrice Lloriod³, Hortense Vachon³, Michel Pucéat^{4*}, Lourdes Mounien^{1*}, Jean-François Landrier^{1,2*}

1 Aix-Marseille Université, C2VN, INRA, INSERM, 13000, Marseille, France

2CriBioM, Criblage Biologique Marseille, Faculté de médecine de la Timone, Marseille, France.

3 Aix-Marseille Université, TGML, TAGC, INSERM, 13000 Marseille, France

4 Aix-Marseille Université, MMG, INSERM U1251, Marseille, France.

* joint last authors.

Corresponding author and person to whom reprint requests should be addressed:

Jean-François Landrier, C2VN ; UMR 1260 INRA/1263 INSERM/Université d'Aix-Marseille, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France. Phone: +33 4 91 29 42 75; E-mail: jean-francois.landrier@univ-amu.fr

Keywords: Vitamin D, Maternal vitamin D deficiency, hypovitaminosis D, offspring, perinatal period, adipose tissue, metabolism,

Abstract

In utero environment is crucial to ensure normal development of the foetus and to program metabolic health throughout the life. Beside macronutrients, the role of micronutrients, including vitamin D, begins to be explore. The aim of this study was to decipher the impact of maternal vitamin D deficiency (VDD), in normal and high fat (HF) diet context, on adipose tissue metabolism and energy homeostasis in offspring, considering sex-specific responses. Body weight, energy expenditure and spontaneous activity was differential impacted in juvenile male and female offspring born from VDD mice. In adulthood, a HF diet combined with maternal VDD disrupted glucose homeostasis and adiposity in male offspring but not in females. Such phenotypes were associated to different transcriptomic profiles in adipose tissue, that could be related to differential modulation of plasma 17 β -estradiol concentrations. Thus, maternal VDD sex-dependently modulated metabolic fate of the offspring, especially when associated with HF diet in adulthood.

Introduction

Vitamin D is an essential micronutrient that is suspected to display an important role on normal foetal development, and throughout the life of the child and future adult. Its role in calcium and phosphate metabolism is well-established and it also appears to be involved in many other physiological processes¹, including control of adipose tissue biology²⁻⁹. Consequently, vitamin D insufficiency is considered as a risk factor in several pathologies, including auto-immune diseases, musculoskeletal defects¹⁰, cardiovascular and metabolic diseases. Such insufficiency is characterised by plasma concentration in 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) below the cut-off value of 50nmol/L¹¹. In fact, vitamin D insufficiency has become a large public health issue^{12,13} and is common for women in child bearing age, pregnant and breastfeeding women. Currently, 54% of pregnant women and 75% of new-borns present a 25(OH)D status < 50nmol/L, also 18% of pregnant women and 29% of new-borns present a severe vitamin D deficiency (25(OH)D < 25nmol/L)^{14,15}. It is noteworthy that maternal vitamin D deficiency (VDD) was associated with pregnancy, foetal and neonatal outcomes¹⁵ such as increased risk factor for preeclampsia¹⁶, gestational diabetes mellitus¹⁷, higher risk of small-for-gestational-age, reduced term birth weight, and lower head circumference¹⁸, even if these results are sometimes controverted¹⁹.

Interestingly, recent studies linked maternal vitamin D insufficiency to overweight and increased fat mass in offspring. Indeed, in the INMA cohort, including 2358 pregnant women, maternal VDD was associated with increased risk of overweight in foetal and early postnatal (1-year-old) offspring²⁰. Similarly, in the prospective cohort study Southampton Women's survey (977 pregnant women), maternal VDD was associated with lower fat mass at birth and greater fat mass at 4 and 6 years²¹. These results were confirmed in the prospective cohort Rhea (532 pregnant women), where the maternal 25(OH)D concentrations < 37.7 nmol/L were associated with higher body mass index and central adiposity in the 4 and 6-years-old offspring²². Nevertheless, in a long term follow up (20 years), no association between maternal

vitamin D status and cardio-metabolic risk factors was highlighted²³. Thus, those associations remain controversial.

To gain further insight on the relationship, several preclinical studies have been implemented. Overall, it has been established that maternal VDD as potential programming long-term effect on metabolic health²⁴, nevertheless several important points remain pending, including, sex-specific response to prenatal maternal VDD or influence of the nutritional environment on the establishment of the adult phenotype.

Thus, the aim of the present study is to determine the impact of maternal VDD combined with the impact of obesogenic environment, induced by a high-fat diet, on the sex-specific response during adulthood on energy homeostasis and adipose tissue metabolism.

Material and Methods

Animal Experiments

The protocol received the agreement of Aix-Marseille University Ethics Committee and the French Ministry of Research (APAFIS#1300-2015072112279135). Eight-week-old female and male C57BL/6JRJ mice were obtained from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France), fed ad libitum with control food (chow diet A04 from Safe-diets, Augy France) during the 1-week acclimation period and with full access to drinking water. The animals were maintained at 22°C under a 12-hour light, 12-hour dark cycle and a 20% humidity level. Female mice (15 per group) were randomly assigned into one of the two experimental groups depending on the diet *i.e.* control (AIN-93G with vitamin D3, 1.0 IU/g) or vitamin D-depleted (AIN-93G without vitamin D3, 0.0 IU/g) for eight-weeks (Supplemental Figure 1), and were mated with males. Weight gain was measured once a week and dietary at 3-weeks of pre-mate diet, at 5 days and 15 days of gestational stage (Supplemental Figure 2). After delivery, all females were fed with control diet (AIN-93G) until weaning of the offspring. The body weight of the offspring was evaluated weekly from the weaning until the study end, and not prior weaning to avoid maternal cannibalization and perinatal stress. At six-weeks of age both males and females of the offspring were randomly assigned to receive Low Fat diet (AIN-93M Maintenance Purified Diet) or High Fat diet (DIO Rodent Purified Diet w/45% Energy from Fat) for eight weeks. At the end of the protocol, mice were fasted overnight and blood was collected by cardiac puncture anesthesia, serum was isolated by centrifugation at 3000 rpm for 15 min at 4°C and was stored at -80°C. Animals were euthanized by cervical dislocation and various tissue (liver, spleen, hypothalamus and various white adipose tissue deposits) were collected, weighted and stored at -80°C. Eight groups of offspring mice (males and females) were designed to study the impact of maternal diet (CTRL vs VDD) and adult diet (LF vs HF).

Biochemical analysis

To confirm the maternal and offspring vitamin D status, 25(OH)D serum concentration were measured using an in vitro diagnostic enzyme immunoassay kit 25-OH Vitamin D (direct) ELISA kit (PromoKine). Insulin and 17 β -estradiol were measured in plasma using an enzyme-linked immuno-sorbent assay ELISA (ALPCO Diagnostics, New Hampshire, United States; ab108667, Abcam, Cambridge, England, respectively). The manufacturer's protocols were followed. For glucose concentration, mice were fasted for 5h and glycemia was measured from tail blood (Accu-Check glucometer, Roche). The HOMA-IR index was calculated according to the following formula: fasting insulin (microU/L) x fasting glucose (nmol/L)/22.5.

Indirect calorimetry

At 5 and 12 weeks old the offspring was acclimated and kept for 24h in an indirect calorimetric cage (Physiocage, Bioseb, Vitrolles, France), as previously described⁶. The calorimetric appliance was composed of a gas analyzer (to measure O₂ consumption and CO₂ production as VO₂ and VCO₂) and an activity recorder (locomotion and rearing). The temperature of the calorimetric room was set to 22°C. Four were connected to each gas analyzer, but each cage had specific inlets and outlets. A constant inlet flow (5 cm³/min) was maintained throughout the experiment. Gases were continuously analyzed with the following sequence: 3 min from cage 1, 3 min from cage 2, 3 minutes from cage 3, 3 minutes from cage 4 and then 3 min from room air and thus the volume (mL/min) of O₂ consumed (VO₂) and CO₂ produced (VCO₂) were measured for each mouse. Energy expenditure (EE) was calculated as following (EE= (16.3Í VO₂ + 4.57Í VCO₂)/60 (watt)). Lipid (LOX) and carbohydrate (GOX) oxidation were calculated according to the following equations: LOX = (1.69ÍVO₂ - 1.69Í VCO₂)Í (9.46Í 4.186/60) (watt) and GOX = (4.57Í VCO₂ - 3.23ÍVO₂)Í(3.74Í4.186/60) (watt)²⁵. Total activity was evaluated by summing spontaneous activity and rearing activity, measured in indirect calorimetric cages (Physiocage, Bioseb, Vitrolles, France), and was normalized to the control value.

Insulin Tolerance Test (ITT)

One week before the end of the protocol, mice were subjected to ITT. Mice were fasted for 5h and stuffed with an insulin solution (0.05 UI/mL) prepared in saline (0.5 UI/ kg body weight). Glycemia was measured from tail blood at 0, 15, 30, 60, 90, 120 minutes after injection (Accu-Check glucometer, Roche Diagnostic, Meylan, France).

RNA extraction real time PCR and RNA sequencing

Total RNA was extracted from retroperitoneal adipose tissue or hypothalamus using TRIzol reagent (Thermo Fischer Scientific, Les Ulis, France). For the real time PCR, one µg of total RNA from hypothalamus was used to synthesize cDNAs using random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Thermo Fischer Scientific, Les Ulis, France). Real-time quantitative PCR analyses were performed using the Mx3005P Real-Time PCR System (Stratagene, La Jolla, USA) as previously described²⁶. For each condition, expression was quantified in duplicate, and 18S rRNA was used as the endogenous control in the comparative cycle threshold (CT) method²⁷.

The sequences of the primers used in this study are reported in supplemental data (Supplemental Table 1).

For the RNA sequencing, total RNA was isolated from 3 mice per group and was used for the RNA-seq library preparation, using the kit TruSeq Stranded mRNA by Illumina.

Libraries were paired-end sequenced on the Illumina NextSeq 500 sequencer. Reads with a phred score lower than 20 and shorter than 25 bp were removed using Sickle (v1,33). Quality of trim reads were checked using multiQC (v1.0). Trim reads were aligned using STAR aligner (v2.7.0d) with arguments “outFilterMismatchNoverLmax” and “outFilterMultimapNmax” set to 0.08 and 1, respectively.

Transcripts discovery was performed using Cufflinks (v2.2.1) with the “library-type” argument set to fr-firststrand, and a GTF file obtained from GENCODE (“Comprehensive gene annotation”, vM1) provided as the genomic annotation. The GTF files produced for each sample by Cufflinks were combined using Cuffmerge. The “class code” assigned to each transcript by

Cuffmerge was used to defined unknown transcripts (class code“u”). Only de novo transcripts with counts greater than 0 in at least one RNA-seq sample were kept for subsequent analyses. These de novo transcripts were combined with the GENCODE GTF file to produce the final genomic annotation that was provided to FeatureCounts (v1.6.1) for quantification.

Differential gene expression was performed using DESEQ2 between conditions. To create bigwig files, reads from Watson and Crick strands were selected using SAMtools (v1.9) and provided to the bam2wig.py script from the RseQC program suite (v2.6.4). RNA-seq profiles were visualized using the IGV genome browser.

Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Differential gene expression (with p-value adjusted < 0.05), obtained from the RNA seq analysis between our conditions, were used in the IPA software to identify the canonical pathways differentially impacted by the maternal diet.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Significant differences were determined by unpaired Student's *t* test or by ANOVA followed by the Fisher's LSD post hoc test using GraphPad Prism. $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Maternal vitamin D deficiency affects post-weaning energy metabolism of offspring.

Maternal VDD diet consumption prior and during gestation led to significant smaller post-weaning (5 weeks old) body weight in male mice offspring (Fig.1A), that was nonsignificant in female offspring (Fig.1H). The food consumption remained the same between CTRL and VDD, either for males or females (Fig. 1B, 1I). In VDD males, spontaneous activity, respiratory quotient (RQ) and energy expenditure (EE) were increased (Fig. 1C, D, E) compared with the control group ($p < 0.05$). No difference of lipid oxidation (LOX) was noticed in male (Fig. 1F), but carbohydrate oxidation (GOX) was increased in VDD males (Fig. 1G). For female, despite the increased activity and RQ (Fig. 1J, K) of the VDD group, there was no statistical difference for the EE (Fig. 1L). This was associated with decreased LOX and increased GOX (Fig. 1M, N).

Maternal vitamin D deficiency combined with HF diet affects energy metabolism in adult offspring.

To explore the combined effect of maternal VDD and post-weaning nutrition, mice were submitted to low fat (LF) or high fat (HF) diet, leading thus to 8 groups (CTRL-LF, CTRL-HF, VDD-LF and VDD-HF, for both male and female). Firstly, plasma 25(OH)D concentration was measured in 6 weeks old offspring. Only VDD females presented decreased 25(OH)D values ($108.6\text{nmol/L} \pm 2.852$) compared with the CTRL ($128.9\text{nmol/L} \pm 6.186$; $p < 0.01$) (Fig. 2A, B). During the diet period (from week 6 to 12), no statistical difference between CTRL-LF and VDD-LF males body weight was observed (except at 9 weeks old, $p < 0.05$; Fig. 2C). Under HF diet, the body weight of CTRL males was gradually higher than VDD males (significant from week 9 to 12; Fig. 2C). Concerning females, there was nonsignificant differences between CTRL-LF and VDD-LF (from week 6 to 12). Under HF diet, the CTRL females showed increased body weight compared with the VDD (significant from week 9 to 12; Fig. 2D).

The energy metabolism was explored by indirect calorimetry (performed at 12-weeks of age). No modification of the energy metabolism of VDD offspring (*i.e.* body weight, activity, RQ, EE, LOX and GOX) was observed compared with the CTRL offspring when exposed to LF diet in adulthood, either for male and female (Supplemental Figure 3). Under HF diet, energy metabolism of VDD offspring was disturbed when compared with CTRL (Fig. 2). Males exposed to VDD associated-HF diet displayed a smaller body weight than CTRL-HF ($p < 0.05$) and increased food consumption, EE and GOX ($p < 0.05$) (Fig. 2E, F, I, J). No modification of activity, RQ and LOX was observed in males. Female exposed to VDD-HF diets also exhibited smaller body weight than CTRL-HF (Fig. 2L). The food intake tended to be increased (nonsignificant) in the VDD-HF compared with the CTRL-HF, whereas the activity decreased and EE and GOX increased ($p < 0.05$) (Fig. 2M, N, P, R). No modification of RQ and LOX was observed in females.

In order to explain the disruption of feeding behaviour in VDD group, we investigated the expression of the genes of hypothalamic melanocortin pathway known to be involved in the regulation of food intake²⁸. For males, exposed to LF diet in adulthood, agouti related-peptide (AGRP) and melanocortin receptor type 4 (MC4R) were under-expressed in the VDD compare to the CTRL (Supplemental Figure 4A). No statistical differences were observed in HF condition (Supplemental Figure 4B). For females in VDD and CTRL-LF there was not statistical difference (Supplemental Figure 4C). Under HF diet, Neuropeptide Y (NPY) and AGRP were overexpressed ($p < 0.05$) and MC4R under-expressed in VDD-HF compare to CTRL HF (Supplemental Figure 4D). There is no difference in POMC expression between the different groups (Supplemental Figure 4A-D).

In order to explain energy metabolism sex discrepancies, the 17β -estradiol plasma concentrations were evaluated in all groups (Table 1). No significant modification was observed in male groups (CTRL-LF, CTRL-HF, VDD-LF, VDD-HF). In females, no difference was observed in CTRL condition, whereas in VDD condition, 17β -estradiol was strongly increased under HF diet (Table 1).

Maternal VDD and HF diet-associated affect glucose homeostasis sex-specifically

Biochemical analysis of male offspring highlighted that the glycemia tended to be higher in both CTRL-HF and VDD-HF groups when compared with LF groups (performed at 13 weeks; Fig. 3A). Similar pattern was observed for plasma insulin, with an increased concentration for the VDD-HF compared with the CTRL-HF ($p < 0.05$) (Fig. 3B). Thus, the VDD-HF males presented the higher values of plasma insulin, glycemia and HOMA-IR when compared with CTRL-HF, and to CTRL-LF and VDD-LF males (Fig. 3C, D).

When challenged with an HF diet, the glycemia of the VDD female tended to be decreased (nonsignificant) compared with the CTRL-HF group to reach the same values as LF groups (Fig. 3G), and plasma insulin of VDD female (VDD-HF) decreased compared with the control group (CTRL-HF) ($p < 0.05$) to reach the same values as LF groups (both CTRL-LF and VDD-HF) (Fig. 3H). The CTRL-HF females displayed higher values than the other three groups regarding of combined plasma insulin, glycemia and HOMA-IR (Fig. 3I, J).

Insulin tolerance tests were undertaken in CTRL and VDD offspring (performed at 13 weeks). No statistically differences were observed between LF groups, for both male and female (Fig. 3E, 3K). In obesogenic condition, the area under the curve (AUC) of VDD-HF was increased compared with the CTRL HF group of males ($p < 0.01$) (Fig. 3F) and the AUC of VDD-HF was decreased compared with the CTRL of females ($p < 0.05$) (Fig. 3L).

Maternal VDD and HF diet-associated modify morphological parameters and adipose tissue cellularity in sex-specific manner.

After euthanasia, CTRL-LF and VDD-LF males showed similar body weight and weight gain; similarly, to CTRL-HF and VDD-HF (Table 1). Significant differences were observed between LF (both CTRL and VDD) and HF groups (both CTRL and VDD). Compare to the three other groups, VDD-HF males presented the highest fat pad weight (*i.e.* perigonadal, retroperitoneal, inguinal fat pad; Table 1), leading to increased adiposity index (Fig. 4A). HF diet in CTRL females increased body weight, weight gain (between weaning and the end of the protocol), fat pad weight and adiposity index, whereas VDD-HF displayed similar parameters than LF

groups (both CTRL-LF and VDD-LF). HF diet (both CTRL and VDD) increased liver weight in male compare to the LF (both CTRL and VDD). For females, only CTRL-HF increased liver weight compared with other groups. No statistical difference of spleen's weight of males, but the females exposed to HF diet showed increased spleen weight compare to the LF (Table 1). The mean adipocyte area of CTRL and VDD males under LF diet were reduced compared with the adipocytes area of males under HF diet (both CTRL and VDD; Fig. 4A, C and E). The mean adipocyte area increased in CTRL-HF females, but was not different in VDD-HF females, compared with LF groups (both CTRL-LF and VDD-LF; Fig. 4B, D and F).

Maternal and adult offspring diet modulate the expression of mRNA and associated canonical pathways in adipose tissue.

To identify the impacts of maternal (CTRL, VDD) and adult diets (LF, HF) on the offspring transcriptome, we performed RNA sequencing on visceral adipose tissue. Two set of data were used to characterize the impact of the maternal diet and the adult diet. The first one to study the impact of the HF diet on the same condition of maternal diet (*i.e.* CTRL-LF vs CTRL-HF and VDD-LF vs VDD-HF). The second one to study maternal VDD on the same condition of adult diet (*i.e.* CTRL-LF vs VDD-LF and CTRL-HF vs VDD-HF). We highlighted the differential expression of transcripts between our conditions as established in the Supplemental Table 2. Using Ingenuity pathway analysis, we put forward canonical pathways with determinant z-score and non-similar between conditions. We highlighted 16 differentially expressed canonical pathways between CTRL-LF and CTRL-HF males. Interestingly, the triacylglycerol biosynthesis, mitochondrial L-carnitine Shuttle Pathway, and fatty acid beta oxidation were differentially decreased. 19 pathways were differentially regulated between the VDD-LF and the VDD-HF males; including the oxidative phosphorylation. Also, 6 pathways seemed to be common between the offspring exposed to maternal CTRL diet or VDD diet (Fig. 5).

When comparing CTRL-LF and VDD-LF males, 1 canonical pathway was expressed, while 3 pathways were expressed between CTRL-HF and VDD-HF males.

For the female born from CTRL mice, 31 canonical pathways were differentially expressed between LF and HF, including the fatty acid beta oxidation, the oxidative phosphorylation and triacylglycerol biosynthesis which seemed to be highly impacted (Fig. 6). No pathway was regulated when comparing VDD-LF to VDD-HF. Thus, when studying the impact of LF diet between CTRL and VDD females, 3 canonical pathways were differentially expressed, while 27 were differentially expressed for females on HF diet, including oxidative phosphorylation, fatty acid beta oxidation, mitochondrial L-carnitine Shuttle pathway. One pathway was common between LF and HF diets.

Discussion

The maternal diet is now well-established as a key player in the foetal development and long-term effects programming in the offspring. In this study, we highlighted the impacts of maternal VDD on offspring metabolism in normal nutritional condition and under HF challenge. We also explored the sexual dimorphism of the metabolic response.

In agreement with previously published data, we reported here that maternal VDD diet differentially affected the energy homeostasis and the body weight of the juvenile offspring (5 weeks old). Indeed, the maternal VDD was associated with reduction of body weight of the male mice offspring in our experiment, similarly to previous reports in 15 days old mice²⁴ or at weaning²⁹. Other studies reported that VDD male offspring displayed higher body weight³⁰ or not differences³¹⁻³³, but it is noteworthy that body weight evaluation have been evaluated in adult rats^{30,31} or mice^{32,33}, not in juvenile. Interestingly, in our experiment, no discrepancy in body weight was observed in female, demonstrating thus a strong metabolic sex-specific response which has never been highlighted so far.

Such body weight modifications are strongly related to energy metabolism as highlight by indirect calorimetry. Indeed, the increased spontaneous activity and energy expenditure (through the carbohydrate oxidation) of the VDD males, together with the absence food intake difference, could explain the smaller body weight of juvenile VDD males. The lack of body weight impact in female may result from the absence of food intake modification in VDD female. The observed increase in VDD female spontaneous activity could explain the increase in carbohydrate oxidation, which was associated to a decrease in lipid oxidation, resulting in overall no modification of energy expenditure. Interestingly, we observed that both male and female VDD of the offspring were characterized by an increase in spontaneous activity. Similar observations have already been reported in males VDD mice³⁴, and it has been reported that in human, VDD during pregnancy is strongly correlated with the risk of attention deficit and hyperactivity disorder in children³⁵. Nevertheless, in juvenile offspring of VDD rats³⁶, no modification of locomotor activity was observed. The origin of this phenotype is presently not

well understood. Neurobehavioral development could explain this phenotype³⁷, but this assumption will require further investigations.

In adulthood (14-weeks-old), morphological parameters including body weight, fat pad weight, liver weight, adipocyte area and energy balance were not modified in male and female offspring of VDD or CTRL mice when exposed to a control diet (VDD-LF and CTRL-LF), in agreement with previous reports³³. All altered parameters in juvenile mice were normalized in adulthood, including reduced body weight and energy expenditure, and increased spontaneous activity, for both CTRL and VDD offspring. In offspring of VDD rats, similar results were reported in adulthood, *i.e.* no effect on food intake, spontaneous activity in 14 weeks old male rats³⁰. Nevertheless, this study also reported differences on body weight and others biological parameters (total cholesterol, triglycerides, HDL, blood glucose, that were higher in VDD compared with CTRL offspring)³⁰. The origin of these contradictory observations is not clear but could be due to different compositions of control diets used, that could be sufficient to unveil the metabolic phenotype associated to maternal VDD in offspring. In agreement with this assumption, we highlighted that challenged offspring with an HF diets (45% of energy from lipids from 9 to 12 weeks of age) led to a smaller body weight of VDD offspring compared with the CTRL offspring for both males and females. Such observation is not fully consistent with previous reports²⁹, but could be related to the genetic background of the mice which differ between studies. Nevertheless, our results in males are consistent with the fact that the increased energy expenditure (mainly due to the carbohydrate oxidation), could exceed the increased food intake, leading to smaller body weight of the VDD-HF males compared with CTRL-HF males.

Female from VDD-HF diets also presented smaller body weight under HF, compared with LF diet, with a tend to food intake increase. This limitation of body weight might be related to the increase of energy expenditure (through the carbohydrate oxidation). An important issue that remain presently unsolved is the drastic decrease of spontaneous activity in VDD-HF female compared with CTRL-HF.

An interesting observation was that in VDD group the level of expression of the hypothalamic melanocortin pathway genes, *i.e.* NPY, AgRP and MC4R, is different of the CTRL mice level, and could explain at least in part food intake modulations. This suggest that VD is important for the accurate development of the melanocortin pathway. In accordance with this hypothesis, VD is known to be important for the brain development³⁸. However, further investigations are needed to understand the impact of VD on the development of neural pathways involved in feeding behaviour.

Beside body weight and energy metabolism, the glucose homeostasis was also investigated in offspring adulthood. In LF condition, both in males and females, no modification of glucose homeostasis was observed, especially glycemia, consistently with other studies^{24,30-32}. Nevertheless, several studies reported that VDD in male rats led to an increase of fasting insulin, HOMA-IR levels and insulin tolerance at 16 weeks³¹, and in VDD male mice to an increase of insulinemia³². Such differences could be related to the model used (mice vs rats³¹) or duration of the protocol (14 weeks vs 6 months³²). Interestingly, in males submitted to HF diet, we observed higher insulin plasma level, glycemia, HOMA IR and insulin resistance, as previously reported in control conditions^{24,30-32}. Surprisingly, in females, no perturbation of the glucose homeostasis was observed. At the opposite, VDD-HF females displayed similar values as CTRL-LF or VDD-LF for several parameters, including insulinemia, glycemia and HOMA-IR. Such observation has never been reported yet, since most of the studies included only males.

Since insulin resistance is strongly linked to adiposity³⁹, we investigated adiposity index of animals and adipose tissue cellularity. Interestingly, adiposity index was not impacted in males by the VDD in LF condition but was strongly induced by the combination of VDD and HF, similarly to Belenchia et al.²⁹ and appeared to be strongly correlated with insulin resistance. No additive effect was reported for adipose cellularity. In females, under LF diet, no modification was observed for adiposity index and adipocytes area. As expected, the adiposity index and cellularity were induced by HF diet in offspring of CTRL mice (CTRL-HF), but surprisingly, VDD-HF group displayed similar adiposity index and adipocyte area compared

with LF groups (both CTRL-LF and VDD-LF). Such observation is fully consistent with the improvement of insulin sensitivity observed in the VDD-HF group. Nevertheless, such effect has never been reported yet and could correspond to an adaptive mechanism based on an adequate diet supply of macronutrients and micronutrients, that appears to be highly sex-specific.

To investigate the origin of such adiposity discrepancies, RNA-seq experiments were undertaken on retroperitoneal adipose tissue. We hypothesized that differential transcriptomes could explain the variation of adiposity between groups. In agreement, when comparing male offspring from control mice exposed to LF or HF diet in adulthood (*i.e.* CTRL-LF vs CTRL-HF), we observed that the “mitochondrial L-carnitine shuttle pathway” and the “fatty acid beta oxidation” were upregulated in the CTRL-HF, which was associated to a limited increase of adiposity. At the opposite for males from VDD mice submitted to LF or HF (*i.e.* VDD-LF vs VDD-HF), those canonical pathways related to lipid catabolism were not regulated, which correlated with fat pad accretion, weight gain and a higher adiposity index. Thus, the discrepancy between offspring of CTRL or VDD mice could be related to the ability to induce lipid oxidation in adipose tissue. In addition, the transcriptomic response to maternal diet combined to adulthood diet (*i.e.* CTRL-LF vs VDD-LF and CTRL-HF vs VDD-HF) did not result in major differences in terms of metabolic pathways, which is consistent with the lack of difference in adiposity and which reinforces the putative role of lipid metabolism variations to drive adiposity phenotype. It is noteworthy that the contribution of white adipose tissue to whole body energy expenditure is considered relatively small. Nevertheless, there are examples of nutritional and pharmacological interventions in animals resulting in obesity resistance associated with increased oxidative capacity in WAT^{40–42}.

Concerning females, CTRL-HF compared with CTRL-LF induced several canonical pathways linked to lipid metabolism (*i.e.* fatty acid, beta oxidation, oxidative phosphorylation, triacylglycerol biosynthesis, mitochondrial L-carnitine shuttle pathway). Similarly to males, such pattern corresponded to a signature of body weight gain and adiposity. Importantly, when comparing VDD-HF to VDD-LF, we did not observe any modification of metabolic canonical

pathways, nor modification of adiposity. Altogether these observations suggested that adiposity is strongly associated to lipid metabolism pathway that may influence adipose tissue accretion. In addition, it is important to note that the adiposity and gene expression profile are strongly sex-specific, and notably the effect of VDD maternal under HF diet which leads to highly divergent adiposity in males and females.

Sex-specific metabolic discrepancies and notably adiposity are strongly related to estradiol status⁴³. Indeed, it is well-established that estrogens promotes subcutaneous fat accumulation⁴⁴ and improve glucose homeostasis⁴⁵. Consequently, the decrease of estrogens associated to menopause is linked to an increase in visceral fat and greater risk for the metabolic syndrome in postmenopausal compared with premenopausal women⁴³. Thus, we focussed on 17 β -estradiol plasma level to explain observed phenotypes. Interestingly, we noticed that in males, no significant differences of plasma concentrations were observed, suggesting that estradiol by itself is not a driver element. It is important to keep in mind that estradiol plasma level is not the sole element that impact adipose tissue biology, and estrogen receptors are also important⁴³ and would deserve attention in further experiments. Nevertheless, in females, when comparing CTRL-LF to CTRL-HF, 17 β -estradiol plasma level tended to increase but did not reach statistical significance, whereas in VDD mice (VDD-LF vs VDD-HF), the plasma level of 17 β -estradiol was strongly and significantly induced. This is an important point since 17 β -estradiol is well-known to induce metabolic catabolism, leading to weight gain limitation and glucose homeostasis improvement^{43,45}, and such increase of 17 β -estradiol could explain by itself the metabolic improvement observed in VDD-HF female mice. The origin of the induction of 17 β -estradiol is presently unknown but will require further investigations.

To conclude, our study brings new informations on the impact of VDD in metabolic disruption in offspring and notably its predisposition to long term metabolic health complications. Importantly it sheds light on the sex-specific adipose tissue / adiposity response, that need to be taking into account in terms of public health.

Acknowledgments

Funding. The work has been funded by grants from INRA, INSERM, AMU and the Fondation de France.

Conflict of interest. No conflict of interest as to be disclose.

Figures legends

Fig 1. Indirect calorimetry on juvenile offspring during 24hours to compare the energetic metabolism of the VDD and the CTRL. Parameters measured during 24 h for males and females were Body weight (A, H), Food intake (B, I), spontaneous activity (C, J), Respiratory quotient (RQ, D, K), Energy expenditure (EE, E, L), Lipid oxidation (LOX, F, M) and carbohydrate oxidation (GOX, G, N).

Fig 2. Morpho-metabolic follow-up of juvenile and 12 weeks-old offspring. (A, B) 25OH(D) concentration of 5-weeks-old offspring male (A) and female (B) before the adult diet induced (Low fat LF or HF, High fat diet). Growing curves of males (C) and females (D) from the beginning of hf diet to indirect calorimetry at 12-weeks-old. Indirect calorimetry of adults (E-R) offspring during 24hours to compare the energetic metabolism of the VDD and the CTRL on HF diet. Parameters measured during 24 h for males and females were Body weight (E, L), Food intake (F, M), activity (G, N), Respiratory quotient (RQ, H, O), Energy expenditure (EE, I,P), Lipid oxidation (LOX, J, Q) and carbohydrate oxidation (GOX, K, R).

Fig 3. Insulin- carbohydrate balance of 13-weeks old offspring. Measured of glucose from tail blood of males (A) and females (G). Insulinemia of male (B) and females (H), Ratio glucose/insulin for males (C) and females (F), HOMA-IR for males (D) and females (J). Insulin tolerance test for males on LF diet (E) and HF diet (F), also for females on LF diet (K), and HF diet (L). Values are presented as mean \pm SEM. Bars not sharing the same letter were significantly different in Fisher's LSD post hoc test $p < 0.05$.

Fig 4. Adipocyte expenditure from viscera adipose tissue of males (A) and females (B) adult offspring. With Eosin-Hematoxylin coloration of receptively males and female adipocytes from the 4 different groups: CTRL-LF (C, G), VDD-LF (D, H), CTRL-HF (E, I), VDD-HF (F, J). Values are presented as mean \pm SEM. Bars not sharing the same letter were significantly different in Fisher's LSD post hoc test $p < 0.05$.

Fig 5. Overview of canonical pathway differentially expressed on visceral adipose tissue of the male offspring.

Fig 6. Overview of canonical pathway differentially expressed on visceral adipose tissue of the female offspring.

References

1. Bendik, I., Friedel, A., Roos, F. F., Weber, P. & Eggersdorfer, M. Vitamin D: A critical and essential micronutrient for human health. *Front. Physiol.* **5 JUL**, 1–14 (2014).
2. Bonnet, L. *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* **159**, 957–966 (2018).
3. Karkeni, E. *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* **13**, 156–162 (2018).
4. Karkeni, E. *et al.* Vitamin D Limits Chemokine Expression in Adipocytes and Macrophage Migration In Vitro and in Male Mice. *Endocrinology* **156**, 1782–1793 (2015).
5. Marcotorchino, J. *et al.* Vitamin D reduces the inflammatory response and restores glucose uptake in adipocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 1771–1782 (2012).
6. Marcotorchino, J. *et al.* Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 1077–1083 (2014).
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.* **25**, 1–9 (2015).
8. Bonnet, L. *et al.* Diet induced obesity modifies vitamin D metabolism and adipose tissue storage in mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **185**, 39–46 (2019).
9. Landrier, J., Mounien, L. & Tourniaire, F. Obesity and Vitamin D Metabolism Modifications. *J. Bone Miner. Res.* **00**, jbmr.3739 (2019).
10. Borg, S. A. *et al.* Early life Vitamin D depletion alters the postnatal response to skeletal loading in growing and mature bone. *PLoS One* **13**, 1–17 (2018).
11. Turck, D. *et al.* Dietary reference values for vitamin D. *EFSA J.* **14**, e04547 (2016).
12. Palacios, C. & Gonzalez, L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **144 Pt A**, 138–45 (2014).
13. Cashman, K. D. *et al.* Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *Am. J. Clin. Nutr.* 1–12 (2016). doi:10.3945/ajcn.115.120873.
14. Saraf, R., Morton, S. M. B., Camargo, C. A. & Grant, C. C. Global summary of maternal and newborn vitamin D status - a systematic review. *Matern. Child Nutr.* **12**, 647–668 (2016).
15. Miliku, K. *et al.* Maternal Vitamin D concentrations during pregnancy, fetal growth patterns, and risks of adverse birth outcomes. *Am. J. Clin. Nutr.* **103**, 1514–1522 (2016).
16. Achkar, M. Vitamin D status in early pregnancy and risk of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **212**, 1–14 (2016).
17. Amraei, M. *et al.* Effects of vitamin D deficiency on incidence risk of gestational diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**, 1–11 (2018).
18. Gernand, A. D., Simhan, H. N., Klebanoff, M. A. & Bodnar, L. M. Maternal serum 25-hydroxyvitamin D and measures of newborn and placental weight in a U.S. multicenter cohort study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 398–404 (2013).
19. Wang, H., Xiao, Y., Zhang, L. & Gao, Q. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology Maternal early pregnancy vitamin D status in relation to low birth weight and small-for-gestational-age offspring. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 0–1 (2017).

doi:10.1016/j.jsbmb.2017.09.010

20. Morales, E. *et al.* Deficit of vitamin D in pregnancy and growth and overweight in the offspring. *Int. J. Obes.* **39**, 61–68 (2015).
21. Crozier, S. R., Harvey, N. C., Inskip, H. M. & Godfrey, K. M. Maternal vitamin D status in pregnancy is associated with adiposity in the offspring : prospective observational study. *Am. J. Clin. Nutr.* **96**, 57–63 (2012).
22. Daraki, V. *et al.* Low maternal vitamin D status in pregnancy increases the risk of childhood obesity. *Pediatr. Obes.* **13**, 467–475 (2018).
23. Rytter, D. *et al.* Maternal Vitamin D status at week 30 of gestation and offspring cardio-metabolic health at 20 years: A prospective cohort study over two decades. *PLoS One* **11**, 1–12 (2016).
24. Reichetzedler, C. *et al.* Maternal Vitamin D Deficiency and Fetal Programming - Lessons Learned from Humans and Mice. *Kidney Blood Press. Res.* **39**, 315–329 (2014).
25. Even, P. C., Mokhtarian, A. & Pele, A. Practical aspects of indirect calorimetry in laboratory animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **18**, 435–447 (1994).
26. Fenni, S. *et al.* Lycopene and tomato powder supplementation similarly inhibit high-fat diet induced obesity, inflammatory response, and associated metabolic disorders. *Mol. Nutr. Food Res.* **61**, 1601083 (2017).
27. 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* **25**, 402–408 (2001).
28. Derghal, A., Djelloul, M., Trouslard, J. & Mounien, L. The Role of MicroRNA in the Modulation of the Melanocortinergic System. *Front. Neurosci.* **11**, 1–8 (2017).
29. Belenchia, A. M., Johnson, S. A., Ellersieck, M. R., Rosenfeld, C. S. & Peterson, C. A. In utero vitamin D deficiency predisposes offspring to long-term adverse adipose tissue effects. *J. Endocrinol.* **234**, 301–313 (2017).
30. Wen, J. *et al.* The effect of maternal vitamin D deficiency during pregnancy on body fat and adipogenesis in rat offspring. *Sci. Rep.* **8**, 365 (2018).
31. Zhang, H. *et al.* Maternal vitamin d deficiency during pregnancy results in insulin resistance in rat offspring, which is associated with inflammation and Ikb α methylation. *Diabetologia* **57**, 2165–2172 (2014).
32. Nascimento, F. A. M., Ceciliano, T. C., Aguila, M. B. & Mandarim-de-lacerda, C. A. Transgenerational Effects on the Liver and Pancreas Resulting from Maternal Vitamin D Restriction in Mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **59**, 367–374 (2013).
33. Belenchia, A. M. *et al.* Maternal vitamin D deficiency during pregnancy affects expression of adipogenic-regulating genes peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and vitamin D receptor (VDR) in lean male mice offspring. *Eur. J. Nutr.* **57**, 723–730 (2018).
34. Fu, L. *et al.* Vitamin D deficiency impairs neurobehavioral development in male mice. *Physiol. Behav.* **179**, 333–339 (2017).
35. Morales, E. *et al.* Vitamin D in Pregnancy and Attention Deficit Hyperactivity Disorder-like Symptoms in Childhood. *Epidemiology* **26**, 458–465 (2015).
36. Pan, P. *et al.* The effects of vitamin D3 during pregnancy and lactation on offspring physiology and behavior in Sprague-Dawley rats. *Dev. Psychobiol.* **56**, 12–22 (2014).
37. Hawes, J. E. *et al.* Maternal vitamin D deficiency alters fetal brain development in the BALB/c mouse. *Behav. Brain Res.* **286**, 192–200 (2015).
38. Eyles, D. & McGrath, J. Vitamin D Brain Development and Function. in *Vitamin D* **1**, 563–581

- (Elsevier, 2018).
39. Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* **444**, 847–853 (2006).
 40. Kusminski, C. M. & Scherer, P. E. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 435–443 (2012).
 41. Tourniaire, F. *et al.* All- trans retinoic acid induces oxidative phosphorylation and mitochondria biogenesis in adipocytes. *J. Lipid Res.* **56**, 1100–1109 (2015).
 42. Flachs, P., Rossmeisl, M., Kuda, O. & Kopecky, J. Stimulation of mitochondrial oxidative capacity in white fat independent of UCP1: A key to lean phenotype. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1831**, 986–1003 (2013).
 43. Brown, L. & Clegg, D. Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **122**, 65–73 (2010).
 44. Krotkiewski, M., Bjorntorp, P., Sjostrom, L. & Smith, U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J. Clin. Invest.* **72**, 1150–1162 (1983).
 45. Riant, E. *et al.* Estrogens Protect against High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Glucose Intolerance in Mice. *Endocrinology* **150**, 2109–2117 (2009).

Fig. 1

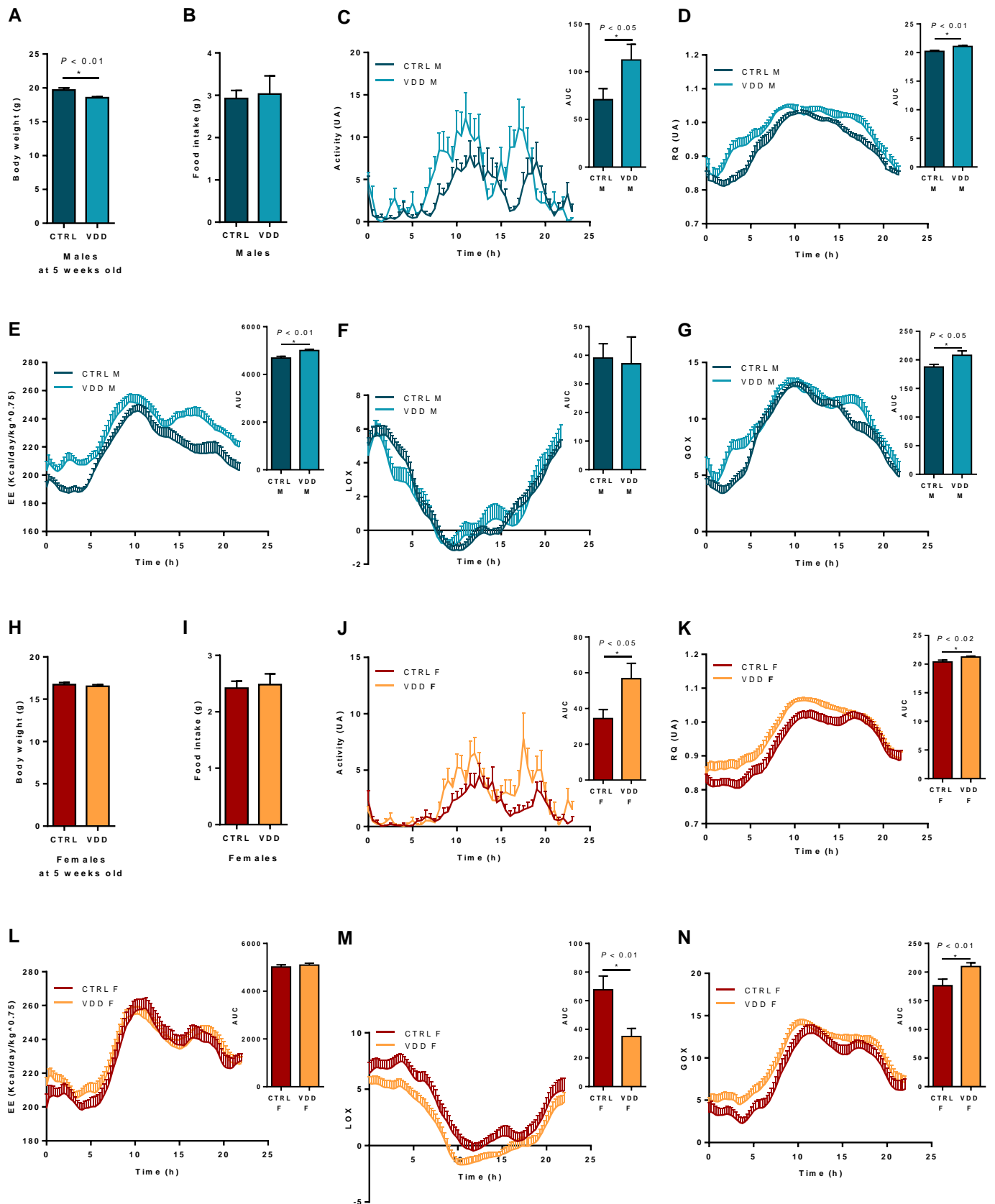


Fig. 2

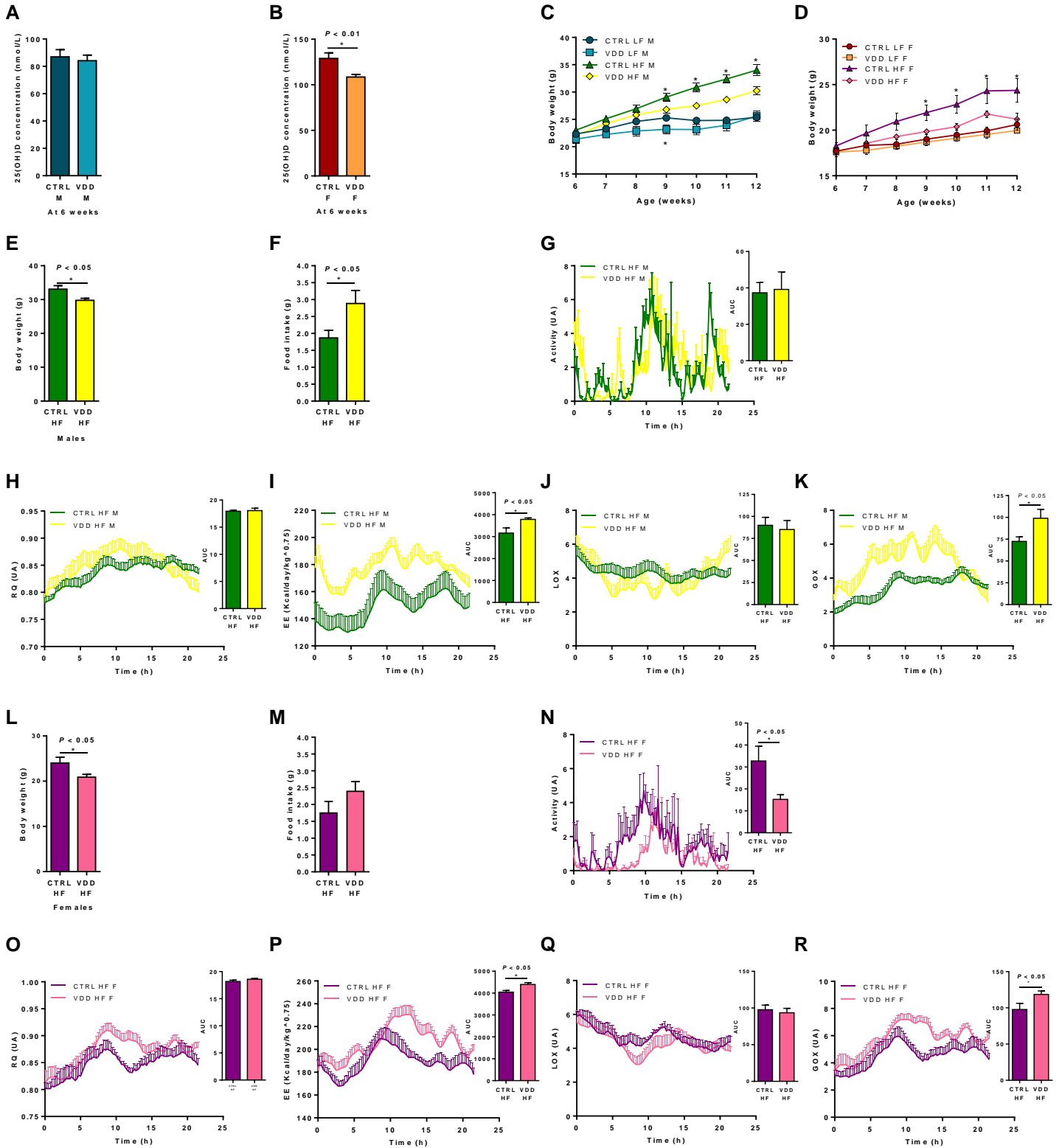


Fig. 3

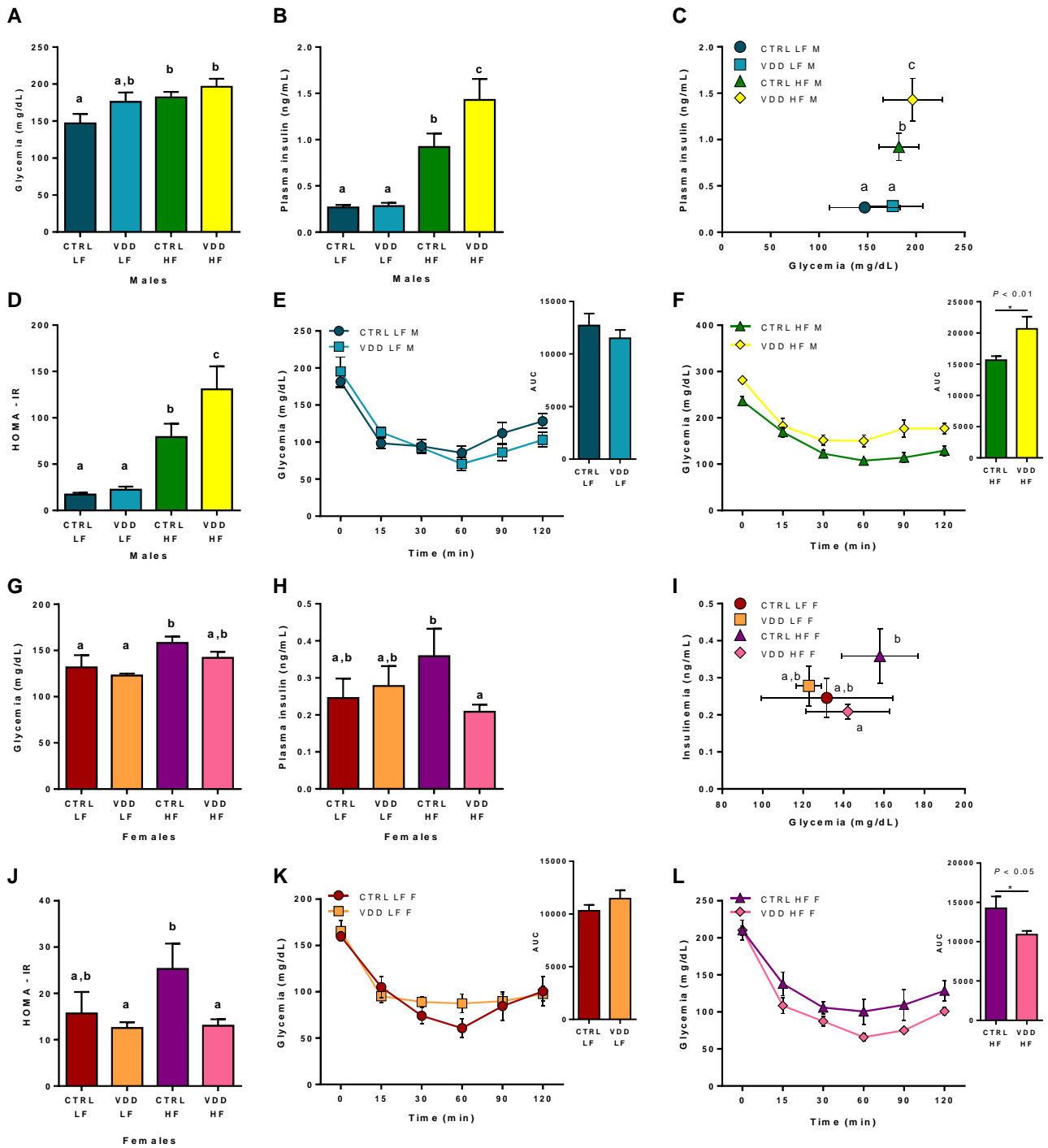


Fig. 4

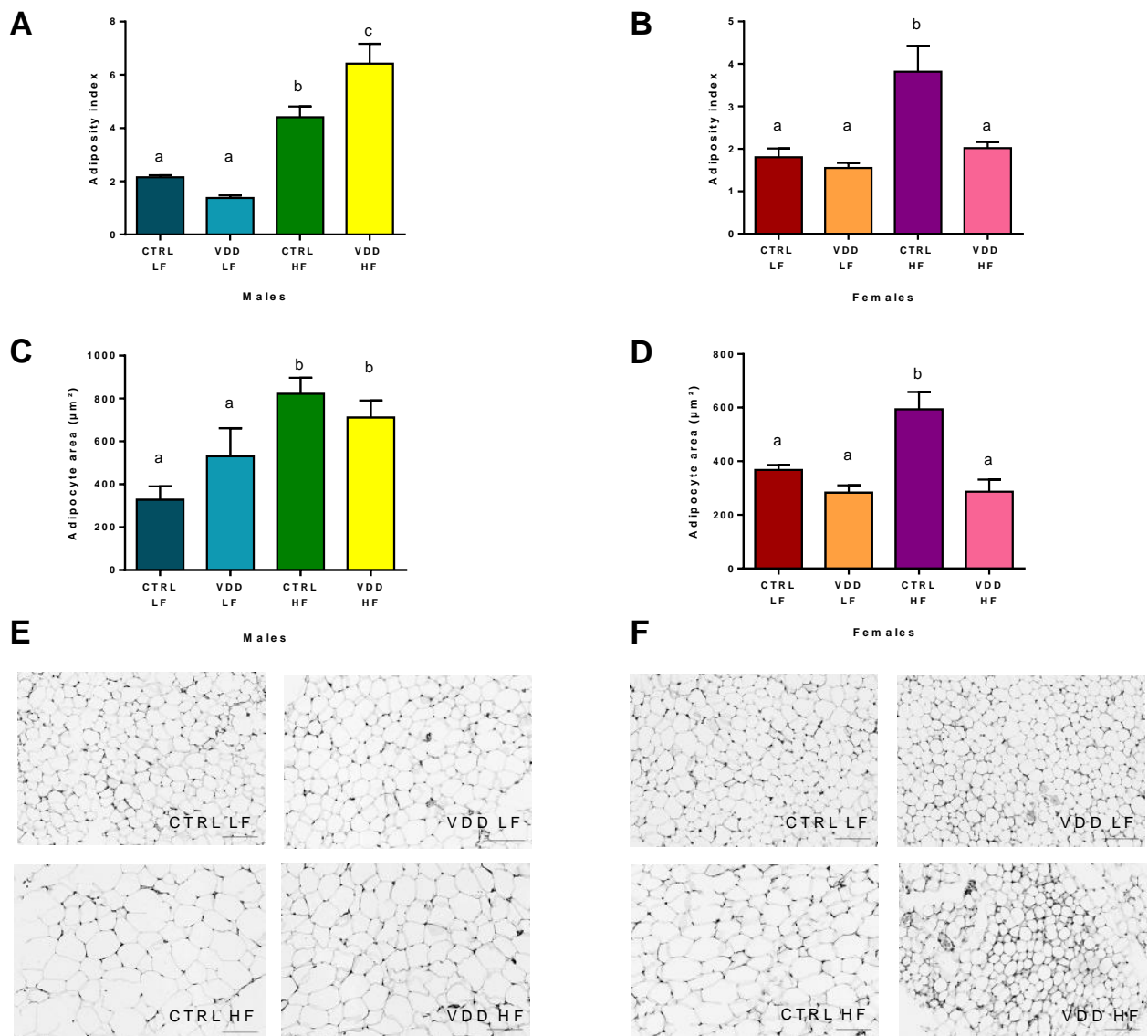
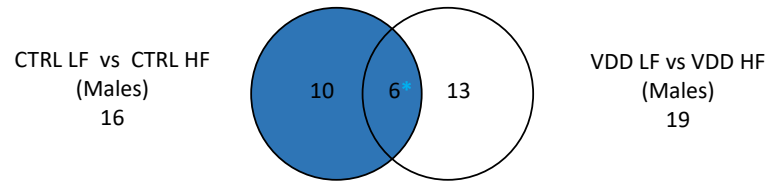
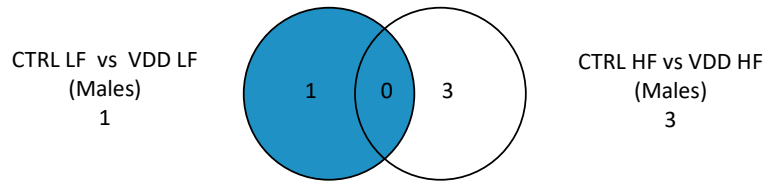


Fig. 5



Canonical Pathways	-log(p-value)	Z-score
GP6 Signaling Pathway*	6,67E00	2,982
Apelin Liver Signaling Pathway*	4,43E00	2,646
Apelin Cardiomyocyte Signaling Pathway	3,38E00	-0,302
Triacylglycerol Biosynthesis*	2,76E00	-2,646
Stearate Biosynthesis I (Animals)*	2,72E00	-1,890
γ-linolenate Biosynthesis II (Animals)	2,36E00	-2,000
Mitochondrial L-carnitine Shuttle Pathway	2,36E00	-1,000
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	2,23E00	1,890
Valine Degradation I*	2,21E00	-2,000
CDP-diacylglycerol Biosynthesis I	2,07E00	-2,000
NRF2-mediated Oxidative Stress Response*	1,98E00	-1,342
Phosphatidylglycerol Biosynthesis II (Non-plastidic)	1,89E00	-2,000
Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	1,84E00	2,000
Fatty Acid β-oxidation I	1,72E00	-2,236
Apelin Cardiac Fibroblast Signaling Pathway	1,55E00	1,000
p53 Signaling	1,38E00	-0,378

Canonical Pathways	-log(p-value)	Z-score
Oxidative Phosphorylation	6,92E00	-5,292
GP6 Signaling Pathway*	4,45E00	4,200
Triacylglycerol Biosynthesis*	4,22E00	-1,807
Nicotine Degradation II	2,56E00	-1,667
Valine Degradation I*	2,36E00	-2,449
Sirtuin Signaling Pathway	2,33E00	1,300
Apelin Liver Signaling Pathway*	2,28E00	1,890
NRF2-mediated Oxidative Stress Response*	1,93E00	-1,508
Stearate Biosynthesis I (Animals)*	1,78E00	-1,667
Superpathway of Melatonin Degradation	1,73E00	-0,707
Apelin Adipocyte Signaling Pathway	1,7E00	-1,941
Melatonin Degradation I	1,68E00	-1,134
Ethanol Degradation IV	1,64E00	-1,342
Nicotine Degradation III	1,52E00	-0,816
Isoleucine Degradation I	1,48E00	-2,000
Oxidative Ethanol Degradation III	1,48E00	-1,000
Ethanol Degradation II	1,48E00	-1,342
Glutathione-mediated Detoxification	1,4E00	-0,816
Bupropion Degradation	1,32E00	-2,000

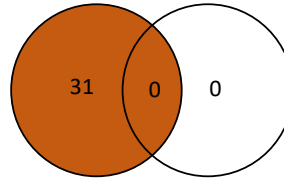


Canonical Pathways	-log(p-value)	Z-score
cAMP-mediated signaling	1,98E00	-1,000

Canonical Pathways	-log(p-value)	Z-score
Protein Kinase A Signaling	4,55E00	-0,447
Actin Cytoskeleton Signaling	4,32E00	2,236
RhoA Signaling	3,74E00	0,447

Fig. 6

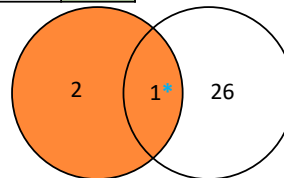
CTRL LF vs CTRL HF
(Females)
31



VDD LF vs VDD HF
(Females)
0

Canonical Pathways	-log(p-value)	Z-score
Valine Degradation I	6,19E00	-3,162
Fatty Acid β -oxidation I	4,62E00	-3,606
Oxidative Phosphorylation	4,44E00	-5,000
TCA Cycle II (Eukaryotic)	3,53E00	-3,162
Complement System	3,53E00	0,333
Branched-chain α -keto acid Dehydrogenase Complex	3,15E00	-2,000
Acetyl-CoA Biosynthesis I (Pyruvate Dehydrogenase Complex)	3,15E00	-2,000
Isoleucine Degradation I	2,99E00	-2,449
Sirtuin Signaling Pathway	2,75E00	1,372
Triacylglycerol Biosynthesis	2,62E00	-2,496
Apelin Adipocyte Signaling Pathway	2,53E00	-1,500
GP6 Signaling Pathway	2,2E00	2,837
Dendritic Cell Maturation	2,16E00	2,600
EIF2 Signaling	2,07E00	2,294
CDP-diacylglycerol Biosynthesis I	2	-1,414
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	1,97E00	2,496
Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis	1,95E00	0,577
Glutaryl-CoA Degradation	1,94E00	-2,449
Salvage Pathways of Pyrimidine Ribonucleotides	1,94E00	-2,840
Glutathione Redox Reactions I	1,76E00	-1,633
Phosphatidylglycerol Biosynthesis II (Non-plastidic)	1,73E00	-1,414
Nicotine Degradation II*	1,73E00	-2,828
Mitochondrial L-carnitine Shuttle Pathway	1,65E00	-1,342
Intrinsic Prothrombin Activation Pathway*	1,6E00	1,342
Gluconeogenesis I*	1,6E00	-1,633
LXR/RXR Activation	1,47E00	-1,897
Ethanol Degradation IV	1,47E00	-2,236
Tryptophan Degradation III (Eukaryotic)	1,46E00	-2,449
Oxidative Ethanol Degradation III	1,35E00	-2,000
Coagulation System*	1,32E00	0,447
Ethanol Degradation II	1,32E00	-2,236

CTRL LF vs VDD LF
(Females)
3



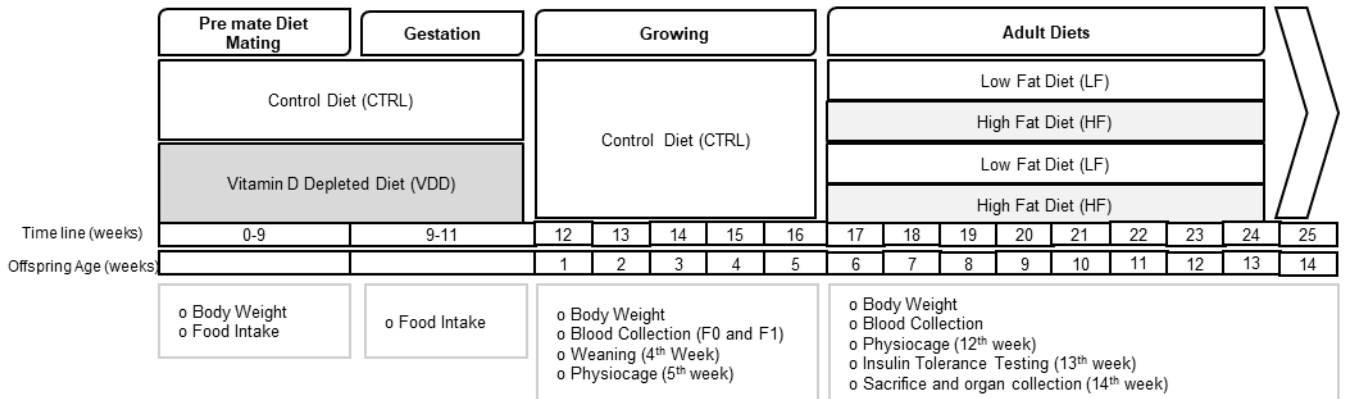
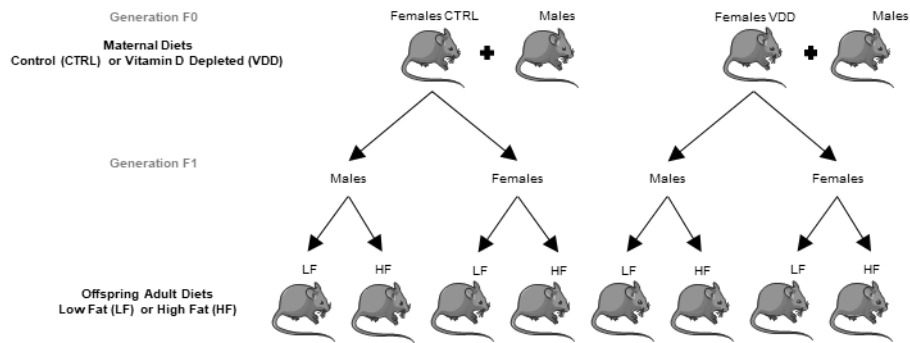
CTRL HF vs VDD HF
(Females)
27

Canonical Pathways	-log(p-value)	Z-score
EIF2 Signaling	1,65E01	3,464
GP6 Signaling Pathway*	8,59E00	-2,530
Apelin Liver Signaling Pathway	4,8E00	-2,000

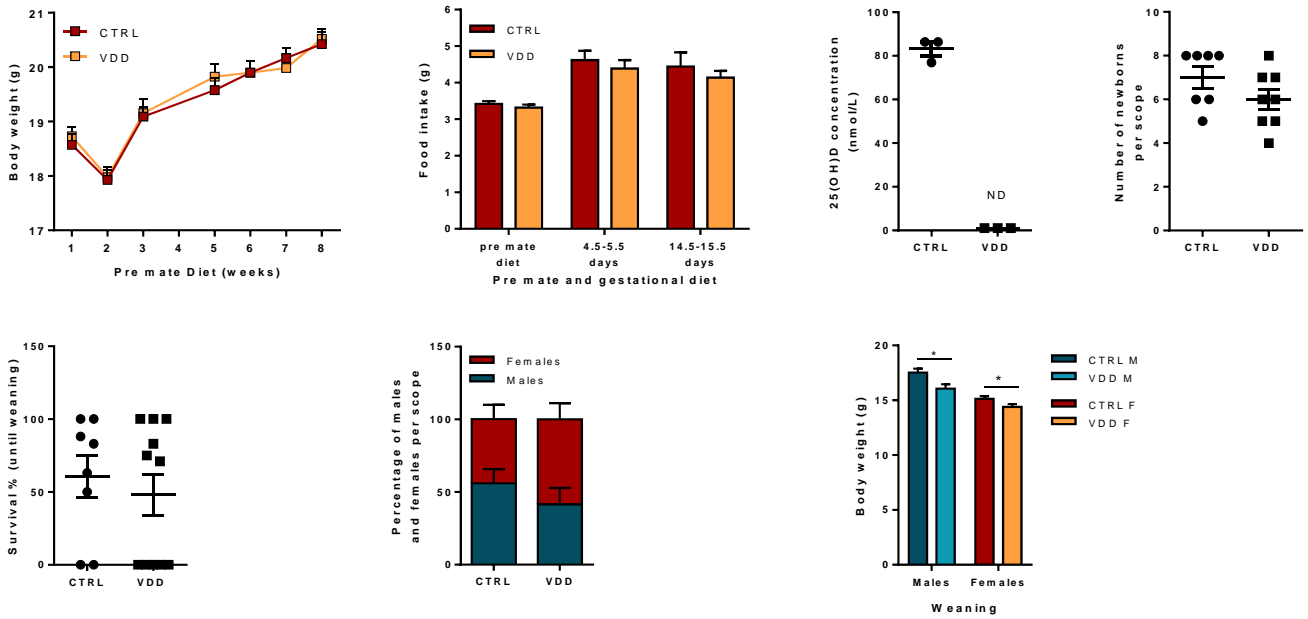
Canonical Pathways	-log(p-value)	Z-score
Oxidative Phosphorylation	4,77E01	7,211
Sirtuin Signaling Pathway	1,86E01	-3,212
TCA Cycle II (Eukaryotic)	1,61E01	4,000
Valine Degradation I	1,01E01	3,162
Fatty Acid β -oxidation I	8,11E00	3,464
Isoleucine Degradation I	5,25E00	2,449
Branched-chain α -keto acid Dehydrogenase Complex	4,73E00	2,000
Acetyl-CoA Biosynthesis I (Pyruvate Dehydrogenase Complex)	4,73E00	2,000
Ethanol Degradation II	4,68E00	2,646
Glutaryl-CoA Degradation	4,04E00	2,449
Tryptophan Degradation III (Eukaryotic)	3,44E00	2,449
Leucine Degradation I	3,25E00	2,000
Noradrenaline and Adrenaline Degradation	3,13E00	2,449
Oxidative Ethanol Degradation III	2,74E00	2,000
Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	2,68E00	-1,000
Gluconeogenesis I	2,68E00	1,342
Mitochondrial L-carnitine Shuttle Pathway	2,37E00	2,000
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	2,27E00	-1,890
Triacylglycerol Biosynthesis	2,23E00	2,646
Ethanol Degradation IV	2,22E00	2,000
Coagulation System	2,08E00	-1,000
Serotonin Degradation	2,06E00	2,449
GP6 Signaling Pathway*	2,06E00	-2,714
Nicotine Degradation II	1,9E00	1,342
Estrogen Biosynthesis	1,65E00	2,000
Stearate Biosynthesis I (Animals)	1,47E00	2,236
Superpathway of Methionine Degradation	1,41E00	2,000

	CTRL LF	VDD LF	CTRL HF	VDD HF
Morphological Parameters				
Body Weight (g)				
• Males	24.3 ± 0.2958 ^a	22.51 ± 0.6520 ^a	30.48 ± 0.7148 ^b	31.75 ± 1.002 ^b
• Females	19.31 ± 0.3931 ^a	18.59 ± 0.3286 ^a	22.89 ± 0.9031 ^b	19.33 ± 0.6595 ^a
Weight Gain (g)				
• Males	6.646 ± 0.5005 ^a	7.452 ± 0.9387 ^a	13.39 ± 0.7378 ^b	15.16 ± 1.179 ^b
• Females	4.063 ± 0.5052 ^a	3.955 ± 0.5873 ^a	7.908 ± 1.094 ^b	6.287 ± 0.8868 ^{b, a}
Liver Weight (g)				
• Males	0.7135 ± 0.04443 ^a	0.7723 ± 0.01659 ^a	0.9380 ± 0.02787 ^b	0.9745 ± 0.05009 ^b
• Females	0.6880 ± 0.01247 ^a	0.6889 ± 0.01676 ^a	0.8092 ± 0.04508 ^b	0.7124 ± 0.02121 ^a
Peri-gonadic Fat Pad Weight (g)				
• Males	0.3082 ± 0.01951 ^a	0.2108 ± 0.01174 ^a	0.8292 ± 0.08386 ^b	1.250 ± 0.1665 ^c
• Females	0.1827 ± 0.02384 ^a	0.1303 ± 0.01031 ^a	0.4312 ± 0.08245 ^b	0.2227 ± 0.03253 ^a
Retroperitoneal Fat Pad Weight (g)				
• Males	0.07933 ± 0.001513 ^a	0.04202 ± 0.005630 ^a	0.2591 ± 0.03501 ^b	0.3868 ± 0.05491 ^c
• Females	0.09013 ± 0.01191 ^a	0.07531 ± 0.007318 ^a	0.2611 ± 0.05271 ^b	0.1288 ± 0.01901 ^a
Inguinal Fat Pad Weight (g)				
• Males	0.1215 ± 0.003132 ^a	0.05894 ± 0.009512 ^a	0.2837 ± 0.03411 ^b	0.4352 ± 0.07789 ^c
• Females	0.07683 ± 0.01425 ^a	0.07484 ± 0.002521 ^a	0.2073 ± 0.05208 ^b	0.1084 ± 0.02163 ^a
Adiposity Index				
• Males	2.149 ± 0.08257 ^a	1.380 ± 0.08866 ^a	4.407 ± 0.4037 ^b	6.419 ± 0.7450 ^c
• Females	1.801 ± 0.2106 ^a	1.554 ± 0.1145 ^a	3.816 ± 0.6143 ^b	2.020 ± 0.1409 ^a
Spleen Weight (g)				
• Males	0.09479 ± 0.01159 ^a	0.09194 ± 0.006165 ^a	0.1072 ± 0.005647 ^a	0.1043 ± 0.005889 ^a
• Females	0.08770 ± 0.006625 ^a	0.07966 ± 0.002597 ^a	0.1170 ± 0.006488 ^b	0.1230 ± 0.01104 ^b
17β-estradiol (pg/mL)				
• Males	31.92 ± 2.299 ^a	29.53 ± 3.939 ^a	24.32 ± 2.248 ^a	34.32 ± 4.007 ^a
• Females	30.64 ± 3.498 ^{a, b}	22.81 ± 1.919 ^a	35.38 ± 3.559 ^b	35.35 ± 3.250 ^b

Table 1. General morphological parameters and 17β-estradiol plasma concentrations obtain from the offspring at the protocol end. Values are presented as Mean ± SEM. Bars not sharing the same letter were significantly different in the Fisher's LSD post hoc test $p < 0.05$.



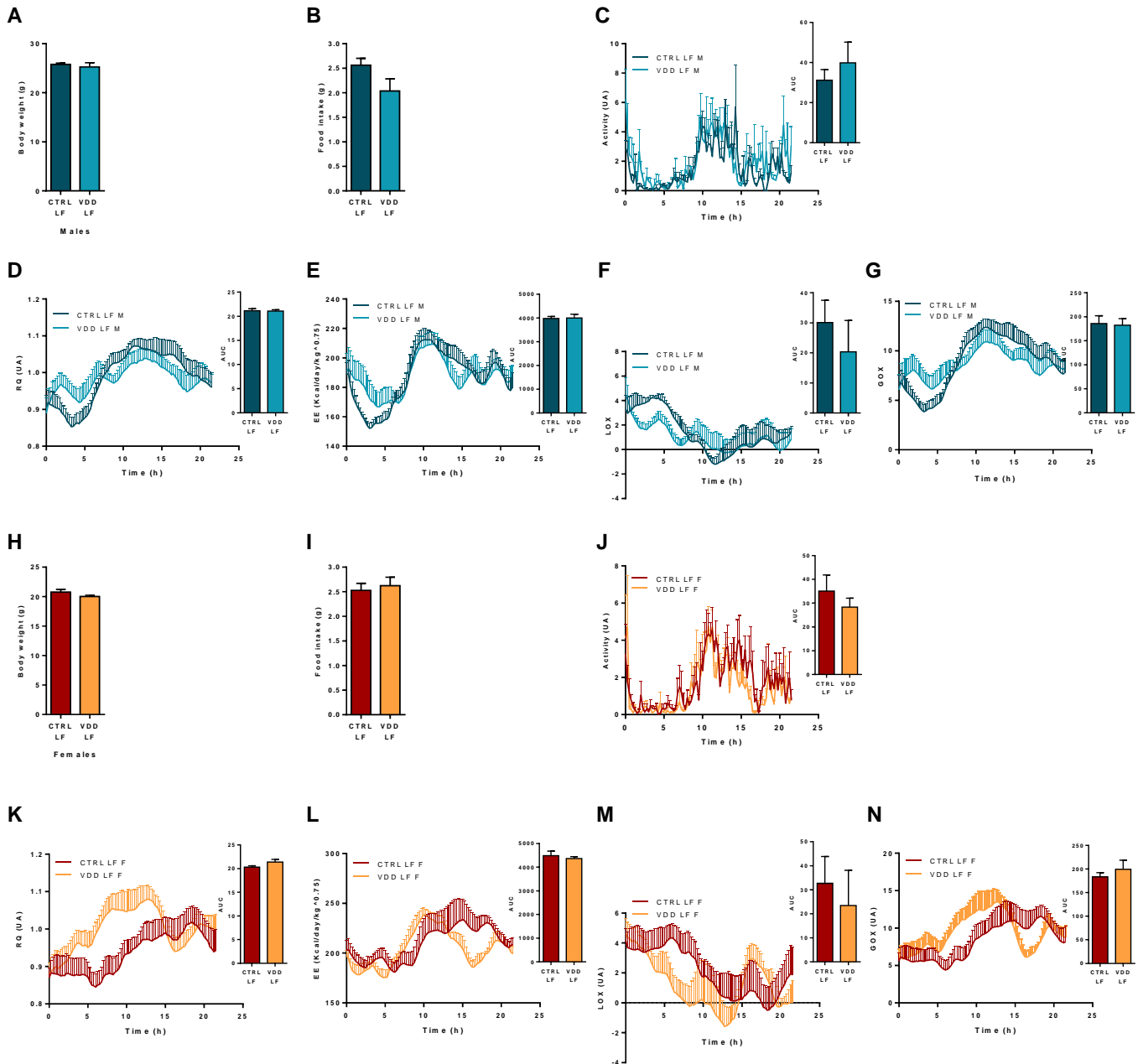
Supplemental Figure 1. Construction of the vitamin D deficient mouse model and induction of obesity in the adult offspring. (A) In generation F0, both control (CTRL) and vitamin D deficient (VDD) C57BL6/JRj female mice were mated with males (under control diet). Six-week-old F1 generation received Low Fat diet (LF) or High Fat diet (HF) until the protocol end. (B) General time line of the experimentation from the periconception to the sacrifice of the adult offspring.



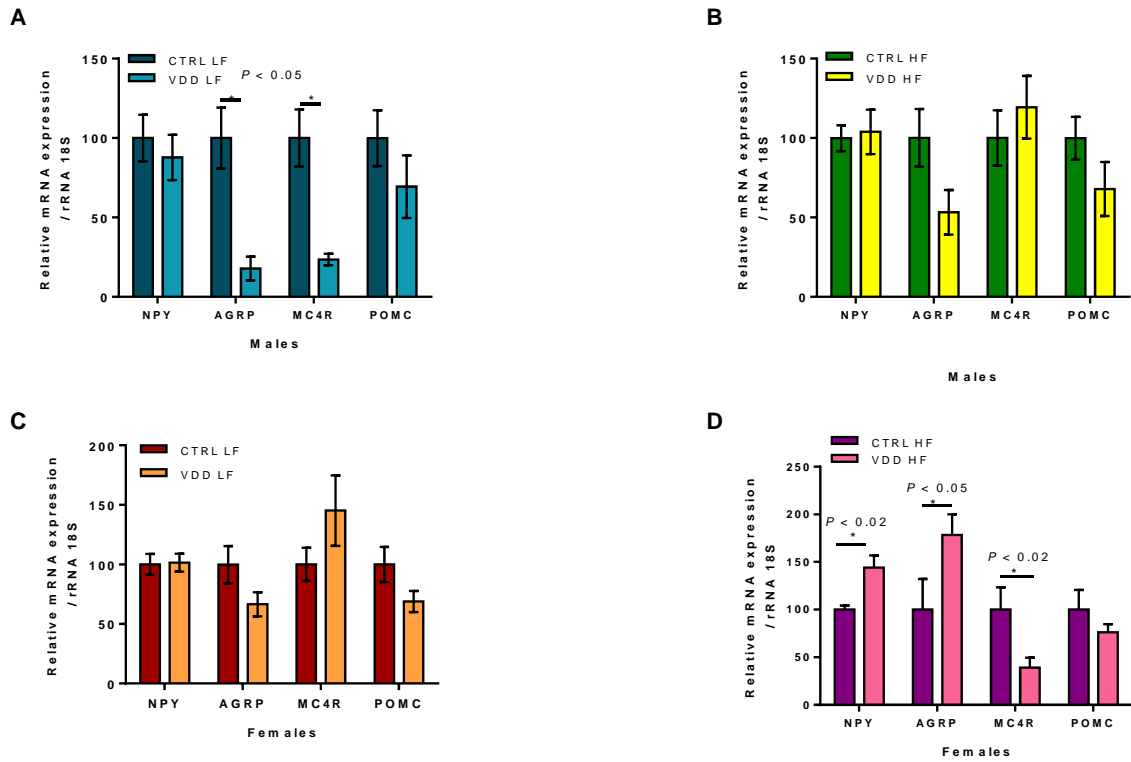
Supplemental Figure 2. General parameters of maternal and neonate model, and juvenile offspring. (A) Growing curve of the female during the 8-weeks of pre-mate diet (i.e. CTRL or VDD). (B) Maternal food intake during pre-mate and gestational diets. (C) Maternal 25-dihydroxyvitamin D plasma concentration. (D) Number of newborns per scope. (E) Percentage of survival of offspring from birth to weaning. (F) Percentage of male and female per scope. (G) Body weight of male and female at weaning regarding maternal diet ($P < 0,05$)

Sequence of primer used for qPCR		
Gene symbol	Primer Name	5' 3' primer sequence
• Agrp	mAgRP-F	agcttggcggagggtgct
	mAgRP-R	gcgacgcggagaacga
• Mc4-r	mMC4-R_F	aagctgccagatacaacttatga
	mMC4-R_R	acgcgctccagtaccataaca
• Npy	mNPY-F	tccgctctgcgacactacat
	mNPY-R	tgcttccttcattaagaggctctg
• Pomc	mPOMC_F	tgaacatctttgtcccagaga
	mPOMC_R	tgcaaggcaacaagattgg

Supplemental Table 1 . Sequence of primers used for qPCR.



Supplemental Figure 3. Indirect calorimetry of adults (E-R) offspring during 24 hours to compare the energetic metabolism of the VDD and the CTRL on LF diet. Parameters measured during 24 h for males and females were Body weight (A,H), Food intake (B,I), activity (C,J), Respiratory quotient (RQ, D,K), Energy expenditure (EE, E,L), Lipid oxidation (LOX, F,M) and carbohydrate oxidation (GOX, G,N).



Supplemental Figure 4 . Relative gene expression of gene implicated in melanocortin axis in the hypothalamus of the offspring. (A) For males exposed in adulthood to LF diet or (B) High Fat diet. (C) For females exposed to Lf diet in adulthood or (D) High fat diet.

	Total mRNA differentially expressed	Down-regulated	Up-regulated
Males			
• CTRL LF vs CTRL HF	985	465	520
• VDD LF vs VDD HF	2350	1126	1224
	636 common		
• CTRL LF vs VDD LF	112	72	40
• CTRL HF vs VDD HF	219	19	200
	5 common		
Females			
• CTRL LF vs CTRL HF	2531	1265	1266
• VDD LF vs VDD HF	56	40	16
	14 common		
• CTRL LF vs VDD LF	173	64	109
• CTRL HF vs VDD HF	962	432	530
	27 common		

Supplemental Table 2. General regulation of offspring transcriptomes, mRNA differentially expressed on visceral adipose tissue of the offspring.

RESULTAT 1 : Étude des profils microARNs dans le tissu adipeux péri gonadique

Les microARNs (miRs) sont de courts ARN non codants impliqués dans la régulation et l'expression de gènes dans de nombreux processus biologiques (Ebert and Sharp 2012). L'objectif de ce travail était de quantifier les profils d'expression de microARNs et les associer avec les profils transcriptomiques, des souris de notre étude (**Article 1**), afin d'expliquer les différences de profils métaboliques (notamment l'adiposité exacerbée dans les groupes VDD-HF male et CTRL-HF femelle).

Résultats :

Chez nos CTRL mâles, 5 microARNs sont différentiellement exprimés entre les conditions LF et HF, dont 2 sont sous-exprimés et 3 sur-exprimés. La plus forte *down-régulation* est de 1.69 du miR 541-5p et la plus forte *up-régulation* est de 16.23 par le miR 141-3p. Pour les mâles VDD, 15 microARNs sont différentiellement exprimés (*up-régulation*), entre les conditions LF et HF, et la plus haute *up-régulation* est de 2.89 pour le miR 101a-3p. Chez les femelles en condition CTRL, 2 microARNs sont différentiellement exprimés et *down-régulés* entre les groupes LF et HF. La plus forte *down-régulation* est de 1.7 pour le miR 30d-5p. Alors que pour les femelles VDD, 29 microARNs sont différentiellement exprimés entre les conditions LF et HF (tous *up-régulés*). La plus forte *up-régulation* est de 6.57 pour le miR 144-3p (**Tableau 8**). L'analyse bibliographique des microARNs différentiellement exprimés dans les différentes conditions (LF vs HF) n'a cependant pas été concluante par l'absence de données dans la littérature en lien avec le métabolisme du tissu adipeux. De même, aucune interactions significatives entre les mirnômes et transcriptomes de la descendance n'ont été relevées. On a pu néanmoins remarquer que la régulation était sexe-dépendante, avec un plus grand nombre de microARNs différentiellement exprimés (entre les conditions VDD-LF vs VDD-HF) chez les femelles par rapport aux mâles. Ces différences d'expression en microARNs étayant donc l'hypothèse d'un métabolisme global altéré chez la descendance issue de mères carencées en vitamine D.

	Total micro RNA differentially expressed	Down-regulated	Up-regulated
Males			
• CTRL LF vs CTRL HF	5	2	3
• VDD LF vs VDD HF	15	0	15
Females			
• CTRL LF vs CTRL HF	2	2	0
• VDD LF vs VDD HF	29	0	29

Tableau 8 : microARNs différentiellement exprimés dans le tissu adipeux périgonadique de la descendance

Données supplémentaires :

A

Mature ID	p-value (comparing to CTRL HF M)	Fold Change	95% CI	Fold Regulation
	CTRL LF M			
mmu-miR-872-5p	0,003174	2,2188	(1.45, 2.99)	2,2188
mmu-miR-541-5p	0,046874	0,5904	(0.38, 0.80)	-1,6938
mmu-miR-411-5p	0,047612	0,7411	(0.57, 0.91)	-1,3493
mmu-miR-1a-3p	0,020823	4,4467	(0.47, 8.42)	4,4467
mmu-miR-141-3p	0,029529	16,2262	(0.00001, 46.59)	16,2262

B

Mature ID	p-value (comparing to VDD HF M)	Fold Change	95% CI	Fold Regulation
	VDD LF M			
mmu-miR-16-5p	0,026478	1,4348	(1.00, 1.87)	1,4348
mmu-miR-21a-5p	0,02654	1,6521	(1.00, 2.31)	1,6521
mmu-miR-29b-3p	0,005735	1,8142	(1.11, 2.52)	1,8142
mmu-let-7c-5p	0,028405	1,355	(1.10, 1.61)	1,355
mmu-miR-30e-5p	0,045846	1,4028	(1.04, 1.77)	1,4028
mmu-miR-30a-5p	0,04772	1,398	(1.07, 1.73)	1,398
mmu-let-7f-5p	0,012341	1,8613	(1.20, 2.52)	1,8613
mmu-miR-29a-3p	0,008446	1,9846	(1.28, 2.69)	1,9846
mmu-miR-872-5p	0,005904	1,9702	(1.06, 2.88)	1,9702
mmu-miR-19b-3p	0,028369	2,0249	(0.80, 3.25)	2,0249
mmu-miR-20a-5p	0,044864	1,5898	(0.90, 2.28)	1,5898
mmu-miR-150-5p	0,009736	1,8854	(1.26, 2.51)	1,8854
mmu-miR-99a-5p	0,018501	1,4973	(1.19, 1.81)	1,4973
mmu-miR-218-5p	0,038809	2,4475	(0.86, 4.04)	2,4475
mmu-miR-101a-3p	0,001021	2,8915	(1.05, 4.73)	2,8915

C

Mature ID	p-value (comparing to CTRL HF F)	Fold Change	95% CI	Fold Regulation
	CTRL LF F			
mmu-miR-30d-5p	0,01473	0,5886	(0.42, 0.76)	-1,699
mmu-miR-125a-5p	0,007511	0,7196	(0.60, 0.84)	-1,3896

D

Mature ID	p-value (comparing to VDD HF F)	Fold Change	95% CI	Fold Regulation
	VDD LF F			
mmu-miR-21a-5p	0,013551	2,9742	(0.80, 5.14)	2,9742
mmu-miR-126a-3p	0,035948	2,8739	(0.46, 5.28)	2,8739
mmu-miR-15a-5p	0,004205	3,5406	(0.85, 6.23)	3,5406
mmu-miR-29b-3p	0,002694	3,9986	(1.15, 6.85)	3,9986
mmu-miR-24-3p	0,015449	1,7514	(1.09, 2.42)	1,7514
mmu-miR-27a-3p	0,004192	2,8501	(1.38, 4.32)	2,8501
mmu-miR-22-3p	0,00037	2,319	(1.83, 2.81)	2,319
mmu-miR-140-5p	0,049974	3,2682	(0.70, 5.84)	3,2682
mmu-let-7f-5p	0,01694	2,3834	(0.65, 4.11)	2,3834
mmu-miR-130a-3p	0,016291	1,9245	(1.34, 2.51)	1,9245
mmu-miR-27b-3p	0,003325	2,7847	(1.35, 4.22)	2,7847
mmu-miR-29a-3p	0,013133	2,2902	(1.35, 3.23)	2,2902
mmu-miR-32-5p	0,005037	5,8523	(0.00001, 12.02)	5,8523
mmu-miR-19b-3p	0,045107	3,1965	(0.36, 6.03)	3,1965
mmu-miR-93-5p	0,036738	1,633	(1.01, 2.25)	1,633
mmu-miR-196b-5p	0,016642	2,114	(1.06, 3.16)	2,114
mmu-let-7i-5p	0,003101	2,4623	(1.32, 3.61)	2,4623
mmu-miR-20a-5p	0,029264	2,3166	(0.88, 3.75)	2,3166
mmu-miR-28c	0,01773	1,4545	(1.09, 1.82)	1,4545
mmu-let-7d-5p	0,017844	1,6307	(1.26, 2.00)	1,6307
mmu-miR-196a-5p	0,046612	2,0828	(0.95, 3.21)	2,0828
mmu-miR-106b-5p	0,025771	1,7642	(1.07, 2.46)	1,7642
mmu-let-7g-5p	0,024744	2,0456	(1.04, 3.06)	2,0456
mmu-miR-10b-5p	0,012088	1,53	(1.16, 1.90)	1,53
mmu-miR-144-3p	0,045921	6,5659	(0.00001, 15.59)	6,5659
mmu-miR-19a-3p	0,032995	3,4593	(0.47, 6.45)	3,4593
mmu-miR-186-5p	0,011316	2,1133	(1.17, 3.06)	2,1133
mmu-miR-218-5p	0,032099	3,7425	(0.78, 6.71)	3,7425
mmu-miR-101a-3p	0,023635	4,3065	(0.00001, 8.72)	4,3065

Tableau 9 : microARNs différentiellement exprimés dans le tissu adipeux péri gonadique.

(A) Chez les males CTRL (B) ou VDD et pour (C) les femelles CTRL ou (D) VDD.

RESULTAT 2 : Maternal vitamin D impairs heart formation in mouse offspring

En préparation

Dans un contexte sociétal et maternel similaire à celui précédemment exposé, notre intérêt s'est porté sur l'impact de la VDD maternelle sur le développement et le devenir cardiaque de la descendance. Dans ce modèle, nous avons prélevé des cœurs embryonnaires issus de mères VDD et contrôles, au stade (E16.5), afin d'évaluer la présence d'un phénotype (en histologie et immunofluorescence). Puis nous avons étudié les mécanismes sous-jacents par séquençage-ARN, PCR en temps réel et par technique d'immunoprécipitation de la chromatine (*ChIP-sequencing*) associée au VDR afin d'évaluer les loci cibles de VDR, au niveau de l'ADN des ventricules gauches embryonnaires VDD et contrôles. Nous nous sommes également intéressés aux altérations fonctionnelles dans les cœurs adultes (à 2 et 6 mois) que nous avons étudié par échocardiographie.

Ainsi nous avons mis en évidence, pour la première fois, que les parois ventriculaires gauches des E16.5 VDD sont plus épaisses que celles des animaux contrôles, par hypertrophie des cardiomyocytes. Ce phénotype embryonnaire est associé à une dérégulation de leur transcriptome, notamment au niveau de gènes impliqués dans le développement cardiaque (*Tbx5*, *Gata4*, *Myl2*) et du *Vdr*. De telles modifications semblent être liées, à un enrichissement différentiel en VDR des régions régulatrices de gènes et en particulier au niveau de la boucle chromatinienne incluant *Tbx3* et *Tbx5* des ventricules gauches d'embryons VDD. Toutes ces modifications *in utero* ont un impact à long terme sur la morphologie et le fonctionnement du cœur. Chez la descendance mâle adulte âgée de 2 mois, on peut observer un épaississement ventriculaire gauche et une augmentation de la fraction de raccourcissement. Plus tardivement à 6 mois les animaux présentent une décompensation du ventricule gauche. Ainsi, la carence maternelle en vitamine D module le développement cardiaque fœtal ce qui impacte le fonctionnement cardiaque de la descendance adulte.

Résultats :

Les embryons issus des femelles carencées en vitamine D (VDD) avaient une paroi ventriculaire gauche ($p < 0.01$) et un septum significativement plus épais ($p < 0.05$) que ceux des embryons contrôles (CTRL) (Figure 1A-D). Cependant il n'y avait pas de différence statistique entre les tailles des parois ventriculaires droites (Figure 1E). On observait également que l'aire occupée par les cardiomyocytes des embryons VDD était supérieure (Figure 1G) à celle occupée par les contrôles ($p < 0.01$) (Figure 1F, H).

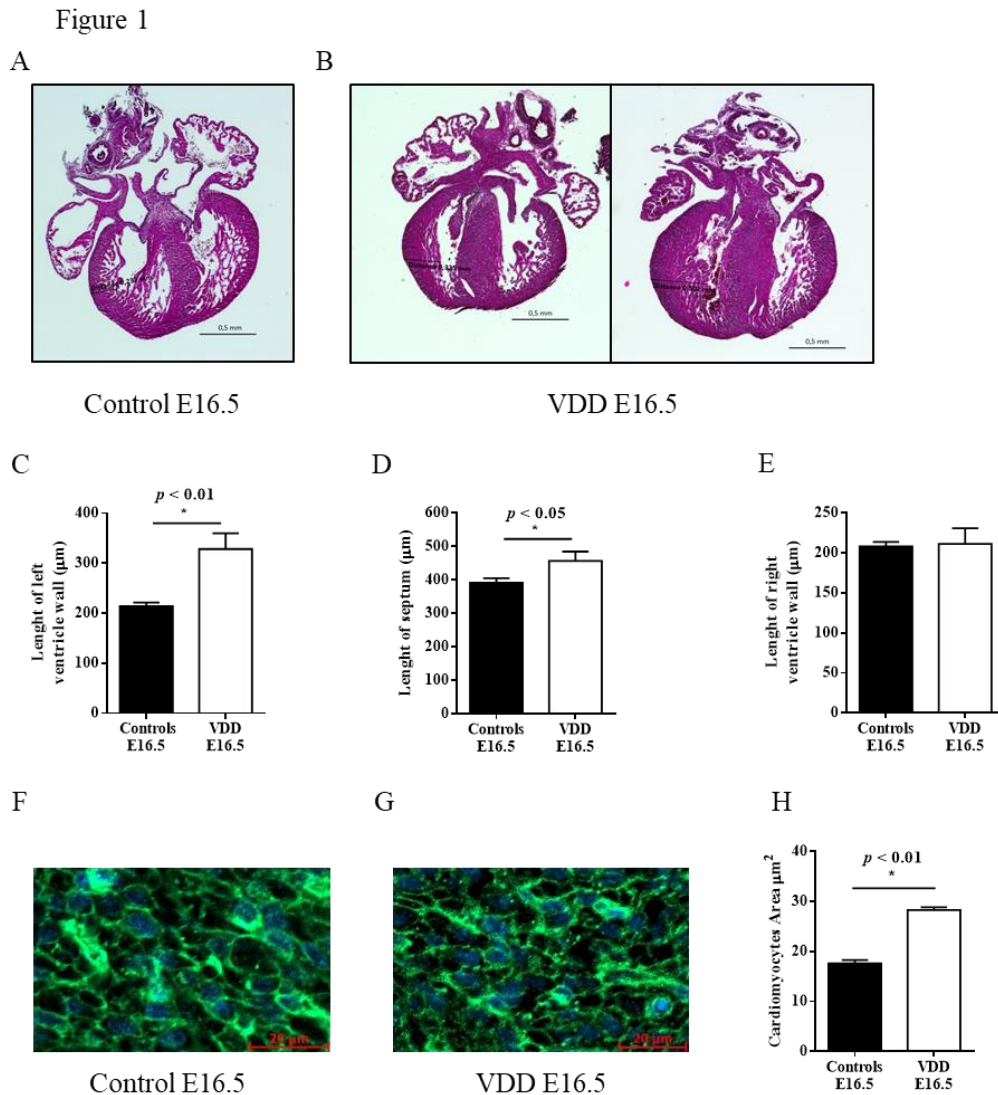


Figure 1 : Morphologie cardiaque des embryons E16.5. (A) Histologie : coloration des sections de cœurs embryonnaires (E16.5), en éosine-hématoxyline, issus de mères contrôles et (B) de mères carencées en vitamine D (VDD). (C) Mesures des parois ventriculaires gauches, (D) droites et (E) de l'épaisseur des septums des cœurs embryonnaires. (F) Immunofluorescence WGA des cardiomyocytes des parois ventriculaires gauches des embryons contrôles et (G) VDD. (H) Mesure de l'aire des cardiomyocytes, de la paroi ventriculaire gauche, des E16.5.

L'analyse par IPA du séquençage ARN des ventricules gauche a mis en évidence que 1555 transcrits étaient différentiellement exprimés avec 1058 ARNm *up-régulés* (*Fold Change* > 1.5) et 497 ARNm *down-régulés* (*Fold Change* < -1,5) chez les VDD. Mais également que la voie impliquée dans le développement et la régulation du cœur présentait des gènes dont l'expression prédictive était dérégulée, notamment une surexpression (en rouge) de *Tbx5* (Figure 2A). Ces données ont été confirmées par PCR en temps réel pour certains gènes, tels que les facteurs de transcription *Tbx5*, *Gata4*, *Myf2* et du transcrit *Vdr* qui sont surexprimés chez les VDD par rapport aux CTRL ($p < 0.05$) (Figure 2B).

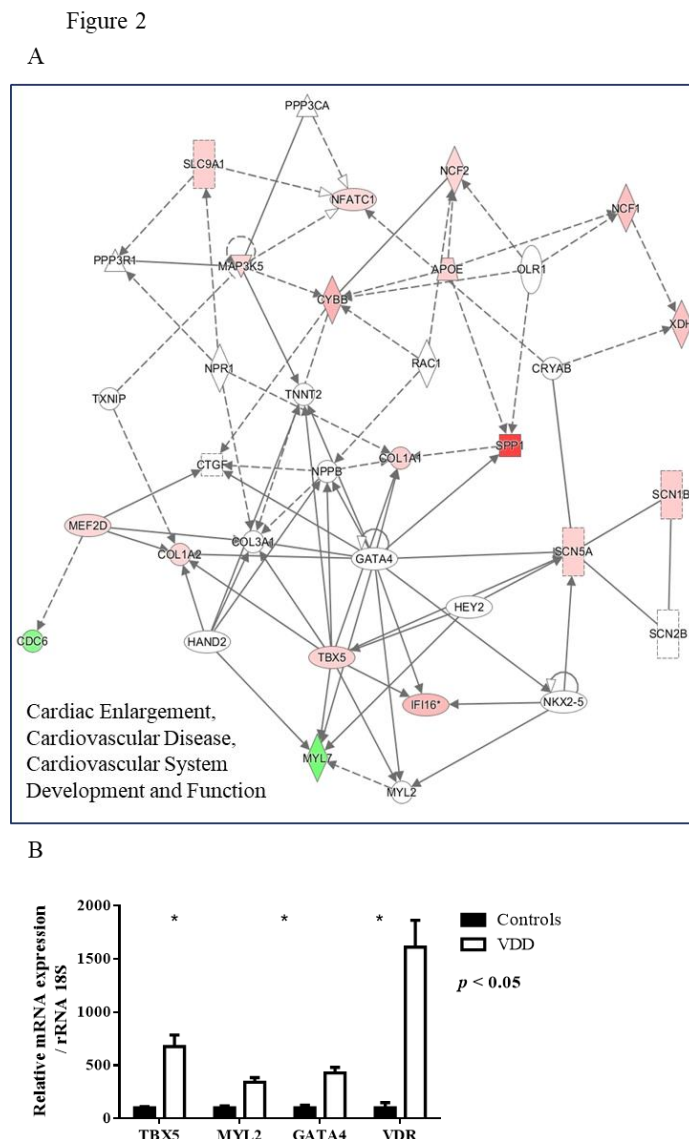


Figure 2 : Transcriptomes des cœurs embryonnaires E16.5. (A) Voie canonique régulée chez les E16.5 VDD avec en rouge les transcrits de gènes sur-exprimés et en vert les sous-exprimés. (B) Expression relative des transcrits de gènes impliqués dans le développement cardiaque et du Vdr.

Pour identifier de potentiels loci ciblés par le récepteur à la vitamine D (VDR) nous avons effectué une immunoprécipitation de la chromatine à partir des ventricules gauches E16.5 en utilisant un anticorps-anti VDR. L'analyse de *Chip-sequencing* de la région génomique spécifique contenant *Tbx3* et *Tbx5* a permis de mettre en évidence que ces deux loci sont différemment ciblés par VDR dans les cœurs VDD comparés aux contrôles (Figure 3 A). Il est intéressant de noter que la présence de pics correspondants à un enrichissement en VDR a déjà été démontré dans des ventricules contrôles, au niveau des loci formant des *topology associated domains* (TAD) (Figure 3 B)(van Weerd et al. 2014). Dans notre étude au niveau de ces TAD, le pourcentage d'enrichissement en VDR de quatre pics (flèches noires Figure 3A), sont significativement réduits dans les cœurs VDD comparés aux contrôles (Figure 3C). Deux pics (*Tbx3P2* et *Tbx5P5*, flèches noires figure 3A) dans les régions promotrices de *Tbx3* et *Tbx5* encadrent un site CTCF (flèche bleue Figure 3A). Aussi deux autres pics proches du promoteur *Med13l* et *Rbm19* (*Tbx3P1* et *Tbx5P6*, respectivement) correspondent également à des régions occupées par le CTCF (lesquelles sont représentées par deux étoiles noires et une flèche bleue dans la Figure 3 A, B).

Figure 3

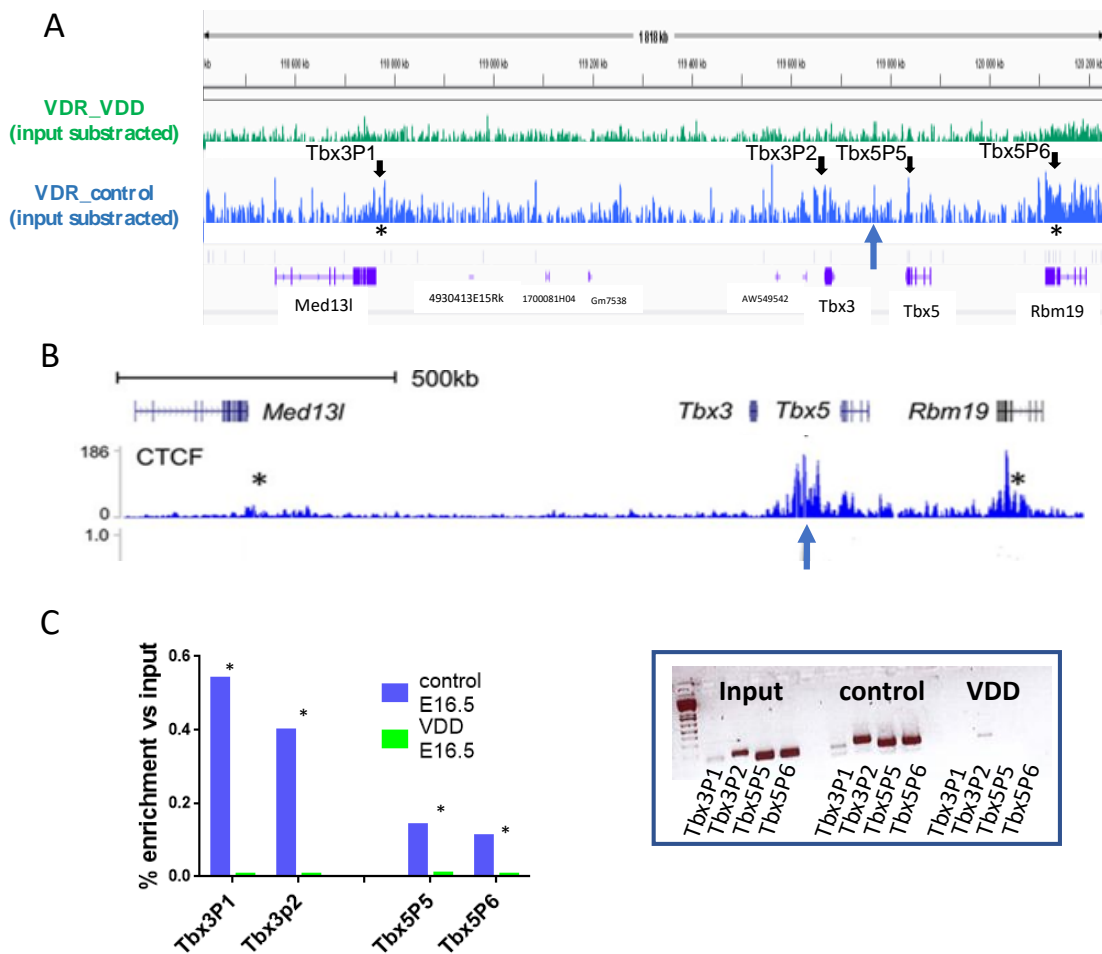


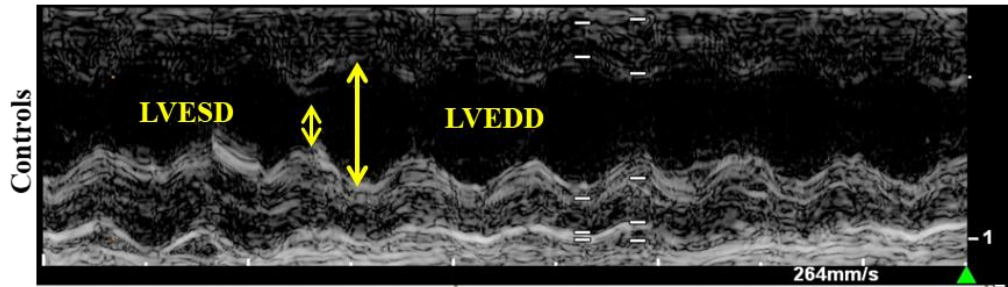
Figure 3 : Anti-VDR *Chip-sequencing* des ventricules gauches embryonnaires. (A) Pics d'enrichissement en VDR de la chromatine extraite à partir des ventricules gauches à E16.5 dans le locus contenant *Tbx3* et *Tbx5* chez les VDD (en vert) et contrôles (en bleu). Quatre pics d'enrichissement en VDR désignés par des flèches noires sont à dénombrer (*Tbx3P1*, *Tbx3P2*, *Tbx5P5*, *Tbx5P6*). Aussi, trois régions occupées par le CTCF sont représentées par deux étoiles noires et une flèche bleue. (B) Données anti-CTCF ChIP-seq issues de GEO DataSets révélant les sites CTCF (étoiles noires et flèche bleue) existants dans la région génomique incluant *Tbx3* et *Tbx5*. (C) Pourcentage d'enrichissement en VDR au niveau des quatre pics prédéfinis pour les embryons VDD et contrôles ; électrophorèse de vérification suite au ChIP-PCR pour confirmer l'expression des quatre pics chez les embryons contrôles et VDD.

L'analyse fonctionnelle par échocardiographie des cœurs à 2 mois (Figure 4A) nous a permis d'observer un épaississement de la paroi ventriculaire gauche ($p < 0.05$; Figure 4B) associée à une fraction de raccourcissement augmentée chez les mâles VDD ($p < 0.01$; Figure 4C). Par la suite, la fraction de raccourcissement des ventricules des mâles VDD âgés de 6 mois a été significativement abaissée par rapport aux contrôles ($p < 0.01$; Figure 4D).

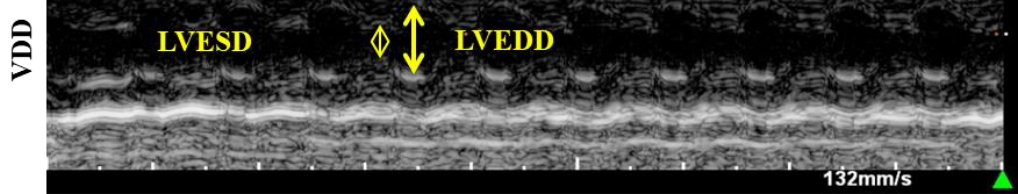
Figure 4

A

N=5 recordings
3 males

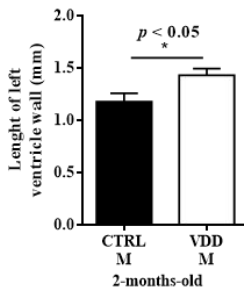


N=11 recordings
6 males

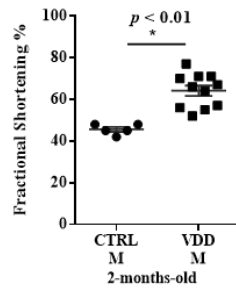


(M-Mode)

B



C



D

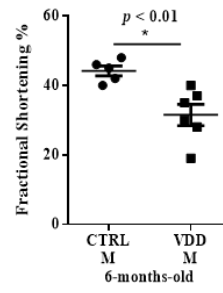


Figure 4 : Analyse fonctionnelle des cœurs adultes mâles. (A) Échocardiographie en M-mode des cœurs contrôles et VDD à 2 mois. Mesure (B) de la taille de la paroi ventriculaire gauche, (C) de la fraction de raccourcissement des cœurs à 2 mois et (D) à 6 mois.

Données supplémentaires :

Sequence of primer used for qPCR

Gene symbol	Primer Name	5' 3' primer sequence
• Gata4	GATA4F	GGTCCCAGGCCTCTTGCAATGCGG
	GATA4R	AGTGGCATTGCTGGAGTTACCGCTG
• Mlc2v	MLC2VF	GCCAAGAAGCGGATAGAAGG
	MLC2VR	CTGTGGTTCAGGGCTCAGTC
• Tbx5	TBX5F	GACCGTCTTCCCTACCAGCA
	TBX5R	CTGCCTGACCACACGCTGAT
• Vdr	VDRF	CTCCTCGATGCCACCAACAAGACCTACG
	VDRR	GTGGGGCAGCATGGAGAGCGGAGACAG

Tableau 10 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR en temps réel

Primer Name	5'3' primer sequence
Tbx3peak1F	CACCACACACACACACAGGA
Tbx3peak1R	ACCATCCTTACAGCCCCTTC
Tbx3peak2F	TTATTAAGGGTCGGGTCAGC
Tbx3peak2R	CAGCCCCTGTGTGCTCTC
Tbx5peak5F	GGACTCACTCAGGGTTCCAC
Tbx5peak5R	CACGTGACATCACACAGGAG
Tbx5peak6F	GGACTCACTCAGGGTTCCAC
Tbx5peak6R	CACGTGACATCACACAGGAG

Tableau 11 : Séquences des amorces utilisées pour le CHIP-PCR

Discussion générale

La vitamine D semble jouer un rôle non négligeable dans le maintien de la santé cardio-métabolique dès le développement fœtal et jusqu'à l'âge adulte. En effet, la déficience maternelle en vitamine D *in utero*, définie pour des concentrations plasmatique en 25(OH)D < 50 nmol/L (Turck et al. 2016), a été associée à des altérations du métabolisme de la descendance. Il a notamment été montré que cette déficience est associée à plusieurs paramètres liés à l'obésité, tels que la composition du corps (pourcentage de masse maigre et grasse (Crozier et al. 2012; Boyle et al. 2017; Miliku et al. 2018), le poids du corps (Daraki et al. 2018; Morales, Rodriguez, et al. 2015) et l'homéostasie glucidique (Krishnaveni et al. 2011). Cette déficience maternelle en vitamine D a également été corrélée à des défauts de développement cardiaque chez la descendance, tels que les cardiopathies congénitales (Koster et al. 2018; Mokhtar et al. 2019; Dilli et al. 2018).

Dans ce contexte, nous nous sommes interrogés sur les interactions existantes et les mécanismes impliqués dans la programmation de la carence maternelle en vitamine D (ou VDD maternelle vs CTRL), sur le devenir métabolique et cardiaque de la descendance, à court et long terme. Pour ce faire, nous avons mis en place un modèle murin de carence maternelle en vitamine D qui nous a permis, dans un premier temps, d'étudier le métabolisme du tissu adipeux et l'homéostasie énergétique de la descendance, précocement, mais également les conséquences à l'âge adulte lorsque cette descendance est soumise à une alimentation obésogène (HF) ou contrôlée (LF). En parallèle, nous avons étudié l'impact cardiaque au niveau fœtal mais également chez l'adulte.

Ainsi, nous avons observé une réponse sexe-spécifique, concernant la prise de masse corporelle et l'homéostasie énergétique de la descendance juvénile (âgée de 5 semaines) issue de mères VDD (**Article 1**). En effet, les males VDD ont une masse plus faible, en accord avec ce qui a déjà été rapporté chez la souris âgée de 15 jours (Reichetzedder et al. 2014) ou au sevrage (Belenchia et al. 2017) (**Tableau 12**). En revanche, d'autres études également menées sur des mâles à l'âge adulte, mettent en évidence une masse plus élevée (Wen et al. 2018) ou une absence de différence (Zhang et al. 2014; Nascimento et al. 2013; Belenchia et al. 2018). Chez les femelles VDD aucune modification de masse n'a été observée. Par la suite, en utilisant de la calorimétrie indirecte, nous avons montré que ces différences de poids étaient associées à une régulation différentielle de l'homéostasie énergétique.

Etude	Esp.	Genre	Régime maternel et/ou adulte	Poids du corps	Adiposité	Glycémie et insulinémie	Glucose homéostasie	Prise alimentaire	Activité	Dépense énergétique
Article 1	Souris	M et F	CTRL (AIN93G 1 UI VD/g) ou VDD (AIN93G 0 UI VD/g) Puis LF (AIN 93 M) ou HF (45% de lipides)	VDD < CTRL (M, 5 sem) Pas d'effet pour F (5 sem) Pas d'effet en LF VDD-HF < CTRL-HF (M et F) VDD-HF < CTRL-HF (F)	Pas d'effet en LF (M et F) VDD-HF > CTRL-HF (M) VDD-HF < CTRL-HF (F)	Pas d'effet en LF HF (M) glycémie = Insulinémie ↑, HOMA-IR ↑ VDD-HF (M) Insulinémie ↓, HOMA-IR ↓ VDD-HF (F)	VDD-HF (M) insulino-résistant (13 sem) VDD-HF (F) insulino-sensible (13sem)	Pas d'effet (5sem) VDD-HF > CTRL-HF (12sem)	VDD > CTRL (5sem) = LF (12 sem) = chez HF (M) (12 sem) VDD-HF < CTRL-HF (F) (12sem)	VDD > CTRL (M) (5 sem) Pas d'effet pour F (5sem) VDD-HF > CTRL-HF (12sem)
Wen et al. 2018	Rat	M	CTRL (1000 UI VD/kg) ou VDD (0 UI VD/kg) Puis CTRL	VDD > CTRL (14 sem)	VDD > CTRL	Glycémie =	VDD insulino-résistant	Pas d'effet	Pas d'effet	VDD > CTRL
Belenchia et al. 2018	Souris	M	CTRL (1 UI VD/g) ou VDD (0 UI VD/g) Puis CTRL	Pas d'effet (75 j)	Pas d'effet	Insulinémie =	ND	ND	ND	ND
Belenchia et al. 2017	Souris	M	CTRL (AIN93G 10 UI VD/g) ou VDD (0 UI VD/g) Puis LF (AIN93G 1 UI VD/g) ou HF (45% de lipides)	VDD < CTRL (4 à 7 sem) Pas d'effet à l'âge adulte (7 à 19 sem)	Pas d'effet en LF VDD-HF > CTRL-HF	Glycémie =	Pas d'effet	ND	ND	ND
Zhang et al. 2014	Rat	M	CTRL (AIN93 G) ou VDD (AIN93 G, 0 UI VD) Puis AIN 93G CTRL	Pas d'effet (0 à 16 sem)	ND	Glycémie = Insulinémie ↑ HOMA-IR ↑ chez les VDD	VDD intolérant au glucose	Pas d'effet	ND	ND
Reichetzer et al. 2014	Souris	ND	CTRL (10,000 UI VD/kg) ou VDD (< 50 UI VD/kg) Puis LF pas précisé	Pas d'effet à la naissance VDD < CTRL (15 à 65 j)	ND	Glycémie =	VDD intolérant au glucose	ND	ND	ND
Nascimento et al. 2013	Souris	M	CTRL (AIN93G 1000 UI VD/kg) ou VDD (AIN93G 0 UI VD/kg) Puis CTRL	VDD > CTRL (6 mois)	VDD > CTRL	Glycémie = Insulinémie ↑ chez les VDD	VDD intolérant au glucose	ND	ND	ND

Tableau 12 : Récapitulatif des données métaboliques obtenues suite à une carence maternelle en vitamine D (dans la littérature) : comparaison entre les descendants déficients et les contrôles

Abréviations : M : mâle ; F : femelle ; ND : non déterminé ; VD : vitamine D ; CTRL : contrôle ; VDD : déficient en vitamine D ; LF : *low fat*, HF : *high fat*.

Chez les mâles VDD, l'augmentation de l'activité spontanée et de la dépense énergétique (via l'oxydation glucidique), associée à une absence de différence de prise alimentaire, conduisait à une diminution de masse. Chez les femelles VDD, la prise alimentaire est inchangée par rapport au groupe CTRL ce qui pourrait expliquer l'absence de modification de masse. L'accroissement de leur activité pourrait expliquer l'augmentation de l'oxydation glucidique qui, associée à une diminution de l'oxydation lipidique, n'induirait pas de modification de leur dépense énergétique. Il est intéressant de noter que l'augmentation de l'activité spontanée observée chez les deux genres, a déjà été rapportée chez des souris mâles VDD (L. Fu et al. 2017). Chez l'Homme, la VDD maternelle est associée à un risque augmenté de déficit de l'attention et d'hyperactivité chez l'enfant (Morales, Julvez, et al. 2015). Ce phénotype pourrait s'expliquer par l'action de la vitamine D sur le développement des structures centrales impliquées dans l'activité motrice ou encore l'attention (Hawes et al. 2015), mais ceci nécessite de futures investigations.

Ensuite, nous avons établi que la VDD maternelle, à elle seule, n'entraînait pas de différences morphologiques (masse totale du foie, masse grasse, taille des adipocytes), ou de la balance énergétique (poids, activité, dépense énergétique) chez la descendance adulte soumise à une alimentation contrôle (LF) à 12 et 14 semaines, respectivement. Ces observations sont en accord avec d'autres études (Belenchia et al. 2018; Wen et al. 2018). Cependant des différences de masse totale à 14 semaines ont été rapportées chez le rat mâle VDD (Wen et al. 2018), cette observation contradictoire pourrait s'expliquer par la composition du régime contrôle utilisé (non précisée dans leur étude). Lors de la mise en place de notre étude, nous avons émis l'hypothèse que le fait de challenger les animaux issus de mères VDD avec un régime HF (à 45 % riche en lipides ; entre 9 et 12 semaines) dévoilerait le phénotype métabolique de la descendance adulte. Ainsi nous avons pu constater que la descendance mâle et femelle VDD sous l'alimentation HF (VDD-HF) présentait une masse corporelle plus faible à 12 semaines que la descendance issue de souris contrôles. Cette observation n'a pas été faite dans une autre étude, ou les souris ne présentaient pas de différences de masses (Belenchia et al. 2017), mais pourrait s'expliquer par des différences liées au fond génétique différent des souris utilisées (C57BL6J RJ dans notre étude vs C57Bl6 a/a). Ces différences de masse des VDD-HF pourraient s'expliquer par une augmentation de la dépense énergétique (via l'oxydation des glucides) qui compenserait l'augmentation de la prise alimentaire. Cette augmentation de la prise de nourriture pourrait elle-même être liée à la modulation de l'expression de gènes impliqués dans l'axe mélanocortinergique au niveau de l'hypothalamus ; *i.e.* NPY, AgRP et MC4R. Compte tenu du profil d'expression de ces gènes hypothalamiques, un défaut de développement des voies mélanocortinergiques pourrait expliquer les perturbations du comportement alimentaire observées entre les animaux

contrôles et ceux issus de mères carencées en vitamine D. Ces données sont d'ailleurs en accord avec le rôle de la vitamine D dans le développement du cerveau (Eyles and McGrath 2018).

Outre les données de masse corporelle en lien avec le métabolisme énergétique, nous nous sommes intéressés à l'homéostasie glucidique de la descendance adulte. Comme cité précédemment, pour les paramètres morphologiques et énergétiques, aucune modification de la balance glucidique n'a été observée chez les animaux VDD soumis à une alimentation contrôle (LF) (mâles et femelles). Cela est en accord avec la littérature existante pour la glycémie (Reichetzeder et al. 2014; Wen et al. 2018; Zhang et al. 2014; Nascimento et al. 2013). Néanmoins d'autres études mettent en avant chez les mâles VDD une augmentation de l'insulinémie, de l'HOMA-IR et de l'insulino-résistance (Zhang et al. 2014; Nascimento et al. 2013). Ces divergences pourraient être dues aux modèles utilisés (souris vs rat) (Zhang et al. 2014) et la durée du protocole (14 semaines vs 6 mois) (Nascimento et al. 2013). De façon intéressante, chez les mâles VDD-HF, nous observons une augmentation de l'insulinémie, de l'HOMA-IR et de l'insulino-résistance, conformément aux études précédemment citées (Reichetzeder et al. 2014; Wen et al. 2018; Zhang et al. 2014; Nascimento et al. 2013). Nous avons également mis en évidence, pour la première fois, que les femelles VDD-HF présentent, pour l'ensemble de ces paramètres, des valeurs similaires aux femelles VDD-LF et CTRL-LF.

Par la suite, compte tenu du lien fort existant entre la résistance à l'insuline et l'adiposité (Rosen and Spiegelman 2006), nous avons pu observer, que l'index d'adiposité, tout comme l'insulino-résistance, n'étaient pas impactés chez les mâles VDD soumis à une alimentation LF. En soumettant les mâles VDD à une alimentation HF, nous avons mis en évidence une plus grande insulino-résistance en lien avec un index d'adiposité plus élevé (sans effet sur la cellularité adipocytaire), et ceci est en accord avec des données préexistantes chez la souris (Belenchia et al. 2017). Comme attendu chez les femelles CTRL-HF, l'adiposité, la cellularité et l'insulino-résistance sont induites par le régime HF. Néanmoins, nous rapportons pour la première fois que les femelles VDD-HF présentent des valeurs d'adiposité et de cellularité similaires aux groupes LF, tout comme l'insulino-résistance. Ces données novatrices mettent donc l'accent sur une régulation sexe-spécifique du métabolisme de la descendance.

Nous avons ensuite cherché à expliquer les différences d'adiposité par différences d'expression géniques au niveau du tissu adipeux périrénal. En comparant les mâles, issus de mères contrôles, soumis au régime LF ou HF à l'âge adulte (*i.e.* CTRL-LF vs CTRL-HF), nous avons mis en évidence que les voies canoniques en lien avec le catabolisme lipidique (*i.e.* voie mitochondriale de la L-carnitine et beta-oxydation des acides gras) sont induites chez les CTRL-HF par rapport aux CTRL-LF. Ceci est associé à un gain d'adiposité limité chez les

CTRL-HF. En revanche, chez les mâles issus de mères VDD (*i.e.* VDD-LF vs VDD-HF), on n'observe pas d'induction de ces mêmes voies canoniques, ce qui est associé à une plus forte accumulation de masse grasse et une forte prise de masse corporelle chez les VDD-HF par rapport aux VDD-LF. Ainsi, ces différences observées entre les souris issues de mères CTRL ou VDD pourraient être dues à leur capacité à induire une oxydation lipidique dans le tissu adipeux. En accord avec cette hypothèse, on observe que la réponse transcriptomique consécutive à la nutrition maternelle combinée à l'alimentation à l'âge adulte (*i.e.* CTRL-LF vs VDD-LF et CTRL-HF vs VDD-HF) n'est pas modifiée, ce qui est cohérent avec les faibles différences d'adiposité existantes entre les conditions LF (*i.e.* CTRL-LF vs VDD-LF, tous deux non obèses) ou HF (CTRL-HF vs VDD-HF, tous deux obèses). Toutes ces observations renforcent donc le rôle supposé du métabolisme lipidique sur les variations d'adiposité. Il est intéressant de souligner qu'il existe des exemples, nutritionnels et pharmacologiques chez l'animal, où une limitation de l'obésité est associée à une augmentation de la capacité oxydative du tissu adipeux blanc (Kusminski and Scherer 2012; Tourniaire et al. 2015; Flachs et al. 2013), bien que la contribution du tissu adipeux blanc dans la dépense énergétique de la globalité du corps soit considérée comme mineure.

Tout comme chez les mâles, le gain d'adiposité et de masse des femelles CTRL-HF comparées aux CTRL-LF est associé à une activation des voies canoniques liées au métabolisme lipidique (*i.e.* voie mitochondriale de la L-carnitine et beta-oxydation des acides gras, phosphorylation oxydative, synthèse du glycérol, voies des acides gras). A l'inverse chez les femelles VDD-HF, aucune voie canonique n'est activée par rapport aux VDD-LF, ce qui est cohérent avec leur adiposité et masse inchangées. En complément, en comparant l'impact de la nutrition maternelle associée à l'alimentation à l'âge adulte (*i.e.* CTRL-LF vs VDD-LF et CTRL-HF vs VDD-HF) on observe que les voies impliquées dans le métabolisme lipidique (*i.e.* beta-oxydation, voie mitochondriale de la L-carnitine, synthèse des triglycérides, phosphorylation oxydative) sont réprimées chez les VDD-HF par rapport aux CTRL-HF, ce qui est en accord avec la diminution de l'adiposité et de la masse observée chez les VDD-HF par rapport aux CTRL-HF.

Compte tenu de cette forte différence phénotypique liée au sexe, nous nous sommes intéressés aux taux d'œstradiol qui sont d'une part dépendant du sexe, et d'autre part connus comme étant associés à l'adiposité (Brown and Clegg 2010), à l'accumulation de tissu adipeux sous-cutané (Krotkiewski et al. 1983) et à l'homéostasie glucidique (Riant et al. 2009). Ainsi des taux d'œstrogènes décroissants, retrouvés dans le cadre de la ménopause, sont associés à une augmentation de la taille du tissu adipeux viscéral chez la femme post-ménopausée (Brown and Clegg 2010). Dans notre étude, nous avons analysé les taux plasmatiques de 17- β œstradiol et il s'est avéré que chez les mâles ces taux n'étaient pas modulés. Cela suggère

un impact mineur de ces concentrations sur le phénotype observé. Il est important de souligner que les récepteurs des estrogènes jouent également un rôle non-négligeable sur la modulation de l'adiposité (Brown and Clegg 2010). Ceux-ci devront donc être étudiés en détail. En revanche chez les femelles, en comparant les groupes CTRL, les concentrations 17- β œstradiol tendent à augmenter chez les HF par rapport aux LF mais sans atteindre la significativité, alors qu'en condition VDD, l'alimentation HF induisait significativement les taux de 17- β œstradiol comparé aux VDD-LF. La modulation de ce facteur clef pourrait expliquer à lui seul la limitation de poids, d'adiposité et l'amélioration du statut glucidique observé chez les VDD-HF. L'origine de cette induction demeure encore inconnue et nécessitera des expérimentations futures. Cette première partie de notre travail apporte donc de nouvelles informations sur l'impact de la carence maternelle en vitamine D, sur le devenir métabolique de la descendance, notamment en la prédisposant à des complications à long terme. Il est également important de souligner que les perturbations observées au niveau du métabolisme du tissu adipeux sont sexe-spécifiques.

La carence maternelle en vitamine D semble également avoir un impact sur les profils d'expression des microARNs de la descendance mâle et femelle (**Résultat 1**). En effet, nous avons pu observer que 15 microARNs sont impactés chez les mâles VDD (LF vs HF) et cet impact prévaut chez les femelles puisque 29 microARNs sont différentiellement exprimés en condition VDD (LF vs HF). Néanmoins, ces microARNs d'intérêt ne sont pas connus dans la littérature comme affectant le métabolisme du tissu adipeux d'une quelconque manière. Des analyses supplémentaires seraient donc nécessaires pour étudier les interactions qui pourraient exister avec le tissu adipeux. De plus, lorsque les microARNs d'intérêt ont été associés aux profils transcriptomiques de nos descendants (en utilisant le logiciel *Ingenuity Pathway Analysis*), aucune interaction significative n'a pu être relevée. Cependant, bien que les profils microARNs ne permettent pas d'établir une association avec les profils transcriptomique et métabolique (adiposité), ils s'inscrivent dans un phénotype métabolique globale qui est altéré lorsque la descendance est exposée à une carence périnatale en vitamine D et à une alimentation obésogène à l'âge adulte. De plus, cette régulation semble également être sexe-dépendante, avec un plus grand nombre de microARNs modulés chez les femelles.

Dans une seconde partie, notre modèle de carence maternelle en vitamine D, nous a permis de montrer une programmation précoce du devenir cardiaque de la descendance (**Résultat 2**). Un retard de développement cardiaque chez des rats âgés de 21 jours provenant de mères carencées en vitamine D a déjà été observé comparé à la descendance issue de mères

supplémentées en vitamine D (Morris et al. 1995). Nous avons montré pour la première fois l'association entre la carence maternelle en vitamine D, induite par l'alimentation pendant la période anténatale et la mise en place d'un phénotype de type hypertrophie ventriculaire gauche chez les embryons à 16,5 jours de gestation (E16.5). Dans ce modèle les embryons VDD présentent un épaississement de leur paroi ventriculaire gauche, en lien avec une augmentation de la taille des cardiomyocytes. Il serait intéressant, par la suite, d'avoir une approche longitudinale afin d'étudier le stade de mise en place de cette hypertrophie ventriculaire.

Ensuite, afin d'étudier les mécanismes impliqués dans la mise en place de ce phénotype chez les E16.5 VDD, nous nous sommes intéressés à leur profil transcriptomique qui se sont avérés être différentiellement modulés, comparé aux embryons contrôles. Nous avons notamment observé que le transcrit *Vdr* est surexprimé dans les cœurs embryonnaires VDD comparé aux contrôles. Il est important de préciser que la présence du VDR dans les noyaux des myocytes cardiaques a déjà été observée, ainsi qu'une induction de l'hypertrophie des cardiomyocytes (*in vivo* et *in vitro*) lorsque le ARNm *Vdr* est sur exprimé (S. Chen et al. 2008), ce qui est cohérent avec nos résultats. De plus nous avons observé des différences d'expression de transcrits codant des facteurs de transcriptions impliqués dans le développement du cœur (*i.e.* *Gata4*, *Myf2*, *Tbx5*), qui lorsqu'ils sont réprimés peuvent être associés à des altérations du développement cardiaque (McCulley and Black 2012; Liberatore, Searcy-Schrick, and Yutzey 2000). En complément, nous avons montré pour la première fois que la micronutrition maternelle pouvait affecter la structure de la chromatine. Pour cela nous avons effectué une immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps-anti VDR, afin d'étudier les loci préférentiellement ciblés par le VDR, notamment au niveau de la boucle chromatinienne (TAD) contenant les régions régulatrices des gènes *Tbx3* et *Tbx5*, laquelle est enrichie en CTCF (van Weerd et al. 2014) (**Figure 25**).

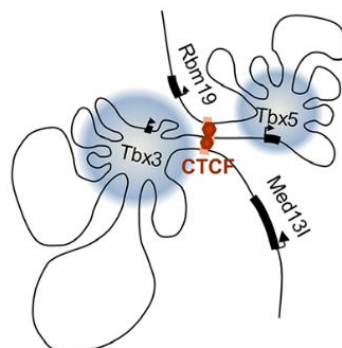


Figure 25 : Vue schématique des loci *Tbx3* et *Tbx5*, illustrant la séparation physique de ces deux régions régulatrices par des sites de liaison au CTCF. D'après (van Weerd et al. 2014)

Ainsi, nous avons mis en évidence que divers loci inclus dans ces deux sub-TADs présentaient une diminution significative de leur enrichissement en VDR dans les cœurs embryonnaires VDD par rapport aux contrôles. Afin d'étudier la topologie de cette région en fonction de la présence ou non du VDR nous allons réaliser des expérimentations de 3C-PCR. Notre hypothèse est qu'en l'absence de VDR, l'association entre CTCF et la cohésine maintenant la structure des deux sub-TADs (qui s'auto-inhibent) soit rompue, ce qui lèverait l'inhibition au niveau de ces régions permettant ainsi leur régulation transcriptionnelle. Cet état conformationnel est d'autant plus intéressant à étudier au niveau des sites de liaison au CTCF, puisque des modèles de KO-CTCF dans le cœur dans embryonnaire (E11.5) ont été associés à une létalité embryonnaire et à une désorganisation du septum interventriculaire et un épaississement des parois myocardiques (Gomez-Velazquez et al. 2017). Aussi, chez la souris adulte un KO-CTCF dans le cœur a été associé à de l'hypertrophie cardiaque (épaississement de la paroi ventriculaire gauche et hypertrophie des cardiomyocytes) et des altérations de la fonction cardiaque (diminution de la fraction de raccourcissement) conduisant à un arrêt cardiaque, démontrant ainsi l'importance du maintien de l'intégrité de la structure 3D de la chromatine sur le développement de pathologies cardiaques (Rosa-Garrido et al. 2017).

Enfin, nous avons montré que ces altérations phénotypiques et ces régulations de la structure chromatinienne chez les embryons VDD sont associées à des dysfonctions cardiaques, chez l'adulte. En effet, chez les animaux âgés de 2 mois issus de mères carencées en vitamine D, on a pu observer par échocardiographie un épaississement de la paroi ventriculaire gauche associé à une augmentation de la fraction de raccourcissement, en accord avec la littérature existante chez le rat adulte à 4 semaines (Gezmish et al. 2010). Plus tardivement, à 6 mois, les mâles VDD présentent une diminution significative de leur fraction de raccourcissement, cela traduisant ainsi d'une décompensation du ventricule gauche.

Lors de ces travaux nous nous sommes intéressés à un modèle de carence totale en vitamine D chez les souris femelles, ce choix s'est appuyé sur la littérature existante chez la souris et le rat pour lesquels un régime similaire était appliqué (Wen et al. 2018; Belenchia et al. 2017, 2018; Zhang et al. 2014; Nascimento et al. 2013; Gezmish et al. 2010). En première instance, il nous a semblé nécessaire d'étudier les effets métaboliques et cardiaques d'une carence totale périnatale, puisque la littérature existante à ce sujet est encore nouvelle et que peu d'observations permettaient de définir un phénotype chez la descendance, avec une approche longitudinale et sexe-dépendante. Bien que nous ayons évalué les taux circulants en 25(OH)D plasmatiques par une méthode de diagnostic *in vitro*, comme ce fut le cas dans d'autres études

(Wen et al. 2018; Belenchia et al. 2017, 2018), cette technique présente des limites. En effet, elle nous a permis d'affirmer que les taux circulants en 25(OH)D sont inférieurs au seuil de détection du kit, mais elle ne nous a pas permis de mesurer ces concentrations circulantes avec exactitude. Ainsi, il pourrait être intéressant d'évaluer les concentrations plasmatiques en 25(OH)D par chromatographie en phase liquide de haute performance (Zhang et al. 2014; Bonnet et al. 2019), mais également d'avoir une approche avec un régime graduellement déficient en vitamine D, en incluant plusieurs groupes de femelles. Cette approche permettrait de mimer les bornes permettant de définir la carence (< 25 nmol/L), la déficience (< 50 nmol/L) et l'insuffisance en vitamine D (< 75 nmol/L) chez l'Homme et d'observer quels effets biologiques cardio-métabolique chez la descendance leurs seraient associés. Les données issues de notre étude, en adéquation avec les données préexistantes, nous permettent désormais d'affirmer que la carence maternelle en vitamine D module le devenir cardio-métabolique de la descendance, notamment lorsque la descendance est challengée par un régime obésogène à l'âge adulte. Néanmoins définir les mécanismes impliqués dans l'apparition des phénotypes métaboliques nécessitera de nouvelles investigations. Nous avons entrepris d'expliquer leurs apparitions par le biais des concentrations plasmatiques en 17 β -oestradiol mais l'étude des mécanismes épigénétiques mis en jeu serait intéressante. Notamment en observant les gènes ciblés par le VDR par une approche de *ChIP-sequencing* comme nous l'avons entrepris dans la partie sur l'étude du cœur. De plus, afin d'observer l'apparition d'un phénotype cardiaque chez la descendance, nous avons étudié différents stades (E16.5, 2 mois, 6 mois) qui ont nécessité des sacrifices d'animaux. Il aurait pu être intéressant d'avoir une approche longitudinale par échocardiographie, avec des sondes permettant d'observer le cœur embryonnaire. Ainsi, il aurait été possible d'étudier les altérations fonctionnelles et morphologiques cardiaques, chez le même groupe d'animaux, depuis l'embryogenèse jusqu'à l'âge adulte et de définir le stade de la mise en place de ces altérations.

Ce travail de thèse confirme ainsi de l'importance de la micronutrition au sein du concept de DOHaD, au même titre que la macronutrition, face au risque de développer des maladies chroniques. Ces maladies représentent près de 60% des décès, c'est-à-dire 35 millions de morts par an, dont 80% dans les pays à faibles ou moyens revenus (Rial-Sebbag et al. 2016). De façon intéressante, nous faisons face à une réelle épidémie d'obésité (650 millions de personnes touchées d'après l'OMS) et à une très forte prévalence de déficience en vitamine D (Palacios and Gonzalez 2014; Cashman et al. 2016). Bien que le lien de causalité entre ces deux paramètres n'ait pas encore clairement été établi, ni le sens de cette causalité si elle existe, il est indéniable qu'une association forte est classiquement observée. D'après les statistiques en France, plus de femmes sont déficientes en vitamine D (49% < 50 nmoL/L) que

d'hommes (35,8% < 50nmol/L) (Vernay et al. 2011). Le pourcentage d'obésité est plus élevé chez les femmes de 18-39 ans (11,3%) que chez les hommes pour la même tranche d'âge (10,1%) (Verdot et al. 2017). Ainsi le genre semble être un facteur corrélé à la fois à la déficience en vitamine D et à l'obésité. De même, dans notre contexte de carence périnatale, nous avons mis en lumière que la réponse métabolique de la descendance était sexe-spécifique (**Article 1**). Il est intéressant de se questionner sur l'impact transgénérationnel de telles découvertes. Dans nos travaux, la carence maternelle (F0) promeut le phénotype obésogène (avec une augmentation de l'index d'adiposité) chez la descendance mâle (F1), ces traits phénotypiques pourrait être transmis à la génération suivante (F2) et possiblement associés à des taux inadéquats en vitamine D, puisqu'il a précédemment été établi que les personnes obèses présentaient des taux abaissés en vitamine D (Wortsman et al. 2000; Drincic et al. 2012; Wamberg et al. 2013). En ce qui concerne la descendance femelle (F1), on peut s'attendre à ce que des marques épigénétiques soient modifiées et potentiellement transmises à la génération suivante (Junien, Panchenko, Fneich, et al. 2016). De nouvelles évidences pourraient conforter cette hypothèse, tout d'abord, les marques d'histones semblent pouvoir être héritées stablement entre des générations F0 et F1 (Gaydos, Wang, and Strome 2014). Ensuite, ces marques d'histones peuvent induire un effet métabolique sexe-spécifique sur une génération F1, en lien avec une nutrition maternelle modifiée (Strakovsky et al. 2014). Cependant de telles études mécanistiques n'ont pas encore été entreprises entre les générations F1 femelle et F2. Néanmoins, il est important de souligner que, bien que les mécanismes mis en jeu entre la génération fille et petits enfants ne soient pas encore connus, la VDD maternelle peut induire une augmentation de l'index d'adiposité chez une génération F2 (Nascimento et al. 2013). Cela conforte l'idée que la micronutrition maternelle peut impacter plusieurs générations successives.

Nous avons également mis en évidence que la carence maternelle en vitamine D affecte le développement cardiaque fœtal, ce qui semble entraîner à long terme, de l'insuffisance cardiaque chez la descendance mâle à 6 mois associées à une réduction de la fraction de raccourcissement (**Résultat 2**). Des études ont déjà associé un faible statut en 25(OH)D et 1,25(OH)₂D avec une dysfonction myocardique, notamment une réduction de la fraction d'éjection, avec l'insuffisance cardiaque et la pathologie de l'arrêt cardiaque (Pilz et al. 2008; M. Wu et al. 2019). Il semblerait donc qu'un contexte périnatal maternel déficient en vitamine D ait des répercussions similaires à celles observées chez un individu déficient en vitamine D. Récemment une méta-analyse a relevé qu'une supplémentation en vitamine D (4000 UI/j) chez l'adulte atteint d'insuffisance cardiaque chronique, améliore la fonction ventriculaire (fraction d'éjection). D'autres études randomisées sont cependant nécessaires pour valider ces résultats (M. Wu et al. 2019).

Plus généralement, dans ce contexte où la santé maternelle semble impacter plusieurs générations, il serait intéressant de s'interroger sur une supplémentation systématique de la femme enceinte. Il semblerait que les recommandations actuelles en France (400 UI/j dans le dernier trimestre ou 100000 UI à 28 semaines) devraient être revues à la hausse avec des doses de 100000 UI par trimestre sur toute la grossesse (Ceccaldi et al. 2017). Néanmoins d'autres études sont nécessaires pour évaluer quelles valeurs assureraient un statut fœtal optimal en vitamine D, en adéquation avec une bonne santé cardio-métabolique à long terme.

Conclusion et Perspectives

Lors de ce travail de thèse nous avons établi que la carence maternelle en vitamine D, associée à une alimentation obésogène de la descendance, module l'homéostasie énergétique et le métabolisme du tissu adipeux, précocement et à long terme, chez la descendance de façon sexe-dépendante.

Afin de compléter le phénotype global observé chez nos animaux des expérimentations sur les cerveaux vont être menées. Nous avons déjà montré que les voies mélanocortinergiques impliquées dans le comportement alimentaire sont différentiellement régulées dans notre modèle. Des analyses par PCR-en temps réel des cerveaux (notamment de l'hypothalamus) de la descendance ont été entreprises et semblent indiquer une modulation de la neuro-inflammation chez les individus issus de mères carencées. Par la suite, des expérimentations de *RNA-sequencing* et histologiques ont été menées et les analyses sont encore en cours afin de confirmer le phénotype neuro-inflammatoire, pour établir une association claire avec la carence maternelle en vitamine D.

Par la suite, afin de compléter le phénotype métabolique mis en place suite à une carence maternelle en vitamine D associée à une alimentation obésogène à l'âge adulte, des expérimentations sur le foie et le tissu adipeux brun (BAT) sont prévues. Elles permettront dans un cas, d'étudier si des mécanismes inflammatoires sont mis en place chez les animaux VDD-HF comparés aux CTRL-HF et dans l'autre cas, d'observer le métabolisme énergétique et les profils transcriptomiques dans le BAT.

Au cours de ce doctorat, j'ai également pu entreprendre un protocole qui permettra d'étudier l'impact de la carence maternelle en vitamine D sur des nouveau-nés (à 4 jours *post-partum*). A ce stade de développement, la majorité du tissu adipeux, chez la souris, est composée de tissu adipeux interscapulaire, majoritairement brun. Sur ce modèle, des analyses transcriptomique et histologique du BAT sont prévues dans le cadre d'une thèse. L'objectif de cette étude est d'identifier des profils géniques particuliers, qui pourraient expliquer les différences métaboliques observées à l'âge adulte.

Une dernière cohorte d'animaux âgés de 8 semaines et issus de mère carencées ou non en vitamine D, a été mise en place afin d'étudier le métabolisme de la vitamine D dans différents tissus (adipeux blanc et brun, foie).

Concernant le développement cardiaque, nous avons pu observer que la carence maternelle en vitamine D était associée à de l'hypertrophie ventriculaire chez l'embryon, en lien avec des modulations transcriptomiques. Nous avons porté notre intérêt sur la boucle chromatinienne contenant *Tbx3* et *Tbx5*, laquelle semble notamment être différentiellement enrichie en VDR. Les prochaines expérimentations porteront sur la conformation chromatinienne au niveau de cette boucle, par la technique de 3C PCR, afin d'établir si la chromatine est ouverte ou fermée au niveau des loci ciblés par VDR. De telles modifications *in-utero*, pourraient ainsi expliquer les altérations morphologiques et fonctionnelles cardiaques observées par la suite chez la descendance mâle adulte. De plus, il serait intéressant d'étudier si de tels effets sont observés chez la descendance femelle adulte et de combiner également le modèle de carence maternelle en vitamine D à une alimentation obésogène chez l'adulte, puisque nous avons clairement établi que le phénotype métabolique était sexe-dépendant et potentialisé dans le cadre de l'obésité.

Références

- Abarca-Gómez, Leandra, Ziad A Abdeen, Zargar Abdul Hamid, Niveen M Abu-Rmeileh, Benjamin Acosta-Cazares, Cecilia Acuin, Robert J Adams, et al. 2017. "Worldwide Trends in Body-Mass Index, Underweight, Overweight, and Obesity from 1975 to 2016: A Pooled Analysis of 2416 Population-Based Measurement Studies in 128.9 Million Children, Adolescents, and Adults." *The Lancet* 390 (10113): 2627–42. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32129-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3).
- Aerts, Evi, Sigri Beckers, Doreen Zegers, Kim Van Hoorenbeeck, Guy Massa, An Verrijken, Stijn L. Verhulst, Luc F. Van Gaal, and Wim Van Hul. 2016. "CNV Analysis and Mutation Screening Indicate an Important Role for the NPY4R Gene in Human Obesity." *Obesity* 24 (4): 970–76. <https://doi.org/10.1002/oby.21435>.
- Agay-Shay, Keren, Michael Friger, Shai Linn, Ammatzia Peled, Yona Amitai, and Chava Peretz. 2013. "Air Pollution and Congenital Heart Defects." *Environmental Research* 124 (2): 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.03.005>.
- Ahmed, Abdalla, and Paul Delgado-Olguin. 2019. "Embryonic Programming of Heart Disease in Response to Obesity during Pregnancy." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.01.028>.
- Al-Rasheed, Nawal M., Nouf M. Al-Rasheed, Yeldez A. Bassiouni, Iman H. Hasan, Maha A. Al-Amin, Hanaa N. Al-Ajmi, and Raeesa A. Mohamad. 2015. "Vitamin D Attenuates Pro-Inflammatory TNF- α Cytokine Expression by Inhibiting NF-KB/P65 Signaling in Hypertrophied Rat Hearts." *Journal of Physiology and Biochemistry* 71 (2): 289–99. <https://doi.org/10.1007/s13105-015-0412-1>.
- Ameri, P., M. Canepa, Y. Milaneschi, P. Spallarossa, G. Leoncini, F. Giallauria, J. B. Strait, et al. 2013. "Relationship between Vitamin D Status and Left Ventricular Geometry in a Healthy Population: Results from the Baltimore Longitudinal Study of Aging." *Journal of Internal Medicine* 273 (3): 253–62. <https://doi.org/10.1111/joim.12007>.
- Assalin, Heloisa Balan, Bruna Paola Rafacho, Priscila Portugal dos Santos, Lidiane Paula Ardisson, Meliza Goi Roscani, Fernanda Chiuso-Minicucci, Luis Fernando Barbisan, et al. 2013. "Impact of the Length of Vitamin D Deficiency on Cardiac Remodeling." *Circulation: Heart Failure* 6 (4): 809–16. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.000298>.
- Audran, Maurice, and Karine Briot. 2010. "Critical Reappraisal of Vitamin D Deficiency." *Joint Bone Spine* 77 (2): 115–19. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2009.12.003>.
- Barker, David. 1986. "Infant Mortality, Childhood Nutrition, and Ischaemic Heart Disease in England and Wales." *The Lancet* 327 (8489): 1077–81. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673686913401>.
- Barnett, Phil, Malou van den Boogaard, and Vincent Christoffels. 2012. "Localized and Temporal Gene Regulation in Heart Development." In *Current Topics in Developmental Biology*, 100:171–201. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387786-4.00004-X>.

- Bastie, Claire C., Erin Gaffney-Stomberg, Ting-Wen A. Lee, Elena Dhima, Jeffrey E. Pessin, and Leonard H. Augenlicht. 2012. "Dietary Cholecalciferol and Calcium Levels in a Western-Style Defined Rodent Diet Alter Energy Metabolism and Inflammatory Responses in Mice." *The Journal of Nutrition* 142 (5): 859–65. <https://doi.org/10.3945/jn.111.149914>.
- Basu, Madhumita, Jun-Yi Zhu, Stephanie LaHaye, Uddalak Majumdar, Kai Jiao, Zhe Han, and Vidu Garg. 2017. "Epigenetic Mechanisms Underlying Maternal Diabetes-Associated Risk of Congenital Heart Disease." *JCI Insight* 2 (20): 1–20. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.95085>.
- Belenchia, Anthony M., Karen L. Jones, Matthew Will, David Q. Beversdorf, Victoria Vieira-Potter, Cheryl S. Rosenfeld, and Catherine A. Peterson. 2018. "Maternal Vitamin D Deficiency during Pregnancy Affects Expression of Adipogenic-Regulating Genes Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) and Vitamin D Receptor (VDR) in Lean Male Mice Offspring." *European Journal of Nutrition* 57 (2): 723–30. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1359-x>.
- Belenchia, Anthony M, Sarah A Johnson, Mark R Eilersieck, Cheryl S Rosenfeld, and Catherine A Peterson. 2017. "In Utero Vitamin D Deficiency Predisposes Offspring to Long-Term Adverse Adipose Tissue Effects." *Journal of Endocrinology* 234 (3): 301–13. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0015>.
- Bellsham-Revell, Hannah, and Michael Burch. 2018. "Congenital Heart Disease in Infancy and Childhood." *Medicine (United Kingdom)*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.08.004>.
- Bendik, Igor, Angelika Friedel, Franz F. Roos, Peter Weber, and Manfred Eggersdorfer. 2014. "Vitamin D: A Critical and Essential Micronutrient for Human Health." *Frontiers in Physiology* 5 JUL (July): 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00248>.
- Berg, Gerrit Van Den, and Manon Van Eijsden. 2013. "Suboptimal Maternal Vitamin D Status and Low Education Level as Determinants of Small-for-Gestational-Age Birth Weight," 273–79. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0327-3>.
- Bhat, Mehrajuddin, Ramesh Kalam, Syed SYH Qadri, Seshacharyulu Madabushi, and Ayesha Ismail. 2013. "Vitamin D Deficiency-Induced Muscle Wasting Occurs through the Ubiquitin Proteasome Pathway and Is Partially Corrected by Calcium in Male Rats." *Endocrinology* 154 (11): 4018–29. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1369>.
- Bhat, Mehrajuddin, Bindu Noolu, Syed Syh Qadri, and Ayesha Ismail. 2014. "Vitamin D Deficiency Decreases Adiposity in Rats and Causes Altered Expression of Uncoupling Proteins and Steroid Receptor Coactivator3." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 144 (PART B): 304–12. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.08.005>.
- Bikle, Daniel, Roger Bouillon, Ravi Thadhani, and Inez Schoenmakers. 2017. "Vitamin D Metabolites in Captivity? Should We Measure Free or Total 25(OH)D to Assess Vitamin D Status?" *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 173 (October): 105–16. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.01.007>.
- Bikle, Daniel, Elaine Gee, Bernard Halloran, Mary ann Kowalski, Elizabeth Ryzen, and John G. Haddad. 1986. "Assessment of the Free Fraction of 25-Hydroxyvitamin D in Serum and Its Regulation by Albumin and the Vitamin D-Binding Protein *." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 63 (4): 954–59. <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem-63-4-954>.
- Blue, Gillian M, Edwin P Kirk, Eleni Giannoulatou, Gary F Sholler, Sally L Dunwoodie, Richard P Harvey, and David

- S Winlaw. 2017. "Advances in the Genetics of Congenital Heart Disease." *Journal of the American College of Cardiology* 69 (7): 859–70. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.11.060>.
- Blumberg, Jeffrey M., Iphigenia Tzamelis, Inna Astapova, Francis S. Lam, Jeffrey S. Flier, and Anthony N. Hollenberg. 2006. "Complex Role of the Vitamin D Receptor and Its Ligand in Adipogenesis in 3T3-L1 Cells." *Journal of Biological Chemistry* 281 (16): 11205–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510343200>.
- Bonnet, Lauriane, Mohammed Amine Hachemi, Esma Karkeni, Charlene Couturier, Julien Astier, Catherine Defoort, Ljubica Svilar, Jean Charles Martin, Franck Tourniaire, and Jean François Landrier. 2019. "Diet Induced Obesity Modifies Vitamin D Metabolism and Adipose Tissue Storage in Mice." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 185 (May 2018): 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.07.006>.
- Bonnet, Lauriane, Esma Karkeni, Charlene Couturier, Julien Astier, Julie Dalifard, Catherine Defoort, Ljubica Svilar, Jean-Charles Martin, Franck Tourniaire, and Jean-François Landrier. 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 (2): 957–66. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00650>.
- Bonnet, Lauriane, Marielle Margier, Ljubica Svilar, Charlene Couturier, Emmanuelle Reboul, Jean-Charles Martin, Jean-François Landrier, and Catherine Defoort. 2019. "Simple Fast Quantification of Cholecalciferol, 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D in Adipose Tissue Using LC-HRMS/MS." *Nutrients* 11 (9): 1977. <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/9/1977>.
- Botton, Jérémie, Barbara Heude, Jean Maccario, Pierre Ducimetière, and Marie-Aline Charles. 2008. "Postnatal Weight and Height Growth Velocities at Different Ages between Birth and 5 y and Body Composition in Adolescent Boys and Girls." *The American Journal of Clinical Nutrition* 87 (6): 1760–68. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.6.1760>.
- Bouillon, Roger. 2016. "Free or Total 25OHD as Marker for Vitamin D Status?" *Journal of Bone and Mineral Research* 31 (6): 1124–27. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2871>.
- . 2017. "Comparative Analysis of Nutritional Guidelines for Vitamin D." *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.31>.
- Bouillon, Roger, Geert Carmeliet, Lieve Verlinden, Evelyne Van Etten, Annemieke Verstuyf, Hilary F. Luderer, Liesbet Lieben, Chantal Mathieu, and Marie Demay. 2008. "Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice." *Endocrine Reviews* 29 (6): 726–76. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0004>.
- Boyle, V. T., E. B. Thorstensen, J M D Thompson, L M E McCowan, E. A. Mitchell, K. M. Godfrey, L. Poston, et al. 2017. "The Relationship between Maternal 25-Hydroxyvitamin D Status in Pregnancy and Childhood Adiposity and Allergy: An Observational Study." *International Journal of Obesity* 41 (12): 1755–60. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.182>.
- Brade, Thomas, Luna S. Pane, Alessandra Moretti, Kenneth R. Chien, and K.-L. Laugwitz. 2013. "Embryonic Heart Progenitors and Cardiogenesis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3 (10): a013847–a013847. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013847>.
- Brown, LM, and DJ Clegg. 2010. "Central Effects of Estradiol in the Regulation of Food Intake, Body Weight, and Adiposity." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 122 (1–3): 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.12.005>.

- Bruneau, Benoit G, Georges Nemer, Joachim P Schmitt, Frédéric Charron, Lynda Robitaille, Sophie Caron, David A Conner, et al. 2001. "A Murine Model of Holt-Oram Syndrome Defines Roles of the T-Box Transcription Factor Tbx5 in Cardiogenesis and Disease." *Cell* 106 (6): 709–21. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00493-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00493-7).
- Burris, Heather H., Sheryl L. Rifas-Shiman, Carlos A. Camargo, Augusto A. Litonjua, Susanna Y. Huh, Janet W. Rich-Edwards, and Matthew W. Gillman. 2012. "Plasma 25-Hydroxyvitamin D during Pregnancy and Small-for-Gestational Age in Black and White Infants." *Annals of Epidemiology* 22 (8): 581–86. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2012.04.015>.
- Cai, Chen-leng, Xingqun Liang, Yunqing Shi, Po-hsien Chu, Samuel L Pfaff, Ju Chen, and Sylvia Evans. 2003. "Isl1 Identifies a Cardiac Progenitor Population That Proliferates Prior to Differentiation and Contributes a Majority of Cells to the Heart." *Developmental Cell* 5 (6): 877–89. [papers2://publication/uuid/BE3A0375-2122-4926-A0BA-1D68ED14CC7F](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2003.09.015).
- Campión, Javier, Fermin Milagro, and J. Alfredo Martínez. 2010. "Epigenetics and Obesity." In *Obesity*, 94:291–347. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375003-7.00011-X>.
- Cardwell, Glenn, Janet Bornman, Anthony James, and Lucinda Black. 2018. "A Review of Mushrooms as a Potential Source of Dietary Vitamin D." *Nutrients* 10 (10): 1498. <https://doi.org/10.3390/nu10101498>.
- Carlberg, Carsten. 2017. "Molecular Endocrinology of Vitamin D on the Epigenome Level." *Molecular and Cellular Endocrinology* 453 (September): 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.03.016>.
- Cashman, Kevin D, Kirsten G Dowling, Marcela Gonzalez-Gross, Jara Valtue, Stefaan De Henauw, Luis Moreno, Camilla T Damsgaard, et al. 2016. "Vitamin D Deficiency in Europe: Pandemic?" *American Journal of Clinical Nutrition*, no. C: 1–12. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.120873>.
- Ceccaldi, P.-F., H. Pejoan, N. Breau, D. Diallo, G. Ducarme, O. Poujade, C. Davitian, and D. Luton. 2017. "French Prenatal Vitamin D Recommended Supplementation: Enough or Not?" *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction* 46 (1): 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2016.02.009>.
- Chahal, Gulrez, Sonika Tyagi, and Mirana Ramialison. 2019. "Navigating the Non-Coding Genome in Heart Development and Congenital Heart Disease." *Differentiation*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.05.001>.
- Chanet, Audrey, Jérôme Salles, Christelle Guillet, Christophe Giraudet, Alexandre Berry, Véronique Patrac, Carla Domingues-Faria, et al. 2017. "Vitamin D Supplementation Restores the Blunted Muscle Protein Synthesis Response in Deficient Old Rats through an Impact on Ectopic Fat Deposition." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 46 (August): 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.02.024>.
- Charles, Marie-Aline, Cyrille Delpierre, and Bernadette Bréant. 2016. "Le Concept Des Origines Développementales de La Santé." *Médecine/Sciences* 32 (1): 15–20. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163201004>.
- Chavatte-Palmer, Pascale, Anne Tarrade, and Delphine Rousseau-Ralliard. 2016. "Diet before and during Pregnancy and Offspring Health: The Importance of Animal Models and What Can Be Learned from Them." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13 (6): 586. <https://doi.org/10.3390/ijerph13060586>.
- Chavatte-Palmer, Pascale, François Vialard, Anne Tarrade, Charlotte Dupont, Véronique Duranthon, and Rachel

- Lévy. 2016. "DOHaD et Programmation Pré- et Péri-Conceptionnelle." *Médecine/Sciences* 32 (1): 57–65. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163201010>.
- Chen, Jiaxuan, Maryam Doroudi, Jeffery Cheung, Ashley L. Grozier, Zvi Schwartz, and Barbara D. Boyan. 2013. "Plasma Membrane Pdia3 and VDR Interact to Elicit Rapid Responses to $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$." *Cellular Signalling* 25 (12): 2362–73. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.07.020>.
- Chen, Jiaxuan, Rene Olivares-Navarrete, Yun Wang, Tyler R. Herman, Barbara D. Boyan, and Zvi Schwartz. 2010. "Protein-Disulfide Isomerase-Associated 3 (Pdia3) Mediates the Membrane Response to $1,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ in Osteoblasts." *Journal of Biological Chemistry* 285 (47): 37041–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.157115>.
- Chen, Songcang, Denis J Glenn, Wei Ni, Christopher L Grigsby, Keith Olsen, Minobu Nishimoto, Christopher S Law, and David G Gardner. 2008. "Expression of the Vitamin D Receptor Is Increased in the Hypertrophic Heart." *Hypertension* 52 (6): 1106–12. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.119602>.
- Chen, Yao, Beibei Zhu, Xiaoyan Wu, Si Li, and Fangbiao Tao. 2017. "Association between Maternal Vitamin D Deficiency and Small for Gestational Age: Evidence from a Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies," 1–10. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-016404>.
- Ching, Stephen, Soumya Kashinkunti, Matthew D. Niehaus, and Glendon M. Zinser. 2011. "Mammary Adipocytes Bioactivate 25-Hydroxyvitamin D₃ and Signal via Vitamin D₃ Receptor, Modulating Mammary Epithelial Cell Growth." *Journal of Cellular Biochemistry* 112 (11): 3393–3405. <https://doi.org/10.1002/jcb.23273>.
- Chou, Hsin-Hsu, Meng-Jiun Chiou, Fu-Wen Liang, Lea-Hua Chen, Tsung-Hsueh Lu, and Chung-yi Li. 2016. "Association of Maternal Chronic Disease with Risk of Congenital Heart Disease in Offspring." *Canadian Medical Association Journal* 188 (17–18): E438–46. <https://doi.org/10.1503/cmaj.160061>.
- Christakos, Sylvia, Puneet Dhawan, Annemieke Verstuyf, Lieve Verlinden, and Geert Carmeliet. 2016. "Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects." *Physiological Reviews* 96 (1): 365–408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>.
- Cohen, Paul, and Bruce M. Spiegelman. 2016. "Cell Biology of Fat Storage." Edited by David G. Drubin. *Molecular Biology of the Cell* 27 (16): 2523–27. <https://doi.org/10.1091/mbc.e15-10-0749>.
- Crozier, Sarah R, Nicholas C Harvey, Hazel M Inskip, and Keith M Godfrey. 2012. "Maternal Vitamin D Status in Pregnancy Is Associated with Adiposity in the Offspring: Prospective Observational Study." *American Journal of Clinical Nutrition* 96 (1): 57–63. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.037473>.Maternal.
- Crozier, Sarah R, Hazel M Inskip, Keith M Godfrey, Cyrus Cooper, Nicolas C Harvey, and A Cole. 2010. "Weight Gain in Pregnancy and Childhood Body Composition: Findings from the Southampton Women's Survey 1–3," no. 6. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.29128>.The.
- Dahri, S., A. Snoeck, B. Reusens-Billen, C. Remacle, and J. J. Hote. 1991. "Islet Function in Offspring of Mothers on Low-Protein Diet During Gestation." *Diabetes* 40 (Supplement_2): 115–20. <https://doi.org/10.2337/diab.40.2.S115>.
- Daraki, V., T. Roumeliotaki, G. Chalkiadaki, M. Katrinaki, M. Karachaliou, V. Leventakou, M. Vafeiadi, et al. 2018. "Low Maternal Vitamin D Status in Pregnancy Increases the Risk of Childhood Obesity." *Pediatric Obesity* 13 (8): 467–75. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12267>.

- Delvin, E E, F H Glorieux, B L Salle, L David, and J P Varenne. 1982. "Control of Vitamin D Metabolism in Preterm Infants: Feto-Maternal Relationships." *Archives of Disease in Childhood* 57 (10): 754–57. <https://doi.org/10.1136/adc.57.10.754>.
- Desmarchelier, Charles, Marielle Margier, Damien Prévéraud, Marion Nowicki, Véronique Rosilio, Patrick Borel, and Emmanuelle Reboul. 2017. "Comparison of the Micellar Incorporation and the Intestinal Cell Uptake of Cholecalciferol, 25-Hydroxycholecalciferol and 1- α -Hydroxycholecalciferol." *Nutrients* 9 (10): 1152. <https://doi.org/10.3390/nu9101152>.
- Diesel, Jill C., Lisa M. Bodnar, Nancy L. Day, and Cynthia A. Larkby. 2016. "Childhood Maltreatment and the Risk of Pre-Pregnancy Obesity and Excessive Gestational Weight Gain." *Maternal & Child Nutrition* 12 (3): 558–68. <https://doi.org/10.1111/mcn.12147>.
- Dilli, Dilek, Nazan Neslihan Doğan, Utku Arman Örün, Murat Koç, Ayşegül Zenciroğlu, Selmin Karademir, and Hasan Akduman. 2018. "Maternal and Neonatal Micronutrient Levels in Newborns with CHD." *Cardiology in the Young* 28 (4): 523–29. <https://doi.org/10.1017/S1047951117002372>.
- Ding, Cherlyn, Dan Gao, John Wilding, Paul Trayhurn, and Chen Bing. 2012. "Vitamin D Signalling in Adipose Tissue." *British Journal of Nutrition* 108 (11): 1915–23. <https://doi.org/10.1017/S0007114512003285>.
- Doig, Craig L., Prashant K. Singh, Vineet K. Dhiman, James L. Thorne, Sebastiano Battaglia, Michelle Sobolewski, Orla Maguire, et al. 2013. "Recruitment of NCOR1 to VDR Target Genes Is Enhanced in Prostate Cancer Cells and Associates with Altered DNA Methylation Patterns." *Carcinogenesis* 34 (2): 248–56. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs331>.
- Domingues-Faria, Carla, Audrey Chanet, Jérôme Salles, Alexandre Berry, Christophe Giraudet, Véronique Patrac, Philippe Denis, et al. 2014. "Vitamin D Deficiency Down-Regulates Notch Pathway Contributing to Skeletal Muscle Atrophy in Old Wistar Rats." *Nutrition & Metabolism* 11 (1): 47. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-47>.
- Drincic, Andjela T., Laura A.G. Armas, Eileen E. Van Diest, and Robert P. Heaney. 2012. "Volumetric Dilution, Rather Than Sequestration Best Explains the Low Vitamin D Status of Obesity." *Obesity* 20 (7): 1444–48. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.404>.
- Druet, Céline, Nicolas Stettler, Stephen Sharp, Rebecca K. Simmons, Cyrus Cooper, George Davey Smith, Ulf Ekelund, et al. 2012. "Prediction of Childhood Obesity by Infancy Weight Gain: An Individual-Level Meta-Analysis." *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 26 (1): 19–26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3016.2011.01213.x>.
- Dupont, Charlotte, Laurent Kappeler, Sarah Saget, Valérie Grandjean, and Rachel Lévy. 2019. "Role of MiRNA in the Transmission of Metabolic Diseases Associated With Paternal Diet-Induced Obesity." *Frontiers in Genetics* 10 (APR). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00337>.
- Ebert, Margaret S., and Phillip A. Sharp. 2012. "Roles for MicroRNAs in Conferring Robustness to Biological Processes." *Cell* 149 (3): 515–24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.005>.
- El-Ganzoury, Mona M., Sahar A. El-Masry, Rania A. El-Farrash, Mona Anwar, and Rasha Z. Abd Ellatife. 2012. "Infants of Diabetic Mothers: Echocardiographic Measurements and Cord Blood IGF-I and IGFBP-1." *Pediatric Diabetes* 13 (2): 189–96. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2011.00811.x>.
- Epstein, Jonathan A. 2010. "Cardiac Development and Implications for Heart Disease." *New England Journal of*

- Medicine* 363 (17): 1638–47. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1003941>.
- Esteve Ràfols, Montserrat. 2014. "Adipose Tissue: Cell Heterogeneity and Functional Diversity." *Endocrinología y Nutrición (English Edition)* 61 (2): 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.endoen.2014.02.001>.
- Eyles, Darryl, and John McGrath. 2018. "Vitamin D Brain Development and Function." In *Vitamin D*, Fourth Edition, 1:563–81. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809965-0.00033-1>.
- Fan, Xiujuan, Subat Turdi, Stephen P. Ford, Yinan Hua, Mark J. Nijland, Meijun Zhu, Peter W. Nathanielsz, and Jun Ren. 2011. "Influence of Gestational Overfeeding on Cardiac Morphometry and Hypertrophic Protein Markers in Fetal Sheep." *Journal of Nutritional Biochemistry* 22 (1): 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.11.006>.
- Farhangi, Mahdiah Abbasalizad, Mehran Mesgari-Abbasi, Ghazaleh Hajilulian, Ghazaleh Nameni, and Parviz Shahabi. 2017. "Adipose Tissue Inflammation and Oxidative Stress: The Ameliorative Effects of Vitamin D." *Inflammation* 40 (5): 1688–97. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0610-9>.
- Fessele, Kristen L., and Fay Wright. 2018. "Primer in Genetics and Genomics, Article 6: Basics of Epigenetic Control." *Biological Research For Nursing* 20 (1): 103–10. <https://doi.org/10.1177/1099800417742967>.
- Fetahu, Irfete S., Julia Höbaus, and Eniko Kállay. 2014. "Vitamin D and the Epigenome." *Frontiers in Physiology* 5 APR (April): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00164>.
- Fève, Bruno. 2005. "Adipogenesis: Cellular and Molecular Aspects." *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.07.007>.
- Fitzsimmons, Samantha, and Anthony Salmon. 2018. "Congenital Heart Disease in Adults." *Medicine (United Kingdom)*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.08.005>.
- Flachs, Pavel, Martin Rossmeisl, Ondrej Kuda, and Jan Kopecky. 2013. "Stimulation of Mitochondrial Oxidative Capacity in White Fat Independent of UCP1: A Key to Lean Phenotype." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831 (5): 986–1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.02.003>.
- Foglia, Matthew J, and Kenneth D Poss. 2016. "Building and Re-Building the Heart by Cardiomyocyte Proliferation." *Development* 143 (5): 729–40. <https://doi.org/10.1242/dev.132910>.
- Fraga, Cristobal, Montserrat Blanco, Eva Vigo, Carmen Segura, Tomás García-Caballero, and Román Pérez-Fernández. 2002. "Ontogenesis of the Vitamin D Receptor in Rat Heart." *Histochemistry and Cell Biology* 117 (6): 547–50. <https://doi.org/10.1007/s00418-002-0413-3>.
- Fu, Baisheng, Hongwei Wang, Jinhua Wang, Ivana Barouhas, Wanqing Liu, Adam Shuboy, David A. Bushinsky, Dongsheng Zhou, and Murray J. Favus. 2013. "Epigenetic Regulation of BMP2 by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 through DNA Methylation and Histone Modification." Edited by Chunhong Yan. *PLoS ONE* 8 (4): e61423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061423>.
- Fu, Lin, Yuan-Hua Chen, Xue Chen, Shen Xu, Zhen Yu, and De-Xiang Xu. 2017. "Vitamin D Deficiency Impairs Neurobehavioral Development in Male Mice." *Physiology & Behavior* 179 (July): 333–39. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.07.017>.
- Fung, Alan, Cedric Manlhiot, Sapna Naik, Herschel Rosenberg, John Smythe, Jane Loughheed, Tapas Mondal, David Chitayat, Brian W. McCrindle, and Seema Mital. 2013. "Impact of Prenatal Risk Factors on Congenital Heart Disease in the Current Era." *Journal of the American Heart Association* 2 (3): 1–12.

<https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000064>.

- Gabory, Anne, and Luisa Dandolo. 2005. "Épigénétique et Développement: L'empreinte Parentale." *Médecine/Sciences* 21 (4): 390–95. <https://doi.org/10.1051/medsci/2005214390>.
- Gabory, Anne, Tessa J. Roseboom, Tom Moore, Lorna G. Moore, and Claudine Junien. 2013. "Placental Contribution to the Origins of Sexual Dimorphism in Health and Diseases: Sex Chromosomes and Epigenetics." *Biology of Sex Differences* 4 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-4-5>.
- Gangloff, A., J. Bergeron, E. Pelletier-Beaumont, J. A. Nazare, J. Smith, A. L. Borel, I. Lemieux, et al. 2015. "Effect of Adipose Tissue Volume Loss on Circulating 25-Hydroxyvitamin D Levels: Results from a 1-Year Lifestyle Intervention in Viscerally Obese Men." *International Journal of Obesity* 39 (11): 1638–43. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.118>.
- Gao, D., P. Trayhurn, and C. Bing. 2013. "1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Inhibits the Cytokine-Induced Secretion of MCP-1 and Reduces Monocyte Recruitment by Human Preadipocytes." *International Journal of Obesity* 37 (3): 357–65. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.53>.
- García-Patterson, A., L. Erdozain, G. Ginovart, J. M. Adelantado, J. M. Cubero, G. Gallo, A. de Leiva, and R. Corcoy. 2004. "In Human Gestational Diabetes Mellitus Congenital Malformations Are Related to Pre-Pregnancy Body Mass Index and to Severity of Diabetes." *Diabetologia* 47 (3): 509–14. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1337-3>.
- García, Olga P., Kurt Z. Long, and Jorge L. Rosado. 2009. "Impact of Micronutrient Deficiencies on Obesity." *Nutrition Reviews* 67 (10): 559–72. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00228.x>.
- Garofano, A., P. Czernichow, and B. Bréant. 1999. "Effect of Ageing on Beta-Cell Mass and Function in Rats Malnourished during the Perinatal Period." *Diabetologia* 42 (6): 711–18. <https://doi.org/10.1007/s001250051219>.
- Gaydos, L. J., W. Wang, and S. Strome. 2014. "H3K27me and PRC2 Transmit a Memory of Repression across Generations and during Development." *Science* 345 (6203): 1515–18. <https://doi.org/10.1126/science.1255023>.
- Gellert, Sandra, Alexander Ströhle, and Andreas Hahn. 2017. "Breastfeeding Women Are at Higher Risk of Vitamin D Deficiency than Non- Breastfeeding Women - Insights from the German VitaMinFemin Study," 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13006-017-0105-1>.
- Gernand, Alison D., Hyagriv N. Simhan, Mark A. Klebanoff, and Lisa M. Bodnar. 2013. "Maternal Serum 25-Hydroxyvitamin D and Measures of Newborn and Placental Weight in a U.S. Multicenter Cohort Study." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98 (1): 398–404. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3275>.
- Gezmish, Oksan, and Mary Jane Black. 2013. "Vitamin D Deficiency in Early Life and the Potential Programming of Cardiovascular Disease in Adulthood." *Journal of Cardiovascular Translational Research* 6 (4): 588–603. <https://doi.org/10.1007/s12265-013-9475-y>.
- Gezmish, Oksan, Marianne Tare, Helena C Parkington, Ruth Morley, Enzo R Porrello, Kristen J Bubb, and Mary Jane Black. 2010. "Maternal Vitamin D Deficiency Leads to Cardiac Hypertrophy in Rat Offspring." *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 17 (2): 168–76. <https://doi.org/10.1177/1933719109349536>.
- Giblin, Ryan J, Ellen J Bennett, Graeme R Zosky, and M Dwyer. 2017. "The Impact of Sex and 25 (OH) D

- Deficiency on Metabolic Function in Mice” 25. <https://doi.org/10.3390/nu9090985>.
- Gilbert-Diamond, Diane, Ana Baylin, Mercedes Mora-Plazas, Constanza Marin, Joanne E. Arsenault, Michael D. Hughes, Walter C. Willett, and Eduardo Villamor. 2010. “Vitamin D Deficiency and Anthropometric Indicators of Adiposity in School-Age Children: A Prospective Study.” *The American Journal of Clinical Nutrition* 92 (6): 1446–51. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29746>.
- Girgis, Christian M., Roderick J. Clifton-Bligh, Mark W. Hamrick, Michael F. Holick, and Jenny E. Gunton. 2013. “The Roles of Vitamin D in Skeletal Muscle: Form, Function, and Metabolism.” *Endocrine Reviews* 34 (1): 33–83. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1012>.
- Gomez-Velazquez, Melisa, Claudio Badia-Careaga, Ana Victoria Lechuga-Vieco, Rocio Nieto-Arellano, Juan J. Tena, Isabel Rollan, Alba Alvarez, et al. 2017. “CTCF Counter-Regulates Cardiomyocyte Development and Maturation Programs in the Embryonic Heart.” Edited by Gregory S. Barsh. *PLOS Genetics* 13 (8): e1006985. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006985>.
- Gong, Wei, Qianhong Liang, Dongming Zheng, Risheng Zhong, Yunjie Wen, and Xiaodan Wang. 2017. “Congenital Heart Defects of Fetus after Maternal Exposure to Organic and Inorganic Environmental Factors: A Cohort Study.” *Oncotarget* 8 (59): 100717–23. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20110>.
- Grün, Felix, and Bruce Blumberg. 2009. “Endocrine Disrupters as Obesogens.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 304 (1–2): 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.018>.
- Guelinckx, I., R. Devlieger, K. Beckers, and G. Vansant. 2008. “Maternal Obesity: Pregnancy Complications, Gestational Weight Gain and Nutrition.” *Obesity Reviews* 9 (2): 140–50. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2007.00464.x>.
- Hales, C N, D J Barker, P M Clark, L J Cox, C Fall, C Osmond, and P D Winter. 1991. “Fetal and Infant Growth and Impaired Glucose Tolerance at Age 64.” *BMJ* 303 (6809): 1019–22. <https://doi.org/10.1136/bmj.303.6809.1019>.
- Han, Yanchao, Anzhi Chen, Kfir-Baruch Umansky, Kelsey A. Oonk, Wen-Yee Choi, Amy L. Dickson, Jianhong Ou, et al. 2019. “Vitamin D Stimulates Cardiomyocyte Proliferation and Controls Organ Size and Regeneration in Zebrafish.” *Developmental Cell* 48 (6): 853-863.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.01.001>.
- Hannon, Tamara S. 2005. “Childhood Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus.” *PEDIATRICS* 116 (2): 473–80. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-2536>.
- Hansen, Anders S., Claudia Cattoglio, Xavier Darzacq, and Robert Tjian. 2018. “Recent Evidence That TADs and Chromatin Loops Are Dynamic Structures.” *Nucleus* 9 (1): 20–32. <https://doi.org/10.1080/19491034.2017.1389365>.
- Hanson, M. A., and P. D. Gluckman. 2014. “Early Developmental Conditioning of Later Health and Disease: Physiology or Pathophysiology?” *Physiological Reviews* 94 (4): 1027–76. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2013>.
- Haslberger, A., F. Varga, and H. Karlic. 2006. “Recursive Causality in Evolution: A Model for Epigenetic Mechanisms in Cancer Development.” *Medical Hypotheses* 67 (6): 1448–54. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.05.047>.
- Hawes, Jazmin E., Dijana Tesic, Andrew J. Whitehouse, Graeme R. Zosky, Jeremy T. Smith, and Caitlin S. Wyrwoll.

2015. "Maternal Vitamin D Deficiency Alters Fetal Brain Development in the BALB/c Mouse." *Behavioural Brain Research* 286 (June): 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.03.008>.
- Heaney, Robert P., Laura A. G. Armas, and Christine French. 2013. "All-Source Basal Vitamin D Inputs Are Greater Than Previously Thought and Cutaneous Inputs Are Smaller." *The Journal of Nutrition* 143 (5): 571–75. <https://doi.org/10.3945/jn.112.168641>.
- Heaney, Robert P., Ronald L. Horst, Diane M. Cullen, and Laura A.G. Armas. 2009. "Vitamin D 3 Distribution and Status in the Body." *Journal of the American College of Nutrition* 28 (3): 252–56. <https://doi.org/10.1080/07315724.2009.10719779>.
- Helle, Emmi I.T., Preston Biegley, Joshua W. Knowles, Joseph B. Leader, Sarah Pendergrass, Wei Yang, Gerald R. Reaven, Gary M. Shaw, Marylyn Ritchie, and James R. Priest. 2018. "First Trimester Plasma Glucose Values in Women without Diabetes Are Associated with Risk for Congenital Heart Disease in Offspring." *The Journal of Pediatrics* 195 (8): 275–78. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.10.046>.
- Herdick, Michaela, and Carsten Carlberg. 2000. "Agonist-Triggered Modulation of the Activated and Silent State of the Vitamin D3 Receptor by Interaction with Co-Repressors and Co-Activators." *Journal of Molecular Biology* 304 (5): 793–801. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4267>.
- Himbert, Caroline, Jennifer Ose, Mahmoud Delphan, and Cornelia M. Ulrich. 2017. "A Systematic Review of the Interrelation between Diet- and Surgery-Induced Weight Loss and Vitamin D Status." *Nutrition Research*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.12.004>.
- Hlaing, Su M., Leah A. Garcia, Jaime R. Contreras, Keith C. Norris, Monica G. Ferrini, and Jorge N. Artaza. 2014. "1,25-Vitamin D3 Promotes Cardiac Differentiation through Modulation of the WNT Signaling Pathway." *Journal of Molecular Endocrinology* 53 (3): 303–17. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0168>.
- Holick, Michael F. 2007. "Vitamin D Deficiency." *New England Journal of Medicine* 357 (3): 266–81. <https://doi.org/10.1056/NEJMra070553>.
- . 2011. "Vitamin D: A D-Lightful Solution for Health." *Journal of Investigative Medicine* 59 (6): 872–80. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e318214ea2d>.
- Holick, Michael F., Neil C. Binkley, Heike A. Bischoff-Ferrari, Catherine M. Gordon, David A. Hanley, Robert P. Heaney, M. Hassan Murad, and Connie M. Weaver. 2012. "Guidelines for Preventing and Treating Vitamin D Deficiency and Insufficiency Revisited." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97 (4): 1153–58. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2601>.
- Holick, Michael F., Tai C. Chen, Zhiren Lu, and Edward Sauter. 2007. "Vitamin D and Skin Physiology: A D-Lightful Story." *Journal of Bone and Mineral Research* 22 (S2): V28–33. <https://doi.org/10.1359/jbmr.07s211>.
- Holick, Michael F. 2006. "Resurrection of Vitamin D Deficiency and Rickets." *Journal of Clinical Investigation* 116 (8): 2062–72. <https://doi.org/10.1172/JCI29449>.
- . 2008. "Sunlight, UV-Radiation, Vitamin D and Skin Cancer: How Much Sunlight Do We Need?" In *Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer*, 1–15. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77574-6_1.
- . 2016. "Biological Effects of Sunlight, Ultraviolet Radiation, Visible Light, Infrared Radiation and Vitamin D for Health." *Anticancer Research* 36 (3): 1345–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26977036>.

- Hollis, Bruce W., William B. Pittard, and Timothy A. Reinhardt. 1986. "Relationships among Vitamin D, 25-Hydroxyvitamin D, and Vitamin D-Binding Protein Concentrations in the Plasma and Milk of Human Subjects*." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 62 (1): 41–44. <https://doi.org/10.1210/jcem-62-1-41>.
- Horan, Mary K, Ciara A MCGowan, Eileen R Gibney, Jean M Donnelly, and Fionnuala M McAuliffe. 2015. "The Association between Maternal Dietary Micronutrient Intake and Neonatal Anthropometry – Secondary Analysis from the ROLO Study." *Nutrition Journal*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0095-z>.
- Inserm. 2013. *Pesticides: Effets Sur La Santé. Synthèse et Recommandation*. Collection. Paris. <http://hdl.handle.net/10608/4821>.
- Jackson, Jennifer L., Suzanne E. Judd, Bhupesh Panwar, Virginia J. Howard, Virginia G. Wadley, Nancy S. Jenny, and Orlando M. Gutiérrez. 2016. "Associations of 25-Hydroxyvitamin D with Markers of Inflammation, Insulin Resistance and Obesity in Black and White Community-Dwelling Adults." *Journal of Clinical & Translational Endocrinology* 5 (September): 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.jcte.2016.06.002>.
- Jay, Patrick Y, Ehiol Akhirome, Rachel A Magnan, M Rebecca Zhang, Lillian Kang, Yidan Qin, Nelson Ugwu, Suk Dev Regmi, Julie M Noguee, and James M Cheverud. 2016. "Transgenerational Cardiology: One Way to a Baby's Heart Is through the Mother." *Molecular and Cellular Endocrinology* 435 (November): 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.029>.
- Jebeniani, Imen, Julia Leschik, and Michel Puceat. 2016a. "Epigenetic Regulation of Cardiac Differentiation of Embryonic Stem Cells and Tissues." *Journal of Visualized Experiments* 2016 (112): 1–7. <https://doi.org/10.3791/53874>.
- . 2016b. "Epigenetic Regulation of Cardiac Differentiation of Embryonic Stem Cells and Tissues." *Journal of Visualized Experiments* 2016 (112): 1–7. <https://doi.org/10.3791/53874>.
- Jones, K. S., S. Assar, D. Harnpanich, R. Bouillon, D. Lambrechts, A. Prentice, and I. Schoenmakers. 2014. "25(OH)D2 Half-Life Is Shorter Than 25(OH)D3 Half-Life and Is Influenced by DBP Concentration and Genotype." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99 (9): 3373–81. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1714>.
- Junien, Claudine. 2011. "Les Déterminants Précoces de La Santé et Des Maladies: Épigénétique et Environnement." *Bull. Acad. Natle Méd.* 195 (no3): 511–27. <http://www.academie-medecine.fr/les-determinants-precoces-de-la-sante-et-des-maladies-epigenetique-et-environnement/>.
- Junien, Claudine, Polina Panchenko, Sara Fneich, Luciano Pirola, Sabrina Chriett, Valérie Amarger, Bertrand Kaeffer, et al. 2016. "Épigénétique et Réponses Transgénérationnelles Aux Impacts de l'environnement." *Médecine/Sciences* 32 (1): 35–44. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163201007>.
- Junien, Claudine, Polina Panchenko, Luciano Pirola, Valérie Amarger, Bertrand Kaeffer, Patricia Parnet, Jérôme Torrisani, Francisco Bolaños Jimenez, Hélène Jammes, and Anne Gabory. 2016. "Le Nouveau Paradigme de l'origine Développementale de La Santé et Des Maladies (DOHaD)." *Médecine/Sciences* 32 (1): 27–34. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163201006>.
- Kamei, Y., T. Kawada, R. Kazuki, T. Ono, S. Kato, and E. Sugimoto. 1993. "Vitamin D Receptor Gene Expression Is Up-Regulated by 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 in 3T3-L1 Preadipocytes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 193 (3): 948–55. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1717>.

- Kandadi, Machender R., Yinan Hua, Meijun Zhu, Subat Turdi, Peter W. Nathanielsz, Stephen P. Ford, Sreejayan Nair, and Jun Ren. 2013. "Influence of Gestational Overfeeding on Myocardial Proinflammatory Mediators in Fetal Sheep Heart." *Journal of Nutritional Biochemistry* 24 (11): 1982–90. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.07.003>.
- Karkeni, Esmā, Lauriane Bonnet, Julie Marcotorchino, Franck Tourniaire, Julien Astier, Jianping Ye, and Jean François Landrier. 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 (2): 156–62. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1276681>.
- Karkeni, Esmā, Julie Marcotorchino, Franck Tourniaire, Julien Astier, Franck Peiretti, Patrice Darmon, and Jean-François Landrier. 2015. "Vitamin D Limits Chemokine Expression in Adipocytes and Macrophage Migration In Vitro and in Male Mice." *Endocrinology* 156 (5): 1782–93. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1647>.
- Karlic, Heidrun, and Franz Varga. 2011. "Impact of Vitamin D Metabolism on Clinical Epigenetics," 55–61. <https://doi.org/10.1007/s13148-011-0021-y>.
- Kelly, Robert G., Margaret E. Buckingham, and Antoon F. Moorman. 2014. "Heart Fields and Cardiac Morphogenesis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4 (10): a015750–a015750. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015750>.
- Kirby, Margaret Loewy. 2007. *Cardiac Development*. Oxford University Press. [http://the-eye.eu/public/Books/Medical/texts/Cardiac Development - M. Kirby %28Oxford%2C 2007%29 WW.pdf](http://the-eye.eu/public/Books/Medical/texts/Cardiac%20Development%20-%20M.%20Kirby%20-%20Oxford%20-%202007%20-%20WW.pdf).
- Kong, Juan, Yunzi Chen, Guojun Zhu, Qun Zhao, and Yan Chun Li. 2013. "1,25-Dihydroxyvitamin D3 Upregulates Leptin Expression in Mouse Adipose Tissue." *Journal of Endocrinology* 216 (2): 265–71. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0344>.
- Kong, Juan, and Yan Chun Li. 2006. "Molecular Mechanism of 1,25-Dihydroxyvitamin D 3 Inhibition of Adipogenesis in 3T3-L1 Cells." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 290 (5): E916–24. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00410.2005>.
- Korraa, Afaf, Mohamed Ezzat, Mahmoud Bastawy, Hassan Aly, Abdel-Azeem El-Mazary, and Lobna Abd El-Aziz. 2012. "Cardiac Troponin I Levels and Its Relation to Echocardiographic Findings in Infants of Diabetic Mothers." *Italian Journal of Pediatrics* 38 (1): 39. <https://doi.org/10.1186/1824-7288-38-39>.
- Koster, M. P.H., L. van Duijn, Y. H.M. Krul-Poel, J. S. Laven, W. A. Helbing, S. Simsek, and R. P.M. Steegers-Theunissen. 2018. "A Compromised Maternal Vitamin D Status Is Associated with Congenital Heart Defects in Offspring." *Early Human Development* 117 (December 2017): 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2017.12.011>.
- Koutkia, Polyxeni, Tai C. Chen, and Michael F. Holick. 2001. "Vitamin D Intoxication Associated with an Over-the-Counter Supplement." *New England Journal of Medicine* 345 (1): 66–67. <https://doi.org/10.1056/NEJM200107053450115>.
- Krieger, Nancy. 2005. "Embodiment: A Conceptual Glossary for Epidemiology." *Journal of Epidemiology & Community Health* 59 (5): 350–55. <https://doi.org/10.1136/jech.2004.024562>.
- Krishnaveni, Ghattu V., Sargoor R. Veena, Nicola R. Winder, Jacqueline C. Hill, Kate Noonan, Barbara J. Boucher, Samuel C. Karat, and Caroline H.D. Fall. 2011. "Maternal Vitamin D Status during Pregnancy and Body Composition and Cardiovascular Risk Markers in Indian Children: The Mysore Parthenon Study." *American*

- Journal of Clinical Nutrition* 93 (3): 628–35. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.003921>.
- Krotkiewski, M., P. Bjorntorp, L. Sjostrom, and U. Smith. 1983. "Impact of Obesity on Metabolism in Men and Women. Importance of Regional Adipose Tissue Distribution." *Journal of Clinical Investigation* 72 (3): 1150–62.
- Kusminski, Christine M., and Philipp E. Scherer. 2012. "Mitochondrial Dysfunction in White Adipose Tissue." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 23 (9): 435–43. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.004>.
- Kwon, Hye-Joo. 2016. "Vitamin D Receptor Signaling Is Required for Heart Development in Zebrafish Embryo." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.103>.
- Lafontan, Max, and Michel Berlan. 2003. "Do Regional Differences in Adipocyte Biology Provide New Pathophysiological Insights?" *Trends in Pharmacological Sciences* 24 (6): 276–83. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00132-9](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00132-9).
- Landrier, Jean-François. 2014. "Vitamine D : Sources, Métabolisme et Mécanismes d'action." *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 49 (6): 245–51. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2014.07.008>.
- Landrier, Jean-François, Esma Karkeni, Julie Marcotorchino, Lauriane Bonnet, and Franck Tourniaire. 2015. "Vitamin D Modulates Adipose Tissue Biology: Possible Consequences for Obesity?" *Proceedings of the Nutrition Society* 25 (March): 1–9. <https://doi.org/10.1017/S0029665115004164>.
- . 2016. "Vitamin D Modulates Adipose Tissue Biology: Possible Consequences for Obesity?" *Proceedings of the Nutrition Society* 75 (1): 38–46. <https://doi.org/10.1017/s0029665115004164>.
- Landrier, Jean-François, Julie Marcotorchino, and Franck Tourniaire. 2012. "Lipophilic Micronutrients and Adipose Tissue Biology." *Nutrients* 4 (11): 1622–49. <https://doi.org/10.3390/nu4111622>.
- Lee, Laura J., and Philip J. Lupo. 2013. "Maternal Smoking During Pregnancy and the Risk of Congenital Heart Defects in Offspring: A Systematic Review and Metaanalysis." *Pediatric Cardiology* 34 (2): 398–407. <https://doi.org/10.1007/s00246-012-0470-x>.
- Lehmann, Bodo, and Michael Meurer. 2010. "Vitamin D Metabolism." *Dermatologic Therapy* 23 (1): 2–12. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01286.x>.
- Lehmann, Ulrike, Frank Hirche, Gabriele I. Stangl, Katja Hinz, Sabine Westphal, and Jutta Dierkes. 2013. "Bioavailability of Vitamin D 2 and D 3 in Healthy Volunteers, a Randomized Placebo-Controlled Trial." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98 (11): 4339–45. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-4287>.
- Leonard, Stephanie A., Lucia C. Petito, David H. Rehkopf, Lorrene D. Ritchie, and Barbara Abrams. 2017. "Maternal History of Child Abuse and Obesity Risk in Offspring: Mediation by Weight in Pregnancy." *Childhood Obesity* 13 (4): 259–66. <https://doi.org/10.1089/chi.2017.0019>.
- Lescroart, Fabienne, Samira Chabab, Xionghui Lin, Steffen Rulands, Catherine Paulissen, Annie Rodolosse, Herbert Auer, et al. 2014. "Early Lineage Restriction in Temporally Distinct Populations of Mesp1 Progenitors during Mammalian Heart Development." *Nature Cell Biology* 16 (9): 829–40. <https://doi.org/10.1038/ncb3024>.
- Leu, Martin, Elisabeth Ehler, and Jean Claude Perriard. 2001. "Characterisation of Postnatal Growth of the Murine Heart." *Anatomy and Embryology* 204 (3): 217–24. <https://doi.org/10.1007/s004290100206>.
- Li, Jia, Mary E. Byrne, Eugene Chang, Yan Jiang, Shawn S. Donkin, Kimberly K. Buhman, John R. Burgess, and

- Dorothy Teegarden. 2008. "1 α ,25-Dihydroxyvitamin D Hydroxylase in Adipocytes." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 112 (1–3): 122–26. <https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2008.09.006>.
- Li, Qian, and David G. Gardner. 1994. "Negative Regulation of the Human Atrial Natriuretic Peptide Gene by 1,25-Dihydroxyvitamin D3." *Journal of Biological Chemistry* 269 (7): 4934–39.
- Liberatore, Christine M., Robin D. Searcy-Schrick, and Katherine E. Yutzey. 2000. "Ventricular Expression of Tbx5 Inhibits Normal Heart Chamber Development." *Developmental Biology* 223 (1): 169–80. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9748>.
- Lira, Fábio S., José C. Rosa, Claudio A. Cunha, Eliane B. Ribeiro, Claudia Oller do Nascimento, Lila M. Oyama, and João F. Mota. 2011. "Supplementing Alpha-Tocopherol (Vitamin E) and Vitamin D3 in High Fat Diet Decrease IL-6 Production in Murine Epididymal Adipose Tissue and 3T3-L1 Adipocytes Following LPS Stimulation." *Lipids in Health and Disease* 10 (1): 37. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-37>.
- Lisse, Thomas S., John S. Adams, and Martin Hewison. 2013. "Vitamin D and MicroRNAs in Bone." *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 23 (3): 195–214. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2013007147>.
- Liu, Xiaoqing, Zhiqiang Nie, Jimei Chen, Xiaoling Guo, Yanqiu Ou, Guanchun Chen, Jinzhuang Mai, et al. 2018. "Does Maternal Environmental Tobacco Smoke Interact with Social-Demographics and Environmental Factors on Congenital Heart Defects?" *Environmental Pollution* 234 (March): 214–22. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.023>.
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method." *Methods* 25 (4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lorente-Cebrián, Silvia, Anna Eriksson, Thomas Dunlop, Niklas Mejhert, Ingrid Dahlman, Gaby Åström, Eva Sjölin, et al. 2012. "Differential Effects of 1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol on MCP-1 and Adiponectin Production in Human White Adipocytes." *European Journal of Nutrition* 51 (3): 335–42. <https://doi.org/10.1007/s00394-011-0218-z>.
- Lucas, Alan, Ruth Morley, and Elizabeth Isaacs. 2009. "Nutrition and Mental Development." *Nutrition Reviews* 59 (8): S24–33. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2001.tb05499.x>.
- Lyons, Ian, Linda M. Parsons, Lynne Hartley, Ruili Li, Jane E. Andrews, Lorraine Robb, and Richard P. Harvey. 1995. "Myogenic and Morphogenetic Defects in the Heart Tubes of Murine Embryos Lacking the Homeo Box Gene Nkx2-5." *Genes & Development* 9 (13): 1654–66. <https://doi.org/10.1101/gad.9.13.1654>.
- Malloy, Peter J., and Brian J. Feldman. 2013. "Cell-Autonomous Regulation of Brown Fat Identity Gene UCP1 by Unliganded Vitamin D Receptor." *Molecular Endocrinology* 27 (10): 1632–42. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1037>.
- Manna, Prasenjit, and Sushil K. Jain. 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." *Journal of Biological Chemistry* 287 (50): 42324–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407833>.
- Marcotorchino, Julie, Erwan Gouranton, Beatrice Romier, Franck Tourniaire, Julien Astier, Christiane Malezet, Marie-Josèphe Amiot, and Jean-François Landrier. 2012. "Vitamin D Reduces the Inflammatory Response and Restores Glucose Uptake in Adipocytes." *Molecular Nutrition & Food Research* 56 (12): 1771–82. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200383>.

- Marcotorchino, Julie, Franck Tourniaire, Julien Astier, Esmâ Karkeni, Matthias Canault, Marie Joséphe Amiot, David Bendahan, et al. 2014. "Vitamin D Protects against Diet-Induced Obesity by Enhancing Fatty Acid Oxidation." *Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (10): 1077–83. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.05.010>.
- Mayhew, T. M., A. Pharaoh, A. Austin, and D. G. Fagan. 1997. "Stereological Estimates of Nuclear Number in Human Ventricular Cardiomyocytes before and after Birth Obtained Using Physical Disectors." *Journal of Anatomy* 191 (1): 107–15. <https://doi.org/10.1017/S0021878297002252>.
- McAllister, Emily J., Nikhil V. Dhurandhar, Scott W. Keith, Louis J. Aronne, Jamie Barger, Monica Baskin, Ruth M. Benca, et al. 2009. "Ten Putative Contributors to the Obesity Epidemic." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49 (10): 868–913. <https://doi.org/10.1080/10408390903372599>.
- McCance, D R, D. J. Pettitt, R. L. Hanson, L T H Jacobsson, W. C. Knowler, and P. H. Bennett. 1994. "Birth Weight and Non-Insulin Dependent Diabetes: Thrifty Genotype, Thrifty Phenotype, or Surviving Small Baby Genotype?" *BMJ* 308 (6934): 942–45. <https://doi.org/10.1136/bmj.308.6934.942>.
- McCollum, Elmer Verner. 1922. "Studies on Experimental Rickets." *The Journal of Biological Chemistry* LIII, No.2. <http://www.jbc.org/content/53/2/293.full.pdf>.
- McCulley, David J., and Brian L Black. 2012. "Transcription Factor Pathways and Congenital Heart Disease." In *Heart Development*, 100:253–77. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387786-4.00008-7>.
- McGill, Anne-Thea, Joanna M. Stewart, Fiona E. Lithander, Caroline M. Strik, and Sally D. Poppitt. 2008. "Relationships of Low Serum Vitamin D3 with Anthropometry and Markers of the Metabolic Syndrome and Diabetes in Overweight and Obesity." *Nutrition Journal* 7 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-7-4>.
- McGonigle, R.J.S., M.B. Fowler, A.B. Timmis, M.J. Weston, and V. Parsons. 1984. "Uremic Cardiomyopathy: Potential Role of Vitamin D and Parathyroid Hormone." *Nephron* 36 (2): 94–100. <https://doi.org/10.1159/000183125>.
- Meems, Laura M G, P van der Harst, W H van Gilst, and R a de Boer. 2011. "Vitamin D Biology in Heart Failure: Molecular Mechanisms and Systematic Review." *Current Drug Targets* 12 (1): 29–41. <https://doi.org/10.2174/138945011793591554>.
- Mellanby, Edward. 1976. "An Experimental Investigation on Rickets." *Nutrition Review* 34 (11): 338–40. <https://doi.org/10.2298/TSCI160601224K>.
- Metzger, Boyd E. 2007. "Long-Term Outcomes in Mothers Diagnosed With Gestational Diabetes Mellitus and Their Offspring." *Clinical Obstetrics and Gynecology* 50 (4): 972–79. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e31815a61d6>.
- Meyer, Mark B., and J. Wesley Pike. 2013. "Corepressors (NCoR and SMRT) as Well as Coactivators Are Recruited to Positively Regulated 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃-Responsive Genes." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 136 (1): 120–24. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.08.006>.
- Meyer, Mark B., Makoto Watanuki, Sungtae Kim, Nirupama K. Shevde, and J. Wesley Pike. 2006. "The Human Transient Receptor Potential Vanilloid Type 6 Distal Promoter Contains Multiple Vitamin D Receptor Binding Sites That Mediate Activation by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Intestinal Cells." *Molecular Endocrinology* 20 (6): 1447–61. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0031>.
- Miliku, Kozeta, Laura M E Blanken, Romy Gaillard, Vincent W V Jaddoe, Albert Hofman, Henning Tiemeier, Eric A

- P Steegers, et al. 2016. "Maternal Vitamin D Concentrations during Pregnancy, Fetal Growth Patterns, and Risks of Adverse Birth Outcomes." *American Journal of Clinical Nutrition* 103 (6): 1514–22. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.123752.1514>.
- Miliku, Kozeta, Janine F. Felix, Trudy Voortman, Henning Tiemeier, Darryl W. Eyles, Thomas H. Burne, John J. McGrath, and Vincent W.V. Jaddoe. 2018. "Associations of Maternal and Fetal Vitamin D Status with Childhood Body Composition and Cardiovascular Risk Factors." *Maternal and Child Nutrition*, no. January: 1–9. <https://doi.org/10.1111/mcn.12672>.
- Miller, Gregory E., Edith Chen, Alexandra K. Fok, Hope Walker, Alvin Lim, Erin F. Nicholls, Steve Cole, and Michael S. Kobor. 2009. "Low Early-Life Social Class Leaves a Biological Residue Manifested by Decreased Glucocorticoid and Increased Proinflammatory Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (34): 14716–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902971106>.
- Miquerol, Lucile, Sabrina Beyer, and Robert G. Kelly. 2011. "Establishment of the Mouse Ventricular Conduction System." *Cardiovascular Research*. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr069>.
- Miquerol, Lucile, and Robert G. Kelly. 2013. "Organogenesis of the Vertebrate Heart." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 2 (1): 17–29. <https://doi.org/10.1002/wdev.68>.
- Mirhosseini, Naghmeh, Hassanali Vatanparast, Mohsen Mazidi, and Samantha M. Kimball. 2017. "The Effect of Improved Serum 25-Hydroxyvitamin D Status on Glycemic Control in Diabetic Patients: A Meta-Analysis." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 102 (9): 3097–3110. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01024>.
- Moisan, Marie-Pierre, and Michel Le Moal. 2012. "Le Stress Dans Tous Ses États." *Médecine/Sciences* 28 (6–7): 612–17. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012286014>.
- Mokhtar, Wesam A., Amal Fawzy, Reem M. Allam, Rania M. Amer, and Mona S. Hamed. 2019. "Maternal Vitamin D Level and Vitamin D Receptor Gene Polymorphism as a Risk Factor for Congenital Heart Diseases in Offspring; An Egyptian Case-Control Study." *Genes & Diseases* 6 (2): 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.08.001>.
- Morales, Eva, Jordi Julvez, Maties Torrent, Ferran Ballester, Clara L. Rodríguez-Bernal, Ainara Andiaarena, Oscar Vegas, et al. 2015. "Vitamin D in Pregnancy and Attention Deficit Hyperactivity Disorder-like Symptoms in Childhood." *Epidemiology* 26 (4): 458–65. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000292>.
- Morales, Eva, A Rodriguez, D Valvi, C Iñiguez, A Esplugues, J Vioque, L S Marina, et al. 2015. "Deficit of Vitamin D in Pregnancy and Growth and Overweight in the Offspring." *International Journal of Obesity* 39 (1): 61–68. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.165>.
- Morris, G, Q Zhou, M Hegsted, and M Keenan. 1995. "Maternal Consumption of a Low Vitamin D Diet Retards Metabolic and Contractile Development in the Neonatal Rat Heart." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27 (6): 1245–50. [https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(05\)82386-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(05)82386-7).
- Mutt, Shivaprakash J., Elina Hyppönen, Juha Saarnio, Marjo-Riitta Järvelin, and Karl-Heinz Herzig. 2014. "Vitamin D and Adipose Tissue-More than Storage." *Frontiers in Physiology* 5 (June): 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00228>.
- Mutt, Shivaprakash J., Toni Karhu, Siri Lehtonen, Petri Lehenkari, Carsten Carlberg, Juha Saarnio, Sylvain Sebert, Elina Hyppönen, Marjo-Ritta Järvelin, and Karl-Heinz Herzig. 2012. "Inhibition of Cytokine Secretion from

- Adipocytes by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ via the NF-KB Pathway." *The FASEB Journal* 26 (11): 4400–4407. <https://doi.org/10.1096/fj.12-210880>.
- Nagl, Michaela, Jana Steinig, Grit Klinitzke, Holger Stepan, and Anette Kersting. 2016. "Childhood Maltreatment and Pre-Pregnancy Obesity: A Comparison of Obese, Overweight, and Normal Weight Pregnant Women." *Archives of Women's Mental Health* 19 (2): 355–65. <https://doi.org/10.1007/s00737-015-0573-5>.
- Nandi, Shyam Sundar, and Paras Kumar Mishra. 2015. "Harnessing Fetal and Adult Genetic Reprogramming for Therapy of Heart Disease." *Journal of Nature and Science* 1 (4). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25879081><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4394627>.
- Narvaez, Carmen J., Donald Matthews, Emily Broun, Michelle Chan, and Joellen Welsh. 2009. "Lean Phenotype and Resistance to Diet-Induced Obesity in Vitamin D Receptor Knockout Mice Correlates with Induction of Uncoupling Protein-1 in White Adipose Tissue." *Endocrinology* 150 (2): 651–61. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1118>.
- Narvaez, Carmen J., K. M. Simmons, J. Brunton, A. Salinero, S. V. Chittur, and J. E. Welsh. 2013. "Induction of STEAP4 Correlates with 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Stimulation of Adipogenesis in Mesenchymal Progenitor Cells Derived from Human Adipose Tissue." *Journal of Cellular Physiology* 228 (10): 2024–36. <https://doi.org/10.1002/jcp.24371>.
- Nascimento, Fernanda A. M., Thais C. Ceciliano, Marcia B. Aguila, and Carlos A. Mandarim-de-lacerda. 2013. "Transgenerational Effects on the Liver and Pancreas Resulting from Maternal Vitamin D Restriction in Mice." *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 59 (5): 367–74. <http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/jnsv/59.367?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>.
- Nemere, Ilka, Natalio Garbi, Gunter J. Hämmerling, and Ramesh C. Khanal. 2010. "Intestinal Cell Calcium Uptake and the Targeted Knockout of the 1,25D₃-MARRS (Membrane-Associated, Rapid Response Steroid-Binding) Receptor/PDIA3/Erp57." *Journal of Biological Chemistry* 285 (41): 31859–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.116954>.
- Nicholas, L. M., J. L. Morrison, L. Rattanaray, S. Zhang, S. E. Ozanne, and I. C. McMillen. 2016. "The Early Origins of Obesity and Insulin Resistance: Timing, Programming and Mechanisms." *International Journal of Obesity* 40 (2): 229–38. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.178>.
- Nimitphong, Hataikarn, Michael F. Holick, Susan K. Fried, and Mi Jeong Lee. 2012. "25-Hydroxyvitamin D₃ and 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Promote the Differentiation of Human Subcutaneous Preadipocytes." *PLoS ONE* 7 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052171>.
- Noseda, Michela, Tessa Peterkin, Filipa C. Simões, Roger Patient, and Michael D. Schneider. 2011. "Cardioprotective Factors." *Circulation Research* 108 (1): 129–52. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223792>.
- Oleröd, Göran, Lillemor Mattsson Hultén, Ola Hammarsten, and Eva Klingberg. 2017. "The Variation in Free 25-Hydroxy Vitamin D and Vitamin D-Binding Protein with Season and Vitamin D Status." *Endocrine Connections* 6 (2): 111–20. <https://doi.org/10.1530/EC-16-0078>.
- Oliveri, B., S. R. Mastaglia, G. M. Brito, M. Seijo, G. A. Keller, J. Somoza, R. A. Diez, and G. Di Girolamo. 2015. "Vitamin D₃ Seems More Appropriate than D₂ to Sustain Adequate Levels of 25OHD: A Pharmacokinetic Approach." *European Journal of Clinical Nutrition* 69 (6): 697–702. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2015.16>.

- Ou, Yanqiu, Michael S. Bloom, Zhiqiang Nie, Fengzhen Han, Jinzhuang Mai, Jimei Chen, Shao Lin, Xiaoqing Liu, and Jian Zhuang. 2017. "Associations between Toxic and Essential Trace Elements in Maternal Blood and Fetal Congenital Heart Defects." *Environment International* 106 (December 2016): 127–34. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.05.017>.
- Ouchi, Noriyuki, Jennifer L. Parker, Jesse J. Lugus, and Kenneth Walsh. 2011. "Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease." *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2921>.
- Ovesen, Lars, Christine Brot, and Jette Jakobsen. 2003. "Food Contents and Biological Activity of 25-Hydroxyvitamin D: A Vitamin D Metabolite to Be Reckoned With?" *Annals of Nutrition and Metabolism* 47 (3–4): 107–13. <https://doi.org/10.1159/000070031>.
- Palacios, Cristina, and Lilliana Gonzalez. 2014. "Is Vitamin D Deficiency a Major Global Public Health Problem?" *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 144 Pt A (787): 138–45. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.11.003>.
- Panel, Efsa, and Allergies Nda. 2013. "Scientific Opinion on Nutrient Requirements and Dietary Intakes of Infants and Young Children in the European Union." *EFSA Journal* 11 (10): 1–103. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3408>.
- Pasupuleti, Vinay, Edward Mezones-holguin, Vicente A Benites-zapata, Priyaleela Thota, Abhishek Deshpande, and Adrian V Hernandez. 2015. "Effect of Vitamin D Supplementation during Pregnancy on Maternal and Neonatal Outcomes : A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials" 103 (5). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.02.019>.
- Peng, Xuyan, Guohui Shang, Wenqing Wang, Xiaowen Chen, Qiyong Lou, Gang Zhai, Dongliang Li, et al. 2017. "Fatty Acid Oxidation in Zebrafish Adipose Tissue Is Promoted by 1 α ,25(OH) 2 D 3." *Cell Reports* 19 (7): 1444–55. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.066>.
- Pereira, Fábio, Antonio Barbáchano, Prashant K. Singh, Moray J. Campbell, Alberto Muñoz, and María Jesús Larriba. 2012. "Vitamin D Has Wide Regulatory Effects on Histone Demethylase Genes." *Cell Cycle* 11 (6): 1081–89. <https://doi.org/10.4161/cc.11.6.19508>.
- Pike, J. Wesley. 2011. "Genome-Wide Principles of Gene Regulation by the Vitamin D Receptor and Its Activating Ligand." *Molecular and Cellular Endocrinology* 347 (1–2): 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.05.012>.
- Pilz, Stefan, Winfried März, Britta Wellnitz, Ursula Seelhorst, Astrid Fahrleitner-Pammer, Hans P. Dimai, Bernhard O. Boehm, and Harald Dobnig. 2008. "Association of Vitamin D Deficiency with Heart Failure and Sudden Cardiac Death in a Large Cross-Sectional Study of Patients Referred for Coronary Angiography." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93 (10): 3927–35. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0784>.
- Querfeld, Uwe, Michael M. Hoffmann, GÜNTER Klaus, Frank Eifinger, Marion Ackerschott, Dietrich Michalk, and Philip A. Kern. 1999. "Antagonistic Effects of Vitamin D and Parathyroid Hormone on Lipoprotein Lipase in Cultured Adipocytes." *Journal of the American Society of Nephrology* 10 (10): 2158–64.
- Rahman, Ayesha, Stephen Hershey, Salahuddin Ahmed, Karl Nibbelink, and Robert U. Simpson. 2007. "Heart Extracellular Matrix Gene Expression Profile in the Vitamin D Receptor Knockout Mice." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 103 (3–5): 416–19. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.12.081>.
- Ranchod, Yamini K., Irene E. Headen, Lucia C. Petito, Julianna K. Deardorff, David H. Rehkopf, and Barbara F. Abrams. 2016. "Maternal Childhood Adversity, Prepregnancy Obesity, and Gestational Weight Gain."

- American Journal of Preventive Medicine* 50 (4): 463–69. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2015.08.032>.
- Reboul, Emmanuelle, Aurélie Goncalves, Christine Comera, Romain Bott, Marion Nowicki, Jean-François Landrier, Dominique Jourdeuil-Rahmani, Claire Dufour, Xavier Collet, and Patrick Borel. 2011. “Vitamin D Intestinal Absorption Is Not a Simple Passive Diffusion: Evidences for Involvement of Cholesterol Transporters.” *Molecular Nutrition & Food Research* 55 (5): 691–702. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000553>.
- Reddy Vanga, Subba, Mathew Good, Patricia a Howard, and James L Vacek. 2010. “Role of Vitamin D in Cardiovascular Health.” *The American Journal of Cardiology* 106 (6): 798–805. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2010.04.042>.
- Reichetzeder, Christoph, Hong Chen, Michael Föller, Torsten Slowinski, Jian Li, You-peng Chen, Florian Lang, and Berthold Hocher. 2014. “Maternal Vitamin D Deficiency and Fetal Programming - Lessons Learned from Humans and Mice.” *Kidney and Blood Pressure Research* 39 (4): 315–29. <https://doi.org/10.1159/000355809>.
- Reinisch, J., N. Simon, W. Karow, and Ronald Gandelman. 1978. “Prenatal Exposure to Prednisone in Humans and Animals Retards Intrauterine Growth.” *Science* 202 (4366): 436–38. <https://doi.org/10.1126/science.705336>.
- Rial-Sebbag, Emmanuelle, Caroline Guibet Lafaye, Umberto Simeoni, and Claudine Junien. 2016. “DOHaD et Information Épigenétique.” *Medecine/Sciences* 32 (1): 100–105. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163201016>.
- Riant, Elodie, Aurélie Waget, Haude Cogo, Jean-François Arnal, Rémy Burcelin, and Pierre Gourdy. 2009. “Estrogens Protect against High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Glucose Intolerance in Mice.” *Endocrinology* 150 (5): 2109–17. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0971>.
- Rickert-Sperling, Silke, Robert G. Kelly, and David J. Driscoll. 2016. *Congenital Heart Diseases: The Broken Heart*. Edited by Silke Rickert-Sperling, Robert G. Kelly, and David J. Driscoll. *Congenital Heart Diseases: The Broken Heart: Clinical Features, Human Genetics and Molecular Pathways*. Vienna: Springer Vienna. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1883-2>.
- Rincel, Marion, Amandine Lépinay, Anne Gabory, Vassilia Théodorou, Muriel Koehl, Valérie Daugé, Stefania Maccari, and Muriel Darnaudéry. 2016. “Environnement Précoce et Vulnérabilité Neuropsychiatrique.” *Médecine/Sciences* 32 (1): 93–99. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163201015>.
- Roberts, Andrea L., Sandro Galea, S. Bryn Austin, Heather L. Corliss, Michelle A. Williams, and Karestan C. Koenen. 2014. “Women’s Experience of Abuse in Childhood and Their Children’s Smoking and Overweight.” *American Journal of Preventive Medicine* 46 (3): 249–58. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2013.11.012>.
- Rochel, Natacha, and Ferdinand Molnár. 2017. “Structural Aspects of Vitamin D Endocrinology.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 453 (September): 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.046>.
- Rosa-Garrido, Manuel, Douglas J. Chapski, Anthony D. Schmitt, Todd H. Kimball, Elaheh Karbassi, Emma Monte, Enrique Balderas, et al. 2017. “High-Resolution Mapping of Chromatin Conformation in Cardiac Myocytes Reveals Structural Remodeling of the Epigenome in Heart Failure.” *Circulation* 136 (17): 1613–25. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029430>.
- Roseboom, Tessa, Susanne de Rooij, and Rebecca Painter. 2006. “The Dutch Famine and Its Long-Term Consequences for Adult Health.” *Early Human Development* 82 (8): 485–91. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2006.07.001>.

- Rosen, Evan D., and Bruce M. Spiegelman. 2006. "Adipocytes as Regulators of Energy Balance and Glucose Homeostasis." *Nature* 444 (7121): 847–53. <https://doi.org/10.1038/nature05483>.
- Salehpour, Amin, Farhad Hosseinpanah, Farzad Shidfar, Mohammadreza Vafa, Maryam Razaghi, Sahar Dehghani, Anahita Hoshiarrad, and Mahmoodreza Gohari. 2012. "A 12-Week Double-Blind Randomized Clinical Trial of Vitamin D3supplementation on Body Fat Mass in Healthy Overweight and Obese Women." Edited by Leah Coles. *Nutrition Journal* 11 (1): 78. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-11-78>.
- Saliba, Aline, Ana Carolina Vaquero Figueiredo, José Eduardo Baroneza, Jorge Yuseff Afiune, Aline Pic-Taylor, Silviene Fabiana Oliveira, and Juliana F. Mazzeu. 2019. "Genetic and Genomics in Congenital Heart Disease: A Clinical Review." *Jornal de Pediatria*, August. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2019.07.004>.
- Samsa, Leigh Ann, Betsy Yang, and Jiandong Liu. 2013. "Embryonic Cardiac Chamber Maturation: Trabeculation, Conduction, and Cardiomyocyte Proliferation." *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 163 (3): 157–68. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31366>.
- Saraf, Rajneeta, Susan M.B. Morton, Carlos A Camargo, and Cameron C Grant. 2016. "Global Summary of Maternal and Newborn Vitamin D Status - a Systematic Review." *Maternal & Child Nutrition* 12 (4): 647–68. <https://doi.org/10.1111/mcn.12210>.
- Schleich, Jean-Marc, Tariq Abdulla, Ron Summers, and Lucile Houyel. 2013. "An Overview of Cardiac Morphogenesis." *Archives of Cardiovascular Diseases* 106 (11): 612–23. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2013.07.001>.
- Schmid, Alexandra, and Barbara Walther. 2013. "Natural Vitamin D Content in Animal Products." *Advances in Nutrition* 4 (4): 453–62. <https://doi.org/10.3945/an.113.003780>.
- Scholl, Theresa O., Xinhua Chen, and T. Peter Stein. 2013. "Vitamin D, Secondary Hyperparathyroidism, and Preeclampsia." *American Journal of Clinical Nutrition* 98 (3): 787–93. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.055871>.
- Seamans, Kelly M, and Kevin D Cashman. 2009. "Existing and Potentially Novel Functional Markers of Vitamin D Status: A Systematic Review." *The American Journal of Clinical Nutrition* 89 (6): 1997S–2008S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27230D>.
- Sedmera, David, Tomas Pexieder, Mauricette Vuillemin, Robert P. Thompson, and Robert H. Anderson. 2000. "Developmental Patterning of the Myocardium." *Anatomical Record* 258 (4): 319–37. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(20000401\)258:4<319::AID-AR1>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(20000401)258:4<319::AID-AR1>3.0.CO;2-O).
- Sedmera, David, and Robert P. Thompson. 2011. "Myocyte Proliferation in the Developing Heart." *Developmental Dynamics* 240 (6): 1322–34. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22650>.
- Seida, Jennifer C., Joanna Mitri, Isabelle N. Colmers, Sumit R. Majumdar, Mayer B. Davidson, Alun L. Edwards, David A. Hanley, Anastassios G. Pittas, Lisa Tjosvold, and Jeffrey A. Johnson. 2014. "Effect of Vitamin D 3 Supplementation on Improving Glucose Homeostasis and Preventing Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99 (10): 3551–60. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2136>.
- Seker, Taner, Mustafa Gur, Hakan Ucar, Caner Turkoglu, Ahmet Oytun Baykan, Betül Özaltun, Hazar Harbalioglu, et al. 2015. "Lower Serum 25-Hydroxyvitamin D Level Is Associated with Impaired Myocardial Performance and Left Ventricle Hypertrophy in Newly Diagnosed Hypertensive Patients." *The Anatolian Journal of*

Cardiology 15 (9): 744–50. <https://doi.org/10.5152/akd.2014.5637>.

- Sergeev, Igor N., and Qingming Song. 2014. "High Vitamin D and Calcium Intakes Reduce Diet-Induced Obesity in Mice by Increasing Adipose Tissue Apoptosis." *Molecular Nutrition & Food Research* 58 (6): 1342–48. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300503>.
- Shi, Hongjun, Victoria C. O'Reilly, Julie L. M. Moreau, Therese R. Bewes, Michelle X. Yam, Bogdan E. Chapman, Stuart M. Grieve, et al. 2016. "Gestational Stress Induces the Unfolded Protein Response, Resulting in Heart Defects." *Development* 143 (14): 2561–72. <https://doi.org/10.1242/dev.136820>.
- Silvagno, Francesca, and Gianpiero Pescarmona. 2017. "Spotlight on Vitamin D Receptor, Lipid Metabolism and Mitochondria: Some Preliminary Emerging Issues." *Molecular and Cellular Endocrinology* 450 (July): 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.013>.
- Simmons, R. A., L. J. Templeton, and S. J. Gertz. 2001. "Intrauterine Growth Retardation Leads to the Development of Type 2 Diabetes in the Rat." *Diabetes* 50 (10): 2279–86. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.10.2279>.
- Snoeck, Anne, Claude Remacle, Brigitte Reusens, and Joseph J. Hoet. 1990. "Effect of a Low Protein Diet during Pregnancy on the Fetal Rat Endocrine Pancreas." *Neonatology* 57 (2): 107–18. <https://doi.org/10.1159/000243170>.
- Soares, M. J., L. L. Murhadi, A. V. Kurpad, W. L. Chan She Ping-Delfos, and L. S. Piers. 2012. "Mechanistic Roles for Calcium and Vitamin D in the Regulation of Body Weight." *Obesity Reviews* 13 (7): 592–605. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2012.00986.x>.
- Spalding, Kirsty L., Erik Arner, Pål O. Westermark, Samuel Bernard, Bruce A. Buchholz, Olaf Bergmann, Lennart Blomqvist, et al. 2008. "Dynamics of Fat Cell Turnover in Humans." *Nature* 453 (7196): 783–87. <https://doi.org/10.1038/nature06902>.
- Später, Daniela, Emil M. Hansson, Lior Zangi, and Kenneth R. Chien. 2014. "How to Make a Cardiomyocyte." *Development (Cambridge)* 141 (23): 4418–31. <https://doi.org/10.1242/dev.091538>.
- Stettler, N., B. S. Zemel, S. Kumanyika, and V. A. Stallings. 2002. "Infant Weight Gain and Childhood Overweight Status in a Multicenter, Cohort Study." *PEDIATRICS* 109 (2): 194–99. <https://doi.org/10.1542/peds.109.2.194>.
- Strakovsky, Rita S., Xiyuan Zhang, Dan Zhou, and Yuan-Xiang Pan. 2014. "The Regulation of Hepatic Pon1 by a Maternal High-Fat Diet Is Gender Specific and May Occur through Promoter Histone Modifications in Neonatal Rats." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (2): 170–76. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.016>.
- Stringhini, Silvia, G. David Batty, Pascal Bovet, Martin J. Shipley, Michael G. Marmot, Meena Kumari, Adam G. Tabak, and Mika Kivimäki. 2013. "Association of Lifecourse Socioeconomic Status with Chronic Inflammation and Type 2 Diabetes Risk: The Whitehall II Prospective Cohort Study." Edited by Ronald C. W. Ma. *PLoS Medicine* 10 (7): e1001479. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001479>.
- Sun, RongRong, Min Liu, Lei Lu, Yi Zheng, and Peiyong Zhang. 2015. "Congenital Heart Disease: Causes, Diagnosis, Symptoms, and Treatments." *Cell Biochemistry and Biophysics* 72 (3): 857–60. <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0551-6>.
- Tanaka, Makoto, Zhi Chen, Sonia Bartunkova, Naohito Yamasaki, and Seigo Izumo. 1999. "The Cardiac Homeobox

- Gene Csx/Nkx2.5 Lies Genetically Upstream of Multiple Genes Essential for Heart Development.” *Development* 126 (6): 1269–80.
- Teegarden, Dorothy, Kimberly M. White, Roseann M. Lyle, Michael B. Zemel, Marta D. Van Loan, Velimir Matkovic, Bruce A. Craig, and Dale A. Schoeller. 2008. “Calcium and Dairy Product Modulation of Lipid Utilization and Energy Expenditure.” *Obesity* 16 (7): 1566–72. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.232>.
- Thorne, Sara A. 2018. “Heart Disease in Pregnancy.” *Medicine (United Kingdom)*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.08.009>.
- Tint, Mya Thway, Mary F Chong, Izzuddin M. Aris, Keith M. Godfrey, Phaik Ling Quah, Jeevesh Kapur, Seang Mei Saw, et al. 2018. “Association between Maternal Mid-Gestation Vitamin D Status and Neonatal Abdominal Adiposity.” *International Journal of Obesity* 42 (7): 1296–1305. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0032-2>.
- Tishkoff, Daniel X., Karl A. Nibelink, Kristina H. Holmberg, Loredana Dandu, and Robert U. Simpson. 2008. “Functional Vitamin D Receptor (VDR) in the T-Tubules of Cardiac Myocytes: VDR Knockout Cardiomyocyte Contractility.” *Endocrinology* 149 (2): 558–64. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0805>.
- Tourniaire, Franck, Hana Musinovic, Erwan Gouranton, Julien Astier, Julie Marcotorchino, Andrea Arreguin, Denis Bernot, et al. 2015. “All- Trans Retinoic Acid Induces Oxidative Phosphorylation and Mitochondria Biogenesis in Adipocytes.” *Journal of Lipid Research* 56 (6): 1100–1109. <https://doi.org/10.1194/jlr.M053652>.
- Trandafir, L M, and O R Temneanu. 2016. “Pre and Post-Natal Risk and Determination of Factors for Child Obesity.” *Journal of Medicine and Life* 9 (4): 386–91. <https://doi.org/10.22336/jml.2016.0412>.
- Trayhurn, Paul. 2007. “Adipocyte Biology.” *Obesity Reviews* 8 (s1): 41–44. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2007.00316.x>.
- Trayhurn, Paul, Adrian O’Hara, and Chen Bing. 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 (0): 31. <https://doi.org/10.14748/adipo.v3.269>.
- Tuliani, Tushar A., Maithili Shenoy, Abhishek Deshmukh, Ankit Rathod, Sadip Pant, Apurva O. Badheka, Diane Levine, and Luis Afonso. 2014. “Major Electrocardiographic Abnormalities and 25-Hydroxy Vitamin D Deficiency: Insights from National Health and Nutrition Examination Survey-III.” *Clinical Cardiology* 37 (11): 660–66. <https://doi.org/10.1002/clc.22329>.
- Tuoresmäki, Pauli, Sami Väisänen, Antonio Neme, Sami Heikkinen, and Carsten Carlberg. 2014. “Patterns of Genome-Wide VDR Locations.” Edited by Andrzej T. Slominski. *PLoS ONE* 9 (4): e96105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096105>.
- Turano, Carlo, Elisa Guacci, Caterina Grillo, and Silvia Chichiarelli. 2011. “ERp57/GRP58: A Protein with Multiple Functions.” *Cellular and Molecular Biology Letters* 16 (4): 539–63. <https://doi.org/10.2478/s11658-011-0022-z>.
- Turck, Dominique, Jean-Louis Bresson, Barbara Burlingame, Tara Dean, Susan Fairweather-Tait, Marina Heinonen, Karen Ildico Hirsch-Ernst, et al. 2016. “Dietary Reference Values for Vitamin D.” *EFSA Journal* 14 (10): e04547. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4547>.
- Umer, Amna, George A. Kelley, Lesley E. Cottrell, Peter Giacobbi, Kim E. Innes, and Christa L. Lilly. 2017. “Childhood Obesity and Adult Cardiovascular Disease Risk Factors: A Systematic Review with Meta-

- Analysis." *BMC Public Health* 17 (1): 683. <https://doi.org/10.1186/s12889-017-4691-z>.
- Veiby, Gyri, Anne Kjersti Daltveit, Bernt A. Engelsen, and Nils Erik Gilhus. 2014. "Fetal Growth Restriction and Birth Defects with Newer and Older Antiepileptic Drugs during Pregnancy." *Journal of Neurology* 261 (3): 579–88. <https://doi.org/10.1007/s00415-013-7239-x>.
- Verdot, Charlotte, Marion Torres, Benoît Salanave, and Valérie Deschamps. 2017. "Corpulence Des Enfants et Des Adultes En France Métropolitaine En 2015. Résultats de l'étude Esteban et Évolution Depuis 2006." *Bull Epidemiol Hebd* 13: 234–41. http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2017/13/pdf/2017_13_1.pdf.
- Vernay, M., M. Sponga, B. Salanave, A. Oleko, V. Deschamps, A. Malon, and K. Castetbon. 2011. "Statut En Vitamine D de La Population Adulte En France : L'étude Nationale Nutrition Santé (ENNS, 2006–2007)." *Nutrition Clinique et Métabolisme* 25 (December): S50–51. [https://doi.org/10.1016/S0985-0562\(11\)70066-8](https://doi.org/10.1016/S0985-0562(11)70066-8).
- Vilarrasa, N., J. Maravall, A. Estepa, R. Sánchez, C. Masdevall, M. A. Navarro, P. Alía, J. Soler, and J. M. Gómez. 2007. "Low 25-Hydroxyvitamin D Concentrations in Obese Women: Their Clinical Significance and Relationship with Anthropometric and Body Composition Variables." *Journal of Endocrinological Investigation* 30 (8): 653–58. <https://doi.org/10.1007/BF03347445>.
- Vitezova, Anna, Taulant Muka, M. Carola Zillikens, Trudy Voortman, Andre G. Uitterlinden, Albert Hofman, Fernando Rivadeneira, Jessica C. Kiefte-de Jong, and Oscar H. Franco. 2017. "Vitamin D and Body Composition in the Elderly." *Clinical Nutrition* 36 (2): 585–92. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.04.017>.
- Waddington, C. H. 1942. "CANALIZATION OF DEVELOPMENT AND THE INHERITANCE OF ACQUIRED CHARACTERS." *Nature* 150 (3811): 563–65. <https://doi.org/10.1038/150563a0>.
- Wamberg, L., T. Christiansen, S. K. Paulsen, S. Fisker, P. Rask, L. Rejnmark, B. Richelsen, and S. B. Pedersen. 2013. "Expression of Vitamin D-Metabolizing Enzymes in Human Adipose Tissue - The Effect of Obesity and Diet-Induced Weight Loss." *International Journal of Obesity* 37 (5): 651–57. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.112>.
- Wang, Youfa, Jungwon Min, Jacob Khuri, and Miao Li. 2017. "A Systematic Examination of the Association between Parental and Child Obesity across Countries." *Advances in Nutrition: An International Review Journal* 8 (3): 436–48. <https://doi.org/10.3945/an.116.013235>.
- Weber, K., and R. G. Erben. 2013. "Differences in Triglyceride and Cholesterol Metabolism and Resistance to Obesity in Male and Female Vitamin D Receptor Knockout Mice." *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97 (4): 675–83. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01308.x>.
- Weerd, Jan Hendrik van, Ileana Badi, Malou van den Boogaard, Sonia Stefanovic, Harmen J.G. van de Werken, Melisa Gomez-Velazquez, Claudio Badia-Careaga, et al. 2014. "A Large Permissive Regulatory Domain Exclusively Controls Tbx3 Expression in the Cardiac Conduction System." *Circulation Research* 115 (4): 432–41. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303591>.
- Weerd, Jan Hendrik van, and Vincent M. Christoffels. 2016. "The Formation and Function of the Cardiac Conduction System." *Development* 143 (2): 197–210. <https://doi.org/10.1242/dev.124883>.
- Weishaar, Ronald E., and Robert U. Simpson. 1989. "The Involvement of the Endocrine System in Regulating Cardiovascular Function: Emphasis on Vitamin D 3 *." *Endocrine Reviews* 10 (3): 351–65. <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/edrv-10-3-351>.

- Wells, J C K. 2013. "Obesity as Malnutrition: The Dimensions beyond Energy Balance." *European Journal of Clinical Nutrition* 67 (5): 507–12. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.31>.
- Welsh, JoEllen, Lindsay N. Zinser, Laurel Miannecki-Morton, Jamie Martin, Susan E. Waltz, Howard James, and Glendon M. Zinser. 2011. "Age-Related Changes in the Epithelial and Stromal Compartments of the Mammary Gland in Normocalcemic Mice Lacking the Vitamin D3 Receptor." Edited by Zhongjun Zhou. *PLoS ONE* 6 (1): e16479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016479>.
- Wen, Juan, Qin Hong, Xingyun Wang, Lijun Zhu, Tianqi Wu, Pengfei Xu, Ziyi Fu, et al. 2018. "The Effect of Maternal Vitamin D Deficiency during Pregnancy on Body Fat and Adipogenesis in Rat Offspring." *Scientific Reports* 8 (1): 365. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18770-4>.
- Whitaker, Robert C. 2004. "Predicting Preschooler Obesity at Birth: The Role of Maternal Obesity in Early Pregnancy." *PEDIATRICS* 114 (1): e29–36. <https://doi.org/10.1542/peds.114.1.e29>.
- Wilding, Sam, Nida Ziauddeen, Dianna Smith, Paul Roderick, and Nisreen A. Alwan. 2019. "Maternal and Early-life Area-level Characteristics and Childhood Adiposity: A Systematic Review." *Obesity Reviews* 20 (8): obr.12861. <https://doi.org/10.1111/obr.12861>.
- Wong, Kari E., Juan Kong, Wenshuo Zhang, Frances L. Szeto, Honggang Ye, Dilip K. Deb, Matthew J. Brady, and Yan Chun Li. 2011. "Targeted Expression of Human Vitamin D Receptor in Adipocytes Decreases Energy Expenditure and Induces Obesity in Mice." *Journal of Biological Chemistry* 286 (39): 33804–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257568>.
- Wong, Kari E., Frances L. Szeto, Wenshuo Zhang, Honggang Ye, Juan Kong, Zhongyi Zhang, Xiao Jian Sun, and Yan Chun Li. 2009. "Involvement of the Vitamin D Receptor in Energy Metabolism: Regulation of Uncoupling Proteins." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 296 (4): E820–28. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90763.2008>.
- Woo Baidal, Jennifer A., Lindsey M. Locks, Erika R. Cheng, Tiffany L. Blake-Lamb, Meghan E. Perkins, and Elsie M. Taveras. 2016a. "Risk Factors for Childhood Obesity in the First 1,000 Days." *American Journal of Preventive Medicine* 50 (6): 761–79. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2015.11.012>.
- . 2016b. "Risk Factors for Childhood Obesity in the First 1,000 Days." *American Journal of Preventive Medicine* 50 (6): 761–79. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2015.11.012>.
- Wortsman, Jacobo, Lois Y. Matsuoka, Tai C. Chen, Zhiren Lu, and Michael F. Holick. 2000. "Decreased Bioavailability of Vitamin D in Obesity." *The American Journal of Clinical Nutrition* 72 (3): 690–93. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.3.690>.
- Wu, C. 2001. "Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence." *Science* 293 (5532): 1103–5. <https://doi.org/10.1126/science.293.5532.1103>.
- Wu, Jianming, Miklós Garami, Tong Cheng, and David G. Gardner. 1996. "1,25 (OH)₂ Vitamin D₃ and Retinoic Acid Antagonize Endothelin-Stimulated Hypertrophy of Neonatal Rat Cardiac Myocytes." *Journal of Clinical Investigation* 97 (7): 1577–88. <https://doi.org/10.1172/JCI118582>.
- Wu, Meifang, Kaizu Xu, Ying Wu, and Liming Lin. 2019. "Role of Vitamin D in Patients with Heart Failure with Reduced Ejection Fraction." *American Journal of Cardiovascular Drugs*, July. <https://doi.org/10.1007/s40256-019-00357-1>.

- Wu, Sean M., Yuko Fujiwara, Susan M. Cibulsky, David E. Clapham, Ching-ling Lien, Thomas M. Schultheiss, and Stuart H. Orkin. 2006. "Developmental Origin of a Bipotential Myocardial and Smooth Muscle Cell Precursor in the Mammalian Heart." *Cell* 127 (6): 1137–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.028>.
- Wysolmerski, John J. 2018. "Parathyroid Hormone, Parathyroid Hormone–Related Protein, and Calcitonin." In *Vitamin D*, Fourth Edi, 1:849–70. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809965-0.00046-X>.
- Xue, Jing, Sarah A Schoenrock, William Valdar, Lisa M Tarantino, and Folami Y Ideraabdullah. 2016. "Maternal Vitamin D Depletion Alters DNA Methylation at Imprinted Loci in Multiple Generations." *Clinical Epigenetics* 8 (1): 107. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0276-4>.
- Yin, Yi, Zhiwen Yu, Min Xia, Xiaoqin Luo, Xiaofei Lu, and Wenhua Ling. 2012. "Vitamin D Attenuates High Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis in Rats by Modulating Lipid Metabolism." *European Journal of Clinical Investigation* 42 (11): 1189–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2012.02706.x>.
- Yu, Di, Yu Feng, Lei Yang, Min Da, Changfeng Fan, Song Wang, and Xuming Mo. 2014. "Maternal Socioeconomic Status and the Risk of Congenital Heart Defects in Offspring: A Meta-Analysis of 33 Studies." Edited by Graham R. Wallace. *PLoS ONE* 9 (10): e111056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111056>.
- Yuan, Yuan, Weicheng Chen, Xiaojing Ma, Huijun Wang, Weili Yan, and Guoying Huang. 2015. "Pedigree-Based Analysis of Inherited and Noninherited Risk Factors of Congenital Heart Defects." *Early Human Development* 91 (12): 713–18. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.001>.
- Zhang, Huaqi, Xia Chu, Yifan Huang, Gang Li, Yuxia Wang, Ying Li, and Changhao Sun. 2014. "Maternal Vitamin D Deficiency during Pregnancy Results in Insulin Resistance in Rat Offspring, Which Is Associated with Inflammation and Ikb α Methylation." *Diabetologia* 57 (10): 2165–72. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3316-7>.
- Zhou, Pingzhu, and William T. Pu. 2016. "Recounting Cardiac Cellular Composition." *Circulation Research* 118 (3): 368–70. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308139>.
- Zoico, Elena, Guido Franceschetti, Salvatore Chirumbolo, Andrea P. Rossi, Gloria Mazzali, Vanni Rizzatti, Simona Budui, and Mauro Zamboni. 2014. "Phenotypic Shift of Adipocytes by Cholecalciferol and 1 α ,25 Dihydroxycholecalciferol in Relation to Inflammatory Status and Calcium Content." *Endocrinology* 155 (11): 4178–88. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1969>.