

Université de Montréal

**Effets d'anomalies biochimiques de l'obésité sur  
l'expression de cytokines pro-inflammatoires**

par  
Julie Amyot

Département de biochimie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.) en biochimie

Décembre 2006

© Julie Amyot, 2006





## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

**Effets biochimiques de l'obésité sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires**

présenté par :  
Julie Amyot

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Pierre Émond, Ph.D., président-rapporteur  
Raymond Lepage, Ph.D., directeur de recherche  
Omar Serri, MD, membre du jury

## RÉSUMÉ

Des études récentes rapportent que l'obésité est associée à un état inflammatoire chronique de faible intensité. Certaines cytokines pro-inflammatoires, tel que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 qui sont régulées à la hausse dans l'obésité, jouent un rôle clé dans cette inflammation. En plus, des corrélations positives ont été rapportées entre certains paramètres biochimiques augmentés dans le plasma d'individus obèses (glucose, triglycérides, cholestérol total, leptine) et l'expression et/ou la production du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6. À l'inverse, l'insuline semblerait plutôt produire un effet anti-inflammatoire. Les deux cytokines seraient produites, au moins en partie, par le tissu adipeux mais le rôle des leucocytes dans cette production est peu connu.

Les objectifs principaux de ce programme de maîtrise visaient tout d'abord à mettre au point des techniques de PCR en temps réel qui, dans un second temps, permettraient de vérifier si les cellules périphériques circulantes d'individus obèses sont impliquées dans la production du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 et du même coup, établir des valeurs de référence pour ces deux cytokines. Enfin, le troisième objectif de ce travail visait à étudier le potentiel pro-inflammatoire de l'hyperglycémie, de l'insuline, des triglycérides et ainsi que la leptine sur l'expression des gènes du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 via l'utilisation d'un modèle ex vivo de l'obésité.

Les techniques mises au point nous ont permis de quantifier l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 dans les cellules périphériques circulantes humaines. Toutefois, les difficultés de recrutement ne nous ont pas permis d'établir des valeurs de référence, faute d'un nombre suffisant de sujets. Enfin, nous n'avons pas démontré une réponse inflammatoire avec des agresseurs physiologiques tels que le glucose, l'insuline, les triglycérides et la leptine.

**Mots-clés :** Obésité, inflammation, TNF- $\alpha$ , IL-6, PCR en temps réel

## ABSTRACT

Recently, it has become evident that obesity is associated with a chronic, low-grade, systemic inflammation. Importantly, proinflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-6, whose expression is up-regulated during obesity, are thought to play key roles in this obesity-induced inflammation. Moreover, strong positive correlations between biochemical plasmatic analytes such as, glucose, triglycerides, total cholesterol and leptin, which are in excess during obesity, and the enhanced production and release of TNF- $\alpha$  and IL-6 have been shown. In contrast, insulin appears to produce an anti-inflammatory effect. Initially, it is believed that the production of these two cytokines originates in the adipocytes, however, the role of leukocytes in this process remains unclear.

The goals of this study were first to create a real-time PCR technique that would allow us to measure TNF- $\alpha$  and IL-6 expression. Second we sought to ascertain the contribution of peripheral circulatory cells in the production of overall circulating levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in obese individuals. While this was being pursued we also set out to establish reference values of TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNAs. Finally, using an ex vivo model of obesity, we set out to determine the proinflammatory effect of glucose, insulin, triglycerides and leptin on TNF- $\alpha$  and IL-6 gene expression.

The real-time PCR techniques used in this work permitted the quantification of TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA expression in peripheral circulatory cells. However, as a consequence of difficulties in recruiting subjects for this study, we had an insufficient number of individuals to enable the establishment of a true reference value. Finally, using an ex vivo model of obesity, we were unable to demonstrate an inflammatory response with physiologic aggressive factors as glucose, insulin, triglycerides or leptin.

**Keywords :** Obesity, inflammation, TNF- $\alpha$ , IL-6, Real-time PCR

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1. Obésité.....	1
1.1.1. Définition .....	1
1.1.2. Prévalence .....	2
1.1.3. Étiologie.....	2
1.1.4. Comorbidités et mortalité.....	3
1.1.5. Bilan biochimique de l'obésité.....	4
1.2. Les cytokines.....	4
1.2.1. Définition et mécanisme d'action général.....	4
1.3. L'obésité : un état inflammatoire chronique de faible intensité.....	6
1.3.1. Bilan inflammatoire retrouvé chez l'individu obèse.....	6
1.3.2. Signification physiopathologique de l'état inflammatoire.....	8
1.3.3. Le facteur de nécrose des tumeurs $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).....	8
1.3.4. L'interleukine-6 (IL-6).....	11
1.3.5. D'où viennent les taux élevés de TNF- $\alpha$ et d'IL-6 dans l'obésité? ....	13
1.3.6. Causes de l'induction du TNF- $\alpha$ et de L'IL-6 dans l'obésité .....	16
1.4. Problématique .....	19
1.5. Méthodes de quantification des cytokines .....	22
1.5.1. La RT-PCR en temps réel : Principes et applications cliniques.....	22
<b>2. OBJECTIFS</b> .....	<b>28</b>

2.1.	Mise au point d'une méthode RT-PCR en temps réel pour le dosage du TNF- $\alpha$ et de l'IL-6.....	28
2.2.	Vérification de la production de TNF- $\alpha$ et d'IL-6 par les cellules périphériques circulantes.....	28
2.3.	Investigation du potentiel pro-inflammatoire de certains paramètres biochimiques rencontrés en excès dans l'obésité.....	28
<b>3.</b>	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>30</b>
3.1.	Vérification de la production de TNF- $\alpha$ et d'IL-6 par les cellules périphériques circulantes.....	30
3.1.1.	Populations à l'étude.....	30
3.1.2.	Mode de recrutement.....	34
3.1.3.	Prélèvements sanguins .....	34
3.1.4.	Classification des sujets .....	35
3.1.5.	Dosages biologiques .....	35
3.1.6.	Isolation des cellules périphériques circulantes .....	36
3.1.7.	Extraction de l'ARN total .....	36
3.1.8.	Électrophorèse à 1% d'agarose .....	37
3.1.9.	Transcription inverse.....	37
3.1.10.	Amplification par PCR en temps réel .....	37
3.1.11.	Collecte et gestion des résultats .....	39
3.1.12.	Statistiques .....	39
3.2.	Investigation du potentiel pro-inflammatoire de paramètres biochimiques rencontrés en excès dans l'obésité : glucose, insuline, leptine, cholestérol et triglycérides.....	40
3.2.1.	Stimulation du sang veineux périphérique avec le glucose, l'insuline et la leptine.....	40
3.2.2.	Stimulations avec le cholestérol et les triglycérides .....	41
3.2.3.	Dosages biologiques .....	42
3.2.4.	Statistiques .....	42
<b>4.</b>	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>43</b>



4.1.	Mise au point et validation analytique des techniques de réaction de polymérase en chaîne en temps réel du TNF- $\alpha$ et de l'IL-6.....	43
4.1.1.	Choix des amorces .....	43
4.1.2.	Détermination de la concentration du MgCl <sub>2</sub> .....	44
4.1.3.	Détermination de la concentration des amorces.....	45
4.1.4.	Sensibilité analytique .....	45
4.1.5.	Spécificité.....	45
4.1.6.	Linéarité .....	46
4.1.7.	Précision.....	46
4.2.	Production de TNF- $\alpha$ et d'IL-6 par les cellules périphériques circulantes ..	56
4.2.1.	Valeurs de référence préliminaires établies à partir d'un échantillon d'individus minces (n=22) .....	56
4.2.2.	Corrélation entre l'IMC et l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$ et de l'ARNm de l'IL6.....	59
4.3.	Investigation du potentiel pro-inflammatoire de 4 paramètres biochimiques rencontrés en excès dans l'obésité .....	62
4.3.1.	Effet de l'hyperglycémie sur les taux et l'expression du TNF- $\alpha$ et de l'IL-6.....	62
4.3.2.	Effet de l'hyperinsulinémie sur la production et l'expression du TNF- $\alpha$ et de l'IL-6.....	67
4.3.3.	Effet de l'hypertriglycéridémie sur la production et l'expression du TNF- $\alpha$ et de l'IL-6.....	71
4.3.4.	Effet de l'hyperleptinémie sur la production et l'expression du TNF- $\alpha$ et de l'IL-6.....	74
<b>5.</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>77</b>
5.1.	Mise au point d'une méthode RT-PCR en temps réel pour le dosage du TNF- $\alpha$ et de l'IL-6.....	77
5.2.	Vérification de la production de TNF- $\alpha$ et d'IL-6 par les cellules périphériques circulantes.....	82
5.2.1.	Valeurs de référence établies à partir d'un échantillon d'individus minces.....	82

5.2.2. Corrélations entre l'IMC et l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$ et de l'ARNm de l'IL6.....	84
5.3. Investigation du potentiel pro-inflammatoire de 4 paramètres biochimiques rencontrés en excès dans l'obésité : glucose, insuline, leptine et triglycérides.....	86
<b>6. CONCLUSION.....</b>	<b>92</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>94</b>
<b>LISTE DES ANNEXES.....</b>	<b>I</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I : Classification du risque pour la santé en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC) selon l'OMS.</b> .....	1
<b>Tableau II : Marqueurs de l'inflammation et autres médiateurs surexprimés dans l'obésité.</b> .....	7
<b>Tableau III : Concentrations plasmatiques du TNF-<math>\alpha</math> et de l'IL-6 rencontrées chez des individus minces et obèses.</b> .....	20
<b>Tableau IV : Caractéristiques physiques et métaboliques des hommes des populations à l'étude (n=32).</b> .....	32
<b>Tableau V : Caractéristiques physiques et métaboliques des femmes des populations à l'étude (n=23).</b> .....	33
<b>Tableau VI : Précision et variabilité intra-essai pour le dosage de l'ARNm de l'IL-6 et du TNF<math>\alpha</math>.</b> .....	54
<b>Tableau VII : Précision et variabilité inter-essai pour le dosage de l'ARNm de l'IL-6 et du TNF<math>\alpha</math>.</b> .....	55
<b>Tableau VIII: Intervalles de référence des taux d'ARNm du TNF-<math>\alpha</math> et de l'IL-6</b>	
<b>Tableau IX : Concentrations du TNF-<math>\alpha</math> et d'IL-6 par catégories de poids.</b> .....	59
<b>Tableau X : Taux de TNF-<math>\alpha</math> individuels pour les stimulations avec 20 mmol/L de glucose</b> .....	64
<b>Tableau XI : Taux d'IL-6 individuels pour les stimulations avec 20 mmol/L de glucose</b> .....	65
<b>Tableau XII : Moyennes des taux de TNF-<math>\alpha</math> et d'IL-6 pour les stimulations avec 20 mmol/L de glucose.</b> .....	66
<b>Tableau XIII : Taux de TNF-<math>\alpha</math> individuels pour les stimulations avec 5000 pmol/L d'insuline</b> .....	68
<b>Tableau XIV : Taux d'IL-6 individuels pour les stimulations avec 5000 pmol/L d'insuline.</b> .....	69
<b>Tableau XV : Moyennes des taux de TNF-<math>\alpha</math> et d'IL-6 pour les stimulations avec 5000 pmol/L d'insuline.</b> .....	70
<b>Tableau XVI : Taux de TNF-<math>\alpha</math> individuels en situation d'hypertriglycéridémie</b>	72

<b>Tableau XVII : Taux d'IL-6 individuels en situation d'hypertriglycémie ....</b>	<b>72</b>
<b>Tableau XVIII : Moyennes des taux de TNF-<math>\alpha</math> et d'IL-6 en situation d'hypertriglycémie .....</b>	<b>73</b>
<b>Tableau XIX : Taux de TNF-<math>\alpha</math> individuels pour les stimulations avec 100 000 ng/L de leptine .....</b>	<b>75</b>
<b>Tableau XX : Taux d'IL-6 individuels pour les stimulations avec 100 000 ng/mL de leptine .....</b>	<b>76</b>
<b>Tableau XXI : Moyennes des taux de TNF-<math>\alpha</math> et d'IL-6 pour les stimulations avec 100 000 ng/L de leptine .....</b>	<b>76</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 : Contrôle négatif de la signalisation à l'insuline par la phosphorylation des Ser/Tyr des protéines IRS.....</b>	<b>10</b>
<b>Figure 2 : Implication de la voie d'activation du NF-KB (Nuclear factor-kappaB) dans le développement de plusieurs comorbidités associées à l'obésité.....</b>	<b>11</b>
<b>Figure 3 : IL-6 comme élément central reliant l'inflammation, l'obésité, le stress et les maladies coronariennes.....</b>	<b>13</b>
<b>Figure 4: L'adipocyte et ses adipocytokines.....</b>	<b>15</b>
<b>Figure 5 : Le SYBR green I s'intercale entre les doubles brins d'ADN formés au cours de la PCR.....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 6 : a) Le LightCycler de Roche Molecular Biochemicals et b) son système thermal.....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 7 : Quantification d'ARNm par PCR quantitative en temps réel sur le système Light Cycler.....</b>	<b>26</b>
<b>Figure 8 : Spécificité de la PCR.....</b>	<b>27</b>
<b>Figure 9 : Séquence nucléotidique complète de l'ARNm de l'IL-6 humain.....</b>	<b>43</b>
<b>Figure 10 : Étapes menant à la sélection des amorces.....</b>	<b>48</b>
<b>Figure 11 : Détermination de la concentration en MgCl<sub>2</sub>.....</b>	<b>49</b>
<b>Figure 12 : Détermination de la concentration des amorces.....</b>	<b>50</b>
<b>Figure 13 : Validation analytique.....</b>	<b>52</b>
<b>Figure 14 : Linéarité.....</b>	<b>53</b>
<b>Figure 15: Distribution des taux d'ARNm du TNF-<math>\alpha</math> chez des individus normaux.....</b>	<b>57</b>
<b>Figure 16 : Distribution des taux d'ARNm de l'IL-6 chez des individus normaux.....</b>	<b>58</b>
<b>Figure 17 : Étude de la relation entre l'IMC et l'expression de l'ARNm du TNF-<math>\alpha</math>.....</b>	<b>60</b>
<b>Figure 18 : Étude de la relation entre l'IMC et l'expression de l'ARNm de l'IL-6.....</b>	<b>61</b>
<b>Figure 19 : Relation entre les taux d'ARNm du TNF-<math>\alpha</math> et de l'IL-6.....</b>	<b>61</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASP	<i>Acetylation-Stimulating Protein</i>
CN	Contrôle négatif
CRP	Protéine C réactive
DHA	Acide docosahexaénoïque
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
ELISA	Essai enzymatique lié à un immunoabsorbant
EPA	Acide eicosapentanoïque
FRET	Transfert d'énergie par résonance de fluorescence
FSC	Formule sanguine complète
HDL	Lipoprotéines de haute densité
ICAM-1	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule-1</i>
IFN	Interféron
IFN- $\alpha$	Interféron-alpha
IFN- $\gamma$	Interféron-gamma
IGF-1	<i>Insulin Growth Factor-1</i>
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B</i>
I $\kappa$ B $\beta$	<i>Inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B beta</i>
IKK $\beta$	<i>Inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B Kinase beta</i>
IL-1	Interleukine-1
IL-6	Interleukine-6
IL-8	Interleukine-8
IMC	Indice de masse corporel

Ins	Insuline
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate-1</i>
IRS-2	<i>Insulin receptor substrate-2</i>
JAK/STAT	<i>Janus Kinases/Signal Transducer and Activators of Transcription</i>
Jnk	<i>Jun N-terminal kinase</i>
LDL	Lipoprotéines de basse densité
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MIF	<i>Macrophage migrating Inhibitory Factor</i>
MPM	Marqueur de poids moléculaire
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NK	Cellule tueuse naturelle
NZO	<i>New Zealand Obese</i>
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
PCR	Réaction de polymérase en chaîne
PH	Domaine <i>Pleckstrin Homology</i>
PI3K	<i>PhosphoInositide-3 Kinase</i>
PKC $\theta$	Protéine Kinase C $\theta$
PTB	Domaine <i>PhosphoTyrosine Binding</i>
ROS	Espèces réactives d'oxygène
RPL	<i>Remnant-Like particle</i>
RT	Réaction de transcription inverse
Real time RT-PCR	Réaction de transcription inverse combinée à la réaction de polymérase en chaîne en temps réel
Ser	Sérine
Ser/Tyr	Sérine/Tyrosine
SOCS-3	<i>Suppressor of cytokine signaling-3</i>
TGF- $\beta$	Facteur de croissance transformant bêta
T <sub>m</sub>	Température de fusion
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose des tumeurs alpha
TNF- $\beta$	Facteur de nécrose des tumeurs bêta

TNFR1B	<i>Soluble TNF Receptor Superfamily 1B</i>
Tris-HCl	Tris-hydrochlorure
Tyr	Tyrosine
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>



*À mes parents ainsi qu'à mon petit frère  
que j'adore!*

*À Claudette.*

## Remerciements

Je désire d'abord remercier Dr Raymond Lepage pour son soutien, sa patience et ses innombrables et précieux conseils. Par sa passion, sa grande finesse d'esprit et la facilité déconcertante avec laquelle il interagit avec ses collègues, il agit à titre de mentor et de modèle pour moi ainsi que pour plusieurs d'entre nous au département de biochimie de l'Hôpital Saint-Luc.

Remerciements sincères également à Dr M'Bark Sadouk de m'avoir initié aux bases fondamentales de la recherche clinique et d'avoir toujours été disponible pour moi au cours de ces deux dernières années.

Je remercie également l'équipe du Département de biochimie clinique du CHUM, et plus particulièrement les Drs François Lessard, Martin Beaulieu, Caroline Albert, Luce Boulanger, George Hilal (qui nous a désormais quittés pour exercer au Liban) et Marc Martin pour non seulement avoir répondu à mes nombreuses interrogations et curiosités scientifiques mais également m'avoir adoptée au sein de leur équipe. Merci à Marielle Beauchesne pour son aide précieuse dans la présentation des documents officiels de mon projet. Je tiens également à remercier M. Robert Boileau et Dr Guillaume Paré pour leur aide dans la partie statistique du projet.

Un merci vraiment particulier s'adresse à Claudette de Montigny qui a toujours été là pour me soutenir et me diriger. Il y a de ces gens dans une vie que nous rencontrons et qui modifient notre perception des choses et nous apprennent à être meilleurs. Claudette est une de ces personnes exceptionnelles avec qui j'ai développé un lien très fort qui nous unira, j'en suis certaine, pour très longtemps.

Je tiens également à remercier les technologistes médicales (caux) et les commis du Centre des Prélèvements de l'Hôpital Saint-Luc du CHUM pour leur énorme et même gigantesque collaboration lors du recrutement des patients : Suzanne Fortin, Josée Rioux, Guylaine Chabot, Sylvie Rodrigue, Nathalie Moreau, Marie-

Claude Baron, Wedad Bahlak, Julie Favreau, Karine Girard, Maxime Shannon, Janice Élie et Patrick Dupéré. Un gros merci également aux techniciens de laboratoire de la biologie moléculaire (Yves Bélanger, Monique Leroux et Josée Rioux) pour leur précieuse contribution technique.

Merci aussi aux technologistes médicaux des laboratoires regroupés du CHUM pour leur contribution à l'obtention des résultats cliniques.

À ma cousine Marie-Line pour son écoute et ses précieux conseils, ainsi qu'à mes amies, Julie Favreau, Julie Arcand et Julie Brunet (Les Julie's) je tiens à vous exprimer ma gratitude pour m'avoir soutenue tout au long de mon parcours de maîtrise. Merci à Isabelle Sirois qui, par sa passion sans borne pour les sciences et son parcours exceptionnel de vie, est une source constante de détermination à mes yeux.

Finalement, et non les moindres, je tiens à remercier de tout cœur mes parents qui m'ont toujours appuyée et encouragée dans tout ce que j'entreprends. L'amour et la confiance qu'ils manifestent envers moi sont infinis et me nourrissent à chaque jour. Un gros merci également à mon petit frère, qui ne comprend pas toujours mon intérêt manifeste pour les sciences, mais qui me pousse à toujours aller plus loin dans ce que j'entreprends et mener à terme la carrière que j'envisage depuis plusieurs années déjà.

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. Obésité

### 1.1.1. Définition

L'obésité est définie comme étant « l'accumulation d'une quantité anormale ou excessive de graisse dans l'organisme pouvant nuire à la santé » (OMS, 1996). La définition de l'excès de poids, ou embonpoint, et de l'obésité est dans la plupart des cas fondée sur l'indice de masse corporelle (IMC), un indice anthropométrique exprimé par le rapport du poids (en kg) sur le carré de la hauteur (en m) ( $\text{kg/m}^2$ ). En fonction de cet indice, il est possible de faire la distinction entre les individus maigres, de poids normal, d'excès de poids et obèses (Tableau I).

---

**Tableau I : Classification du risque pour la santé en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC) selon l'OMS.**

---

Classification	Catégorie de l'IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Risque pour la santé
Poids insuffisant	<18,5	Risque accru de développer des problèmes de santé
Poids normal	18,5 - 24,9	Moindre risque de développer des problèmes de santé
Excès de poids	25,0 - 29,9	Risque accru de développer des problèmes de santé
Obésité	>30,0	Risque élevé de développer des problèmes de santé

---

*Adapté de : Organisation mondiale de la santé. Obésité : Prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale. Genève, OMS, 2003.*

Un IMC normal chez un adulte varie entre 18,5 et 24,9. Un individu ayant un IMC se situant entre 25 et 29,9 présente un surplus de poids alors qu'on parle d'obésité quand l'IMC est égal ou supérieur à 30. Au-delà de 40 kg/m<sup>2</sup>, il s'agit d'une obésité morbide. Une autre mesure courante de l'obésité est la mesure du tour de taille, qui en plus de l'IMC, permet de mieux définir l'obésité. D'autres approches sont également disponibles pour mesurer l'obésité : épaisseur des plis cutanés, détermination de l'impédance électrique corporelle, tomographie axiale computerisée, résonance magnétique nucléaire, hydrodensitométrie, etc.

### **1.1.2. Prévalence**

L'obésité et l'embonpoint ont montré une hausse spectaculaire au cours des dernières années. La prévalence varie selon les pays et la tendance est à la hausse partout dans le monde (Annexe I). À titre d'exemple, la prévalence est passée de 14,5 % en 1960 (Flegal et al., 1998) à 30,4 % en 2004 aux États-Unis (Hedley et al., 2004) et de 5,6 % à 15 % entre 1985 (Katzmarzyk et al., 2002) et 2003 au Canada (Bélanger-Ducharme et al., 2005). En outre, les adultes ne sont plus les seuls concernés : l'accroissement de la prévalence de l'embonpoint et de l'obésité est désormais rencontré chez les enfants et les adolescents. En 2004, 26 % des enfants et adolescents canadiens âgés de 2 à 17 ans présentaient un surplus de poids ou étaient obèses, ceci représentant un taux d'obésité ayant triplé au cours des 25 dernières années (Shields M, 2004). Cette progression rapide et soudaine du nombre d'individus obèses à l'échelle mondiale fait reconnaître l'obésité comme étant une maladie aux dimensions pandémiques.

### **1.1.3. Étiologie**

Il est généralement accepté chez les experts que les réserves adipeuses qui caractérisent l'obésité résultent d'un déséquilibre entre l'apport et la dépense énergétiques (Basdevant A, 1998). Néanmoins, l'étiologie de l'obésité est multifactorielle : des facteurs génétiques, biologiques, psychogéniques et socio-économiques y contribuent.

### 1.1.4. Comorbidités et mortalité

Les répercussions de l'obésité sont bien connues et le lien entre l'obésité et le développement de plusieurs pathologies morbides est désormais bien établi. Le risque de développer des problèmes de santé augmente de façon proportionnelle avec un IMC qui dépasse 25. Par ailleurs, la liste des maladies associées à l'obésité ne cesse de s'allonger. Les accidents vasculaires cérébraux, les maladies coronariennes, l'hypertension, le diabète de type 2, des anomalies respiratoires, la cholélithiase, certaines anomalies hormonales, l'ostéoarthritis, l'hyperuricémie, la goutte ainsi que plusieurs types de cancer (sein, colorectal, œsophage, foie, pancréas, vésicule biliaire, rein, prostate, ovaire et endomètre) sont fréquemment rencontrés chez les individus obèses (Garfinkel et al., 1985, Rimm et al., 1995, Giovannucci et al., 1996, Eckel et al., 1997, Harris et al., 1998, McCarty et al., 1999, Duncan et al., 2000, Yudkin et al., 2000, Adderley-Kelly et al., 2003, Bullo et al., 2003, Calle et al., 2003, Mao et al., 2003, Marfella et al., 2004). En plus de ces troubles métaboliques, l'obésité engendre des conséquences néfastes sur le plan psychologique et social qui peuvent affecter de façon sérieuse la santé mentale (Mustillo et al., 2003, Onyike et al., 2003).

En plus de ces comorbidités, il existe une relation exponentielle entre la mortalité et l'IMC (WHO, 1998). De façon concrète, on estime à 57181 le nombre de décès dus à l'obésité entre 1985 et 2000 au Canada (Katzmarzyk et al. 2004), ce nombre augmentant proportionnellement avec l'IMC (Manson et al., 1995, Troiano et al., 1996). Toutefois, cette réalité est réversible : une perte pondérale va abaisser le risque de mortalité (Williamson et al., 1995).

En considérant la situation d'un autre point de vue, les coûts directs de l'obésité sont non seulement élevés au niveau des collectivités mais également au niveau économique. Ils représentent 1,8 billion \$, soit 2,4 % des dépenses directes de santé au Canada en 1997 (Birmingham et al., 1999).

### **1.1.5. Bilan biochimique de l'obésité**

On connaît fort bien les anomalies biochimiques de l'obésité. Sous l'appellation syndrome métabolique ou syndrome X (Reaven GM, 1988), le tableau clinique chez un individu obèse est caractéristique et inclut, outre une obésité centrale, au minimum deux des quatre facteurs suivants : hypertriglycémie, diminution des HDL sanguins, hyperglycémie à jeun et hypertension. La plupart des individus ayant cet ensemble de facteurs de risque métaboliques vont développer une résistance à l'insuline qui précède le diabète de type 2. D'autres composantes du syndrome métabolique sont également rencontrées : hyperinsulinémie, intolérance au glucose, hyperapolipoprotéïnémie B, augmentation du taux des LDL, hyperuricémie et plusieurs autres. L'hyperleptinémie est une autre caractéristique biologique non négligeable de l'obésité. Enfin, une augmentation des transaminases proportionnelle aux paramètres d'adiposité (Fernandez-Real et al., 2004) survient chez certains patients ayant une stéatose hépatique.

## **1.2. Les cytokines**

### **1.2.1. Définition et mécanisme d'action général**

Les cytokines sont définies comme étant des protéines régulatrices de faible masse moléculaire ou encore des glycoprotéines ayant d'importants rôles dans la réponse immunitaire, l'inflammation, l'hématopoïèse, la survie cellulaire et l'apoptose. Elles sont sécrétées par différents types cellulaires dont les lymphocytes, les cellules présentatrices d'antigène, les monocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes et ont un rôle dans la communication intercellulaire et dans le contrôle de l'environnement interne des cellules qu'elles stimulent (Whicher et al., 1990, Barrett et al., 1996).

Les cytokines sont divisées en quatre classes selon leur fonction biologique ou l'origine de leur découverte scientifique (Thompson et al., 2003). Le terme cytokine

inclut les interleukines, les cytokines sécrétées par les lymphocytes (autrefois connues sous le nom de lymphokines) ainsi que les cytokines sécrétées par les monocytes et les macrophages (connues jadis sous le nom de monokines), les interférons, les facteurs de croissance hématopoïétiques et les facteurs de croissance non-hématopoïétiques. Les interleukines sont désignées par un nombre (1 à 31 jusqu'à récemment), terme indiquant qu'elles sont produites par certains leucocytes et qu'elles agissent sur d'autres cellules blanches du sang. Également, certaines cytokines ont des noms communs : à titre d'exemple, citons les interférons ou IFN (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) et les facteurs de nécrose tumorale ou *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ). Un autre groupe de cytokines, celui des chimiokines, a récemment acquis une importance croissante. Ces cytokines affectent la chimiotaxie ainsi que d'autres aspects du comportement des leucocytes.

L'activité des cytokines a été reconnue pour la première fois au milieu des années 1960 suite à la découverte que des surnageants de culture de leucocytes in vitro contenaient des facteurs susceptibles de réguler la croissance et la prolifération cellulaire. Les cytokines se lient avec une forte affinité à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules et elles activent ainsi des voies de signalisation qui vont modifier l'expression de gènes cibles. En raison de leur haute affinité pour leurs récepteurs, de faibles concentrations de cytokines, de l'ordre du picomolaire, sont suffisantes pour médier un effet biologique. Plusieurs mécanismes d'action caractérisent les cytokines : une cytokine donnée peut se lier aux récepteurs membranaires de la cellule qui l'a sécrétée (action autocrine); elle peut aussi se fixer sur les récepteurs d'une cellule adjacente à la cellule productrice (action paracrine) et, moins fréquemment, elle peut se lier à des cellules dans des régions éloignées de l'organisme (action endocrine). Par ailleurs, plusieurs attributs caractérisent les cytokines : pléiotropie, redondance, synergie, antagonisme, induction de cascades, etc. Ces caractéristiques permettent la régulation coordonnée et interactive des activités cellulaires médiées par les cytokines. Enfin, la production de cytokines est finement régulée. Les cytokines sont généralement sécrétées après activation des cellules cibles



(selon le type de cytokine produite) et cette sécrétion est de courte durée, habituellement de quelques heures à quelques jours.

### **1.3.L'obésité : un état inflammatoire chronique de faible intensité**

#### **1.3.1. Bilan inflammatoire retrouvé chez l'individu obèse**

Outre le bilan biochimique particulier déjà décrit, on rapporte depuis quelques années l'existence d'un état inflammatoire chronique de faible intensité chez les individus obèses. Cet état est entre autres caractérisé par l'activation de plusieurs voies de signalisation pro-inflammatoires. La première association obésité-inflammation a été décrite par Melez et al. en 1980. L'équipe a observé la présence d'inflammation dans les artérioles de souris obèses NZO (*New Zealand Obese*). Par la suite, plusieurs marqueurs biologiques de l'inflammation surexprimés chez les individus obèses ont été rapportés dans la littérature (Tableau II). Entre autres, les taux d'interleukine-6 (IL-6) et de facteur de nécrose des tumeurs  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), deux cytokines pro-inflammatoires, ont fréquemment été décrits comme étant augmentés dans l'obésité. L'association de ces cytokines à l'obésité est d'autant plus tangible du fait qu'elle est réversible après une perte de poids. Effectivement, une normalisation de ces paramètres biologiques survient après une perte d'environ 5 à 10 % du poids initial (Bastard et al., 2000, Ziccardi et al., 2002, Kopp et al., 2003, Nicklas et al., 2004, Vendrell et al., 2004). Dans le présent mémoire, nous nous sommes intéressés aux cytokines TNF- $\alpha$  et IL-6 spécifiquement. Nous les avons choisies parce que leur taux a abondamment été rapporté dans l'obésité comme étant élevés au niveau de la protéine circulante.

<b>Tableau II : Marqueurs de l'inflammation et autres médiateurs surexprimés dans l'obésité.</b>	
<b>Marqueur</b>	<b>Références</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Hostamisligil et al., 1995, Yudkin et al., 1999, Bastard et al., 2000, Ziccardi et al., 2002, Spranger et al., 2003, Moon et al., 2004.
<b>IL-6</b>	Mohamed-Ali et al., 1997, Yudkin et al., 1999, Bastard et al., 2000, Vozarova et al., 2001, Ziccardi et al., 2002, Bruun et al. 2003, Engeli et al., 2003, Spranger et al., 2003, Vendrell et al 2004.
IL-8	Bruun et al., 2001, Strackowski et al., 2002, Bruun et al., 2004.
Leptine	Mantzo., 1997, Bastard et al., 2000, Hukshorn et al., 2004, Vendrell et al., 2004.
CRP	Yudkin et al., 1999, Bastard et al., 2000, Visser et al., 2001, Ajani et al., 2003, Bullo et al., 2003, Engeli et al., 2003, Pradhan et al., 2003, Shea et al., 2003, Spranger et al., 2003, Browning et al., 2004, Ford et al., 2004, Lambert et al., 2004.
Fibrinogène	Krobot et al., 1992, Folsom et al., 1993, Duncan et al., 1999, Duncan et al., 2000.
Adiponectine	Vendrell et al., 2004.
Facteur VIII	Duncan et al., 1999.
Facteur Von Willebrand	Hukshorn et al., 2004.
Résistine	Vendrell et al., 2004.
P-sélectine	Ziccardi et al., 2002.
ICAM-1, VCAM-1	Ziccardi et al., 2002.
Protéine C3 du complément	Schmidt et al., 1996, Duncan et al., 1999, Weyer et al., 2002, Ziccardi et al., 2002.

### **1.3.2. Signification physiopathologique de l'état inflammatoire**

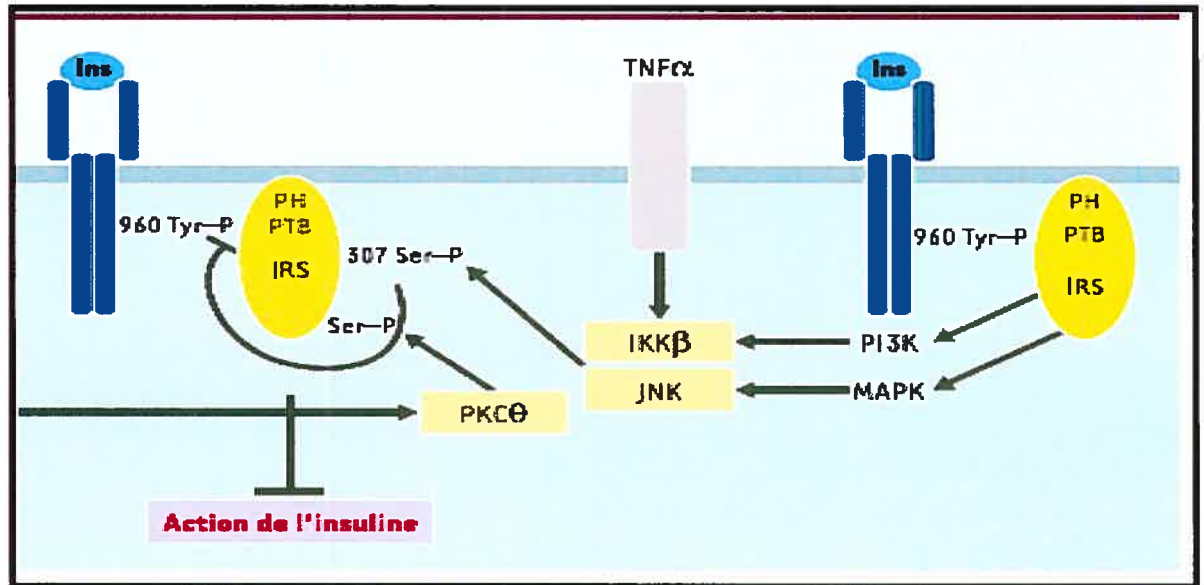
La signification physiologique de l'inflammation se précise de plus en plus mais reste toutefois confuse. Certains auteurs affirment que cette inflammation chronique serait à la base de désordres de coagulation, de dysfonctions endothéliales et pourrait représenter le lien entre l'obésité et le développement des maladies cardiovasculaires (Yudkin et al., 1999, Duncan et al., 2000), de multiples cancers et autres pathologies secondaires à l'obésité (Garfinkel et al., 1985, Anderson et al., 1988, Giovannucci et al., 1996, Sheth et al., 1997, Adderley-Kelly et al., 2003, Calle et al., 2003, Mao et al., 2003). D'autres affirment au contraire que l'inflammation serait une conséquence de toutes ces pathologies. Néanmoins, l'implication du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 dans l'obésité et ses différentes comorbidités a abondamment été étudiée et est précisée dans les paragraphes qui suivent.

### **1.3.3. Le facteur de nécrose des tumeurs $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

Le TNF- $\alpha$  a été la première cytokine à se voir attribuer un rôle dans l'obésité et les pathologies qui y sont associées (Hostamisligil et al., 1993). C'est un polypeptide non-glycosylé de 157 a.a. et 17 kDa sous forme soluble et membranaire, les deux formes étant constituées de trois chaînes protéiques identiques (homotrimère). Le TNF- $\alpha$  est produit principalement par les macrophages et les monocytes, et également par plusieurs types cellulaires tel que les monocytes, les cellules NK, les cellules T, les cellules  $\beta$  du pancréas, les cellules dendritiques et les ostéoblastes. Plusieurs stimuli peuvent en induire la production, tel que les bactéries et leurs produits dérivés (endotoxines, lipopolysaccharides, lipide A), les virus, les parasites et certaines cellules tumorales. Le rôle principal du TNF- $\alpha$  a été défini au départ par son effet cytolytique sur les cellules tumorales mais il possède plusieurs effets pléiotropiques. Ainsi, il active la production de protéines de phase aiguë, augmente la température corporelle via son action sur l'hypothalamus et stimule la différenciation des cellules dendritiques et leur migration vers les ganglions lymphatiques. Le TNF- $\alpha$  a cependant des effets délétères s'il est libéré en excès. La libération systémique du TNF- $\alpha$  suite à

une septicémie conduit au choc septique souvent léthal. Le TNF- $\alpha$  est aussi impliqué dans la physiopathologie de plusieurs maladies auto-immunes tel que l'arthrite rhumatoïde (Edrees et al., 2005) et la maladie de Crohn (Nahar et al., 2003).

Par ailleurs, le TNF- $\alpha$  possède un rôle majeur dans les mécanismes d'insulinorésistance caractéristique de l'obésité et il y intervient de plusieurs façons. D'une part, le contrôle négatif du signal de l'insuline peut provenir de la dégradation de l'hormone ou de l'arrêt du signal intracellulaire suivant la fixation de l'insuline à son récepteur et c'est à ce niveau qu'intervient le TNF- $\alpha$  (Figure 1). En effet, cette cytokine pro-inflammatoire va induire d'une part l'expression de SOCS-3 (*Suppressor of Cytokine Signaling 3*) dans le tissu adipeux et l'activation de JNK (*Jun N-terminal Kinase*), deux molécules qui vont induire la phosphorylation des Ser/Tyr d'un important substrat du récepteur de l'insuline, la protéine IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate-1*) (Aguirre et al., 2000, Rui et al., 2002). D'autre part, SOCS-3 favoriserait en plus l'ubiquitination et la dégradation des protéines IRS-1 et IRS-2 (*Insulin Receptor Substrate-2*), deux substrats du récepteur de l'insuline (Rui et al., 2002). La phosphorylation et la dégradation des protéines IRS entraînent donc un contrôle négatif de la signalisation à l'insuline manifestée par une résistance à cette dernière.

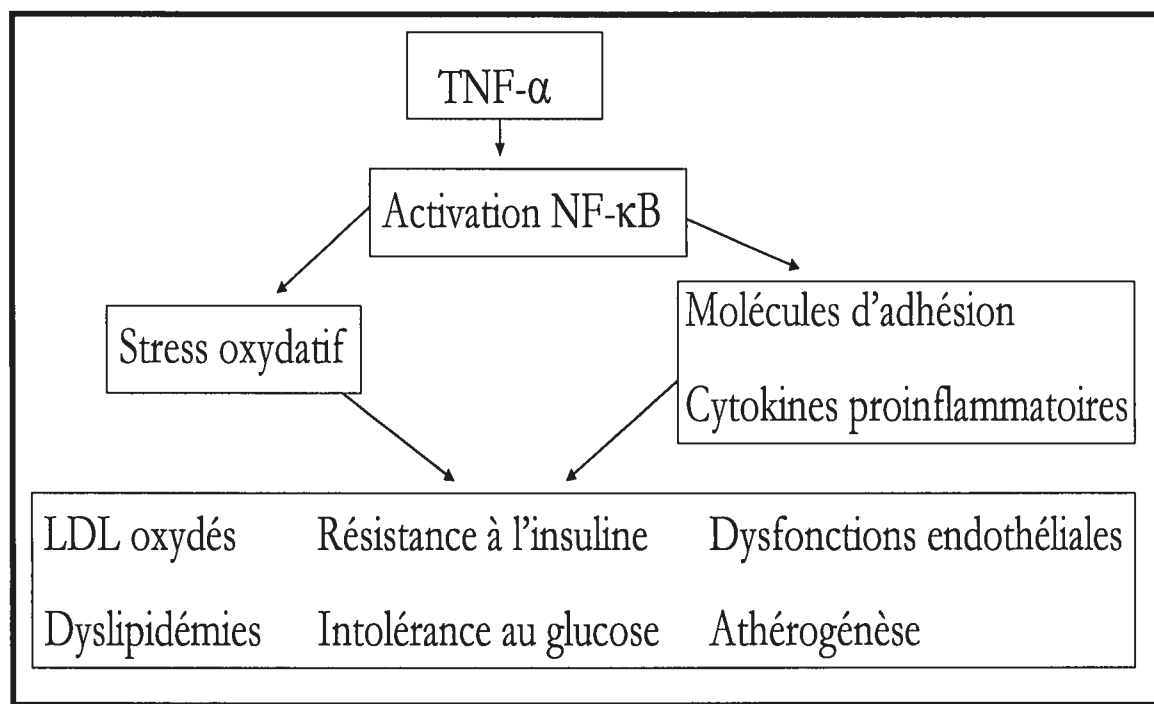


**Figure 1 : Contrôle négatif de la signalisation à l'insuline par la phosphorylation des Ser/Tyr des protéines IRS.**

*Tiré de Capeau J. 2003*

Le TNF- $\alpha$  semble impliqué non-seulement dans le développement de la résistance à l'insuline (Hotamisligil et al., 1995, Skolnik et al., 1996, Ruan et al., 2003) mais également dans la physiopathologie du diabète de type 2, des dyslipidémies et de l'hypertension (Sonnenberg et al., 2004). En effet, des niveaux élevés de TNFR1B (*soluble TNF receptor superfamily 1B*) sont retrouvés chez des adultes non-obèses qui ont une dyslipidémie athérogénique (Rosenson et al., 2004). Sonnenberg et al. (Sonnenberg et al., 2004) ont proposé la voie d'activation du NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor-kappaB*) comme étant une voie centrale menant au développement des comorbidités énumérées précédemment (Figure 2) L'activation de cette voie par le TNF- $\alpha$  produit par le tissu adipeux stimulerait la production d'IL-6 et d'IL-8 ainsi que des produits de la peroxydation des lipides (LDL oxydés) (Sonnenberg et al., 2004). L'activation du NF- $\kappa$ B induirait également un stress oxydatif avec production de  $O_2^-$  et NO, lesquels sont impliqués dans le développement de l'hypertension, de l'athérosclérose et du diabète (Weyer et al., 2000). Le TNF- $\alpha$  agirait également en

inhibant l'activité de la lipoprotéine lipase contribuant ainsi aux dyslipidémies de l'obésité (Feingold et al., 1989, Frühbeck et al., 2001).



**Figure 2 : Implication de la voie d'activation du NF-KB (Nuclear factor-kappaB) dans le développement de plusieurs comorbidités associées à l'obésité.**

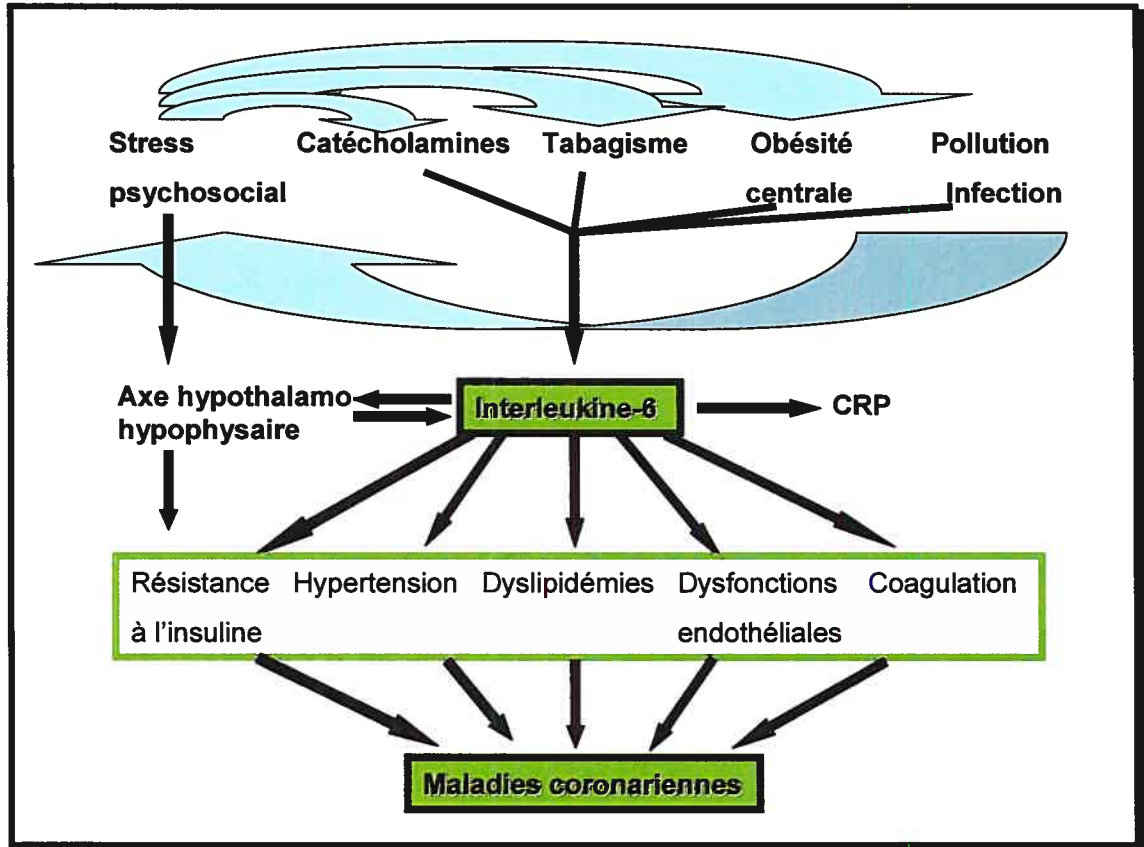
*Adapté de Sonnenberg et al. 2004*

### 1.3.4. L'interleukine-6 (IL-6)

L'IL-6 est une glycoprotéine de 184 a.a. et de 26 kDa. Tout comme le TNF- $\alpha$ , elle est produite principalement par les macrophages, mais elle est également relâchée par plusieurs tissus en réponse à la stimulation par l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  produits par des monocytes activés. L'IL-6 exerce des actions pléiotropiques sur différents tissus et cellules. Un des effets majeurs de l'IL-6 est l'induction de CRP par les hépatocytes. Toutefois, elle stimule également la différenciation des cellules B en plasmocytes et la promotion de l'hématopoïèse et la synthèse de fibrinogène via son action sur les

hépatocytes. Une forte corrélation entre le taux circulant de CRP et le contenu en IL-6 dans le tissu adipeux a été rapportée (Yudkin et al., 1999, Bastard et al., 2000). L'IL-6 agit sur l'hypothalamus afin d'augmenter la température corporelle et limiter l'invasion bactérienne ou virale et stimule également la résorption osseuse. Tout comme le TNF- $\alpha$ , cette cytokine est produite dans l'obésité (Mohamed-Ali et al., 1997, Fried et al., 1998, Vozarova et al., 2001, Ziccardi et al., 2002) en partie par les adipocytes (Mohamed-Ali et al., 1997, Bastard et al., 2000). Il existe par ailleurs une forte relation entre le contenu en IL-6 dans le tissu adipeux et les concentrations circulantes d'IL-6 et de CRP (Nonogaki et al., 1995).

Plusieurs rôles ont été accordés à l'IL-6 dans les comorbidités associées à l'obésité. Premièrement, l'IL-6 diminue l'activité de la lipoprotéine lipase dans le tissu adipeux (Yudkin et al., 2000), augmente la sécrétion hépatique de triglycérides (Nonogaki et al., 1995) et entraîne une diminution des taux des HDL sanguins contribuant ainsi aux dyslipidémies associées à l'obésité. En second lieu, l'IL-6 a été proposée comme étant l'élément central reliant l'inflammation, les maladies coronariennes et l'obésité (Figure 3). En troisième lieu, des études récentes ont suggéré que l'IL-6 pourrait être impliquée dans la résistance à l'insuline et ses complications (Bastard et al., 2000). Le récepteur de l'IL-6 appartient à la famille des cytokines impliquant la voie JAK/STAT (*Janus Kinases/ Signal Transducers and Activators of Transcription*) (Ihle et al., 1995). L'activation des kinases Janus induit la phosphorylation des STATs qui se dimérisent, migrent au noyau et régulent la transcription du gène cible (Ihle et al., 1995). Il est maintenant clairement établi qu'il y a une forte interaction entre l'IL-6 et les voies de signalisation de l'insuline. Toutefois, les mécanismes exacts ne sont pas encore élucidés, mais il s'avère que l'IL-6 diminue significativement l'action de l'insuline (Kroder et al., 1996, Hostamisligil et al., 1996, Yudkin et al., 2000, Money et al., 2001, Grimble et al., 2002, Lagathu et al., 2003, Rieusset et al., 2004).



**Figure 3 : IL-6 comme élément central reliant l'inflammation, l'obésité, le stress et les maladies coronariennes.**

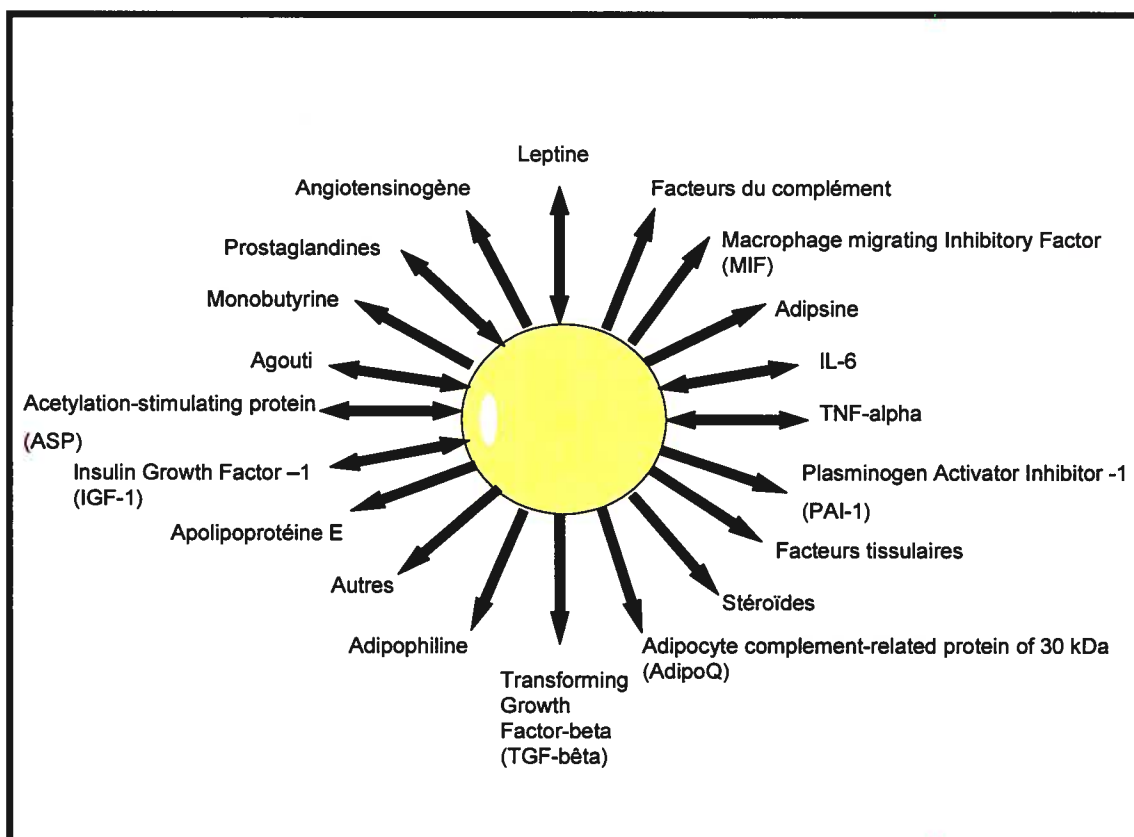
*Adapté de Yudkin et al. 2000.*

### 1.3.5. D'où viennent les taux élevés de TNF- $\alpha$ et d'IL-6 dans l'obésité?

Le tissu adipeux serait, au moins en partie, à l'origine des cytokines pro-inflammatoires, appelées adipokines, qui sont produites en excès dans l'obésité. Le tissu adipeux produit plusieurs facteurs impliqués dans la régulation de la balance énergétique, de façon endocrine, paracrine ou autocrine (Weyer et al., 2000). En effet, les adipocytes produisent et sécrètent des acides gras, des hormones, des facteurs de croissance, des régulateurs du métabolisme des lipides (lipoprotéine lipase, apolipoprotéine E, *cholesterol ester transfer protein*) ainsi que plusieurs médiateurs de l'inflammation dont le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (Figure 4). Le tissu adipeux contribuerait



d'ailleurs à la production de 15 à 35 % de l'IL-6 systémique autant chez les sujets minces que chez les sujets obèses (Mohamed-Ali et al., 1997), mais à l'inverse, la production de TNF- $\alpha$  par le tissu adipeux est négligeable autant chez les sujets minces qu'obèses (Mohammed-Ali et al., 1997). Il existe toutefois une différence dans la production de cytokines pro-inflammatoires par la graisse viscérale versus la graisse abdominale. La graisse viscérale semble contribuer de façon prédominante à la production des cytokines pro-inflammatoires : le tissu adipeux viscéral produit trois fois plus d'IL-6 que le tissu adipeux sous-cutané (Fried et al., 1998). Ceci suggère que la graisse abdominale n'est pas directement impliquée dans les niveaux circulants élevés de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 observés dans l'obésité. Une preuve non négligeable de ceci est que la liposuction n'entraîne pas de changement significatif dans les concentrations circulantes d'IL-6, de TNF- $\alpha$  et de CRP (Klein et al., 2004). À l'inverse, on note une diminution marquée des niveaux plasmatiques de ces deux cytokines lors de perte de poids chez des sujets obèses (Bastard et al., 2000, Ziccardi et al., 2002, Kopp et al., 2003, Nicklas et al., 2004, Vendrell et al., 2004). Encore une fois, la perte de poids est donc un moyen pouvant diminuer significativement l'état inflammatoire chez les obèses.



**Figure 4: L'adipocyte et ses adipocytokines.**

*Adapté de Frühbeck et al 2001.*

La production des cytokines pro-inflammatoires par les adipocytes a cependant été contestée par d'autres études. Il a en effet été démontré *in vitro* que la production et la synthèse d'IL-6, de TNF et de fibrinogène pouvaient provenir des monocytes circulants (Moroshi et al., 1996, Shanmugam et al., 2003) et que l'élévation des niveaux circulants d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  chez les obèses pourrait principalement résulter d'un relâchement d'IL-8 par des cellules non-adipeuses du tissu adipeux comme les macrophages (Bruun et al., 2004). Plus de 90 % du relâchement des adipokines peut-être attribué aux cellules non-adipeuses (Fain et al., 2004). Il a également été rapporté que certains gènes associés à la réponse inflammatoire retrouvés dans les macrophages du tissu adipeux sont régulés à la hausse chez les souris obèses ob/ob et ce, avant une augmentation des niveaux circulants d'insuline. Sous traitement à la rosiglitazone, une drogue augmentant la sensibilité à l'insuline, les gènes exprimés dans les macrophages sont régulés à la baisse, suggérant que les macrophages retrouvés dans le tissu adipeux

pourraient participer activement à l'obésité morbide et pourraient également contribuer à la pathogénèse de l'insulinorésistance (Xu et al., 2003). Il semblerait donc, d'après ces auteurs, que le tissu adipeux n'ait qu'une contribution limitée dans l'élévation de la concentration des cytokines pro-inflammatoires circulantes observée dans l'obésité. La production d'IL-6 et du TNF- $\alpha$  pourrait par conséquent résulter de la stimulation des monocytes par divers inducteurs métaboliques en excès dans l'obésité.

### **1.3.6. Causes de l'induction du TNF- $\alpha$ et de L'IL-6 dans l'obésité**

Les causes de l'induction du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 dans l'obésité sont incertaines. Toutefois, de plus en plus d'études vont dans un même sens. Compte tenu du fait que le bilan biochimique rencontré chez les individus obèses est particulier, pourrait-il être la cause d'élévation des taux de TNF- $\alpha$  et d'IL-6? Bon nombre d'évidences démontrent en effet que l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, l'hyperleptinémie, l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie sont des agents causaux de l'élévation de ces deux cytokines pro-inflammatoires chez les individus obèses.

#### **1.3.6.1. Hyperglycémie**

Il a été clairement démontré que l'hyperglycémie stimule la synthèse et la sécrétion de TNF- $\alpha$  tant par les monocytes humains frais qu'avec certaines lignées cellulaires monocytaires (THP-1 et U-937) (Moroshi et al., 1996, Guha et al., 2000, Shanmugam et al., 2003). La stimulation chronique (18 heures) à des concentrations élevées de glucose (15 mmol/L) entraîne un stress oxydatif et la production de dérivés oxygénés qui stimulent la transcription du TNF- $\alpha$  par l'intermédiaire de l'activation de la voie du NF- $\kappa$ B et de la protéine AP-1 (*activator protein-1*). Des concentrations élevées de glucose in vitro induiraient non seulement une augmentation de l'expression du TNF- $\alpha$  mais également l'expression de plusieurs molécules d'adhésion sur des cellules THP-1 (Shanmugam et al., 2003) ainsi qu'une augmentation significative d'IL-6 circulante (Wasmuth et al., 2004).

### 1.3.6.2. Hyperinsulinémie

L'hyperinsulinémie observée dans l'obésité semble induire la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les cellules mononucléées périphériques (Kirwan et al., 2001). Ces derniers ont montré que la masse graisseuse, proportionnelle à l'hyperglycémie et à l'hyperinsulinémie, pourrait contribuer à la production de TNF- $\alpha$ . D'autres études ont investigué les effets de l'insuline sur la réponse anti-inflammatoire. Dandonna et al. (Dandonna et al., 2001) ont étudié l'activation de NF- $\kappa$ B et la génération d'espèces réactives d'oxygène (ROS ou *Reactive Oxygen Species*) suite à une infusion d'insuline chez des individus obèses. Une réduction de NF- $\kappa$ B, une augmentation de I $\kappa$ B (*inhibitor of NF- $\kappa$ B*) et une diminution de la génération de ROS ont été observés, indiquant en conséquence que l'insuline semble produire un effet anti-inflammatoire. En plus, l'ARN messager et la protéine du TNF- $\alpha$  dans le tissu adipeux humain corrélaient positivement avec l'hyperinsulinémie (Hotamisligil et al., 1995, Hubert et al., 1999).

### 1.3.6.3. Hyperleptinémie

Chez les individus obèses, les taux plasmatiques de leptine et l'expression d'ARN messager dans le tissu adipeux (Vidal et al., 1996) augmentent de façon proportionnelle à l'IMC (Considine et al., 1996). Suite à l'augmentation de la leptinémie, une résistance à la leptine survient et une diminution de signalisation de l'insuline dans les cellules  $\beta$  du pancréas mène à une hypersécrétion chronique d'insuline. L'hyperinsulinémie contribue à une augmentation de la biosynthèse de la leptine et de sa sécrétion par le tissu adipeux entraînant ainsi une désensibilisation de la signalisation de la leptine dans le tissu pancréatique. Ceci contribue au développement de diabète non-insulinodépendant chez les patients obèses (Seufert J., 2004) et suggère donc que la leptine pourrait exercer des fonctions biologiques périphériques grâce à sa structure semblable à celle des cytokines (Ahima et al., 2000). Le récepteur de l'insuline appartient d'ailleurs à la classe I des récepteurs des cytokines et plusieurs études ont démontré une augmentation de la réponse inflammatoire chez des patients non obèses présentant une hyperleptinémie (Van

dielen et al., 2001). Un lien entre la leptinémie et l'état inflammatoire a été décrit chez les sujets obèses (Mantzoros et al., 1997, Loffreda et al., 1998). La surexpression de TNF- $\alpha$  et de la leptine dans l'obésité engendrerait par conséquent une production d'IL-6 et de CRP, contribuant à un risque accru de diabète et de maladies cardiovasculaires (Loffreda et al., 1998, Bullo et al., 2003). Fait à noter, la leptine contrôle aussi la production de TNF- $\alpha$  et l'activation des macrophages (Loffreda et al., 1998).

#### **1.3.6.4.Lipides**

Les lipides semblent également influencer les taux circulants du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6. Han et al. (Han et al., 2002) ont rapporté que la production de ces deux cytokines était plus élevée chez des sujets ayant une hypercholestérolémie modérée et sous diète riche en gras hydrogénés. L'équipe de Mizia-Stec (Mizia-Stec et al., 2003) a pour sa part étudié les liens entre les hyperlipidémies et le niveau sérique du TNF- $\alpha$ . Les résultats obtenus ont montré une corrélation négative entre le niveau circulant de TNF- $\alpha$  et le cholestérol HDL et une corrélation positive avec les triglycérides.

##### *1.3.6.4.1. Triglycérides et acides gras libres*

Les acides gras libres et les triglycérides en excès dans la diète augmenteraient significativement l'expression de l'ARN messager du TNF- $\alpha$  (Morin et al., 1997) et des concentrations du TNF- $\alpha$  (Moon et al., 2004) et d'IL-6 (Fernandez-Real et al., 2003) via l'induction d'un stress oxydatif généré par les cellules mononucléées (Tripathy et al., 2003). L'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentanoïque (EPA) augmentent la production de TNF- $\alpha$  de 21 % et 15 % respectivement et d'IL-6 de 69 % et 40 % respectivement (Tappia et al., 1995). Par ailleurs, une diète riche en oméga-3 entraîne une diminution marquée des taux sériques de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 (Purasiri et al., 1994, Adam et al., 2003, Muurling et al., 2003, O'Shea et al., 2004). L'obésité centrale corrèle positivement avec une forte teneur du tissu adipeux en acides gras polyinsaturés  $\omega$ -6 mais négativement avec la présence d'acides gras monoinsaturés et polyinsaturés  $\omega$ -3 (Garaulet et al., 2001).

D'autre part, la stimulation des monocytes humains par des acides gras libres induirait une augmentation de la liaison du NF- $\kappa$ B, une diminution d'I $\kappa$ B- $\beta$  et une augmentation de la transcription du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 (Ghanim et al., 2004). Un défaut dans la sensibilité à l'insuline a été étroitement associé à une augmentation plasmatique des acides gras libres, de proportions élevées d'acide palmitique (16 :0) et de faibles taux d'acide linoléique (18 :2  $\omega$ -6) (Vessby et al., 2002).

#### 1.3.6.4.2. Cholestérol

Chez des patients ayant une hypercholestérolémie, le LDL en excès infiltre les artères, est retenu dans l'intima où il subit des attaques oxydatives et enzymatiques menant à un relâchement de phospholipides qui activent les cellules endothéliales. L'expression de molécules d'adhésion et de gènes associés à la réponse inflammatoire par ces cellules est augmentée et contribue à l'initiation du processus inflammatoire dans les artères. Les monocytes recrutés au site par cette accumulation de lipides sont différenciés en macrophages qui relâchent des cytokines inflammatoires occasionnant un dommage tissulaire. Une plaque athérosclérotique est alors formée. Cette dernière agit sur le tissu adipeux via une relâche du TNF, de l'IL-1 et de l'IFN- $\gamma$ . Le tissu adipeux libère, en réponse à ces médiateurs inflammatoires, de l'IL-6 qui agira sur le foie et entraînera la libération de protéines de phase aiguë. Il semble donc que l'inflammation soit activée par les lipides (Svenungsson et al., 2003). De plus, il a été rapporté que l'augmentation du niveau de cholestérol RPL (*Remnant-like Particle*) postprandial est associée à une élévation du niveau plasmatique de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 (Twickler et al., 2003).

## 1.4. Problématique

Plusieurs études chez les obèses rapportent des taux plasmatiques de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 plus élevés que chez les sujets minces (Hube et al., 1999, Ziccardi et al., 2002, Bullo et al., 2003). Cependant, l'écart entre obèses et minces n'est pas très marqué (Tableau III).

**Tableau III : Concentrations plasmatiques du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 rencontrées chez des individus minces et obèses.**

Référence	n	TNF- $\alpha$ (ng/L)		IL-6 (ng/L)	
		Sujets minces	Sujets obèses	Sujets minces	Sujets obèses
Bastard et al., 2000*	29	0,74	1,48	0,39	2,78
Ziccardi et al., 2002*	96	3,6	5,8	1,4	3,18
Moon et al., 2004*	71	5,88	18,15	-	-
Spranger et al., 2003*	27548	1,79	2,08	1,67	2,45
Bruun et al., 2003*	29	-	-	2,5	4,1
Yudkin et al., 1999*	107	3,18	4,12	1,35	3,22
Hukshorn et al., 2004*	10	-	-	0,62	1,32
Ghanim et al., 2004*	32	2,729	3,613	1,47	3,308

\*p= < 0,05

Alors que la majorité des études ont rapporté une augmentation significative des taux plasmatiques de TNF- $\alpha$ , certaines équipes n'ont toutefois pas détecté d'augmentation significative de TNF- $\alpha$  chez les sujets obèses en comparaison à des sujets minces. (Mohamed-Ali et al., 1997). Malgré tout, le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 semblent corrélés positivement avec l'IMC (Mohammed-Ali et al., 1997, Vgontzas et al., 1997, Ziccardi et al., 2002).

Il est difficile pourtant d'affirmer sans aucun doute que les concentrations de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 sont bien différentes entre les individus minces et les individus obèses. Les différences observées, quoique significatives, pourraient provenir de variations notoires entre les méthodes de dosage employées dans ces études. La détection des concentrations protéiques de cytokines est habituellement effectuée par des méthodes immunologiques de type ELISA utilisant un premier anticorps pour la capture de l'antigène cytokine et un deuxième anticorps marqué pour sa révélation.

Toutefois, ces méthodes sont limitées par leur manque de sensibilité et par le fait qu'elles présentent un important problème de standardisation entre les différents fabricants de trousses. La comparaison des résultats obtenus par deux techniques est par conséquent difficile et ces divergences sont principalement reliées à la nature des étalons (Bienvenu et al., 1993). D'autres causes peuvent être sources d'erreurs dans le dosage des cytokines, notamment la présence de protéines liant ces cytokines et la présence de substances interférentes.

Une alternative à ces limitations est la quantification de l'expression de l'acide ribonucléique messager (ARNm) des cytokines. Plusieurs méthodes ont été proposées. Citons par exemple les essais de type Northern, l'hybridation *in situ*, les essais de protection à la RNase et les puces à ARN (ou ADNc). Toutefois, la RT-PCR, par sa sensibilité difficilement surpassable et sa grande plage de valeurs mesurables, s'avère un outil bien plus puissant pour quantifier les cytokines qui sont exprimées à un très faible niveau. Un test moléculaire plus sensible et standardisé serait utile pour mettre en évidence ou non une différence significative des taux sanguins du TNF- $\alpha$  entre les individus obèses et les sujets contrôles via le dosage de leurs ARN messagers.

En second lieu, les causes et l'origine de la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 rapportées dans la littérature sont discutables. D'une part, il a été rapporté que l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, l'hyperleptinémie, l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie sont possiblement des agents causaux de l'élévation de ces deux cytokines pro-inflammatoires chez les individus obèses. Par contre, les concentrations employées sont peu représentatives des concentrations physiologiques rencontrées chez les gens présentant une obésité. D'autre part, les systèmes utilisés à ce jour sont fort variés : lignées cellulaires U937 et THP-1, cellules mononucléées et monocytes humains. À notre connaissance, aucune étude n'a utilisé une matrice de sang total pour vérifier le plus fidèlement possible l'origine de la production du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 dans l'obésité. Il serait par conséquent intéressant de vérifier les effets des concentrations élevées de glucose, d'insuline, de cholestérol et de triglycérides en utilisant une matrice de sang total pour recréer *ex vivo* un modèle de la biochimie de l'obésité.



## 1.5. Méthodes de quantification des cytokines

La quantification des cytokines s'avère très utile pour élucider les voies inflammatoires et pathologiques impliquées dans plusieurs réactions inflammatoires, maladies auto-immunes et les réactions de rejet de transplantation. L'augmentation de leur production est rencontrée dans plusieurs fluides corporels comme le sang, les liquides synovial, cérébrospinal, amniotique et bronchoalvéolaire. De plus, les concentrations des cytokines reflètent la sévérité de ces affections et sont en plus de bons marqueurs pronostiques. Connaître le profil des cytokines impliquées dans ces processus est donc essentiel pour mieux comprendre et traiter ces maladies. Pourtant, tel que rapporté précédemment, la détection des cytokines au niveau protéique, habituellement effectuée par les méthodes immunologiques de type ELISA est limitée par leur manque de sensibilité, par un important problème de standardisation entre les différents fabricants de trousse ainsi que par la présence de protéines et d'autoanticorps liant ces cytokines.

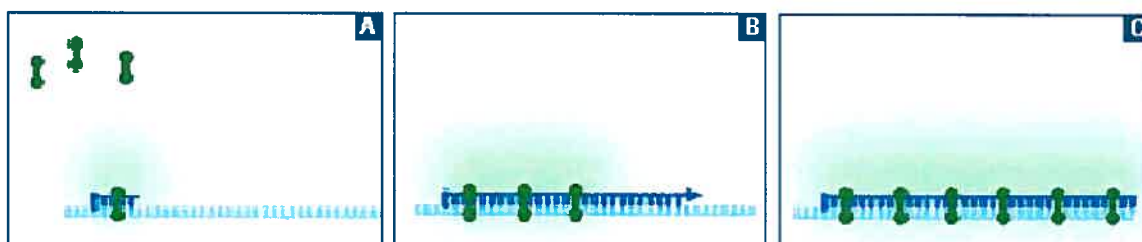
### 1.5.1. La RT-PCR en temps réel : Principes et applications cliniques

La RT-PCR en temps réel (*Real time RT-PCR* ou *Real time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) est une puissante innovation technologique permettant la quantification d'acides ribonucléiques messagers (ARNm) exprimés à de très faibles concentrations. Après une étape préalable de transcription inverse où l'ARNm est transcrit en ADNc, les échantillons sont soumis à une PCR en temps réel et quantifiés de façon relative ou absolue. Le terme « temps réel » vient du fait que les produits de PCR formés sont visualisés par un rapporteur fluorogénique au fur et à mesure que la PCR évolue dans le temps.

#### 1.5.1.1. Systèmes de détection

Plusieurs systèmes de détection basés sur le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET ou *Fluorescence Resonance Energy Transfert*) tel que les

sondes d'hybridation, les systèmes TaqMan et Scorpions, ont été développés mais ils sont très coûteux. L'utilisation du SYBR green I, est une alternative économique pour détecter la formation de produits de PCR. Le SYBR green I est un composé organique aromatique qui lie spécifiquement l'ADN double brin au niveau du sillon mineur. Au cours de la réaction de PCR, il lie les produits d'ADN au fur et à mesure qu'ils sont formés (Figure 5). Sa fluorescence est mesurée à la fin de chaque élongation et son intensité est proportionnelle à la quantité de produits de PCR formés au cours de chacun des cycles.



**Figure 5 : Le SYBR green I s'intercale entre les doubles brins d'ADN formés au cours de la PCR.**

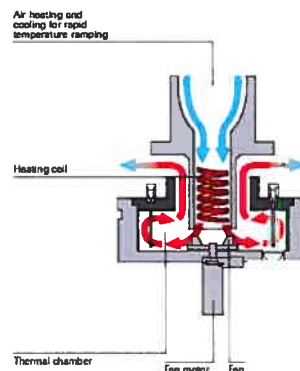
### 1.5.1.2. Appareils

Bon nombre d'instruments sont maintenant disponibles pour réaliser une RT-PCR en temps réel sur le marché. Entre autres, le LightCycler (Roche Molecular Biochemicals Mannheim, Allemagne), utilisé dans le cadre de cette étude, effectue des PCR en temps réel en utilisant l'air pour les cycles thermiques de la PCR. L'air ambiant est projeté à l'intérieur de l'appareil par un ventilateur puis est chauffé ou refroidi par un élément chauffant. (Figure 6) L'instrument parvient à réchauffer l'échantillon à un rythme de 20 °C par seconde, ce qui représente un taux dix fois supérieur aux thermocycleurs classiques fonctionnant à l'eau ou à l'huile. Ainsi, une PCR en temps réel de 30 à 40 cycles effectuée sur le LightCycler est terminée en dedans de 30 minutes.

a)



b)



**Figure 6 : a) Le LightCycler de Roche Molecular Biochemicals et b) son système thermal.**

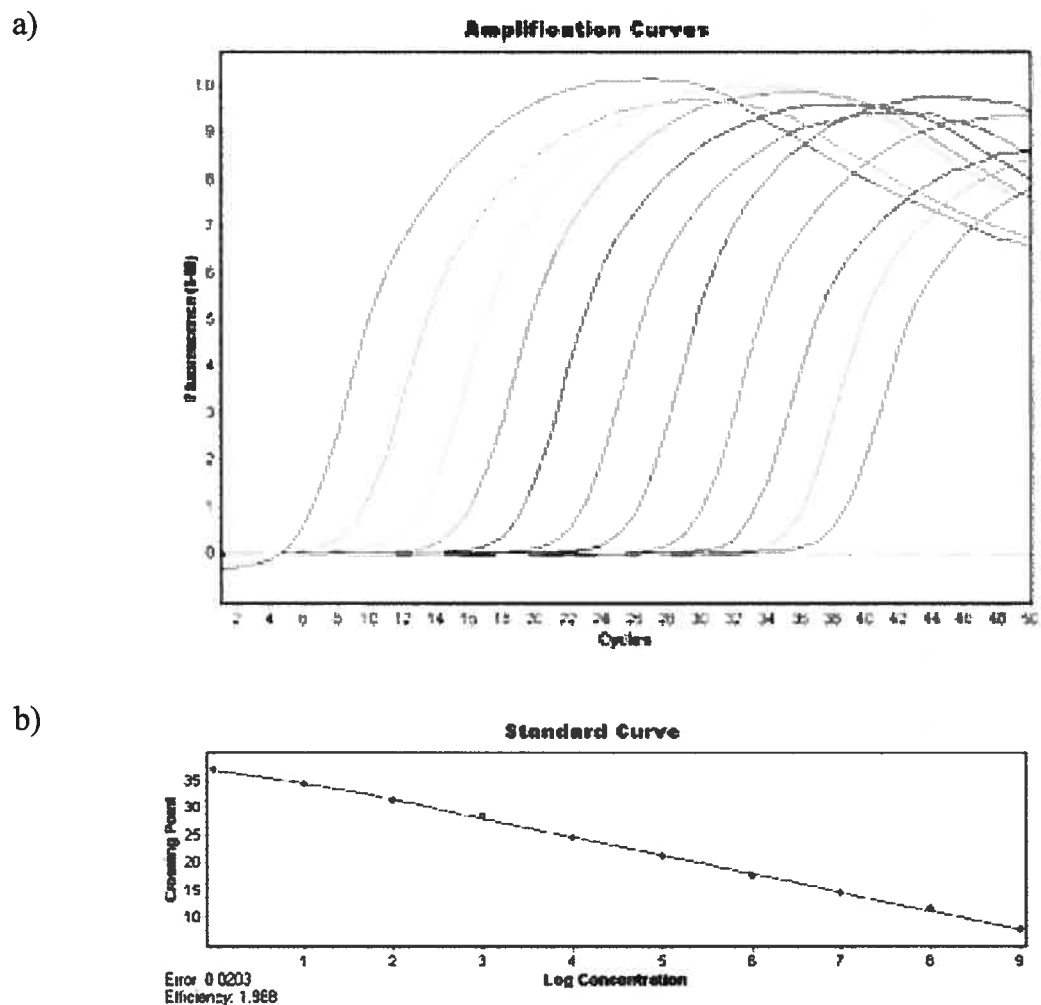
### 1.5.1.3. Quantification

La quantification des résultats obtenus par RT-PCR en temps réel peut s'effectuer de plusieurs façons dont via l'utilisation de courbes étalons. À partir d'une quantité connue d'ARN, des dilutions sériées de l'échantillon sont effectuées formant ainsi des courbes où le signal de fluorescence pour chaque quantité d'ARN est établi. Il est par la suite possible d'extrapoler la valeur d'un spécimen inconnu à partir d'une courbe étalon établie à partir de ces valeurs (Figure 7). Ce type de quantification est appelé « absolue » par opposition à quantification relative où les changements d'expression d'un gène sont comparés à l'expression d'un gène de référence.

### 1.5.1.4. Spécificité de la PCR

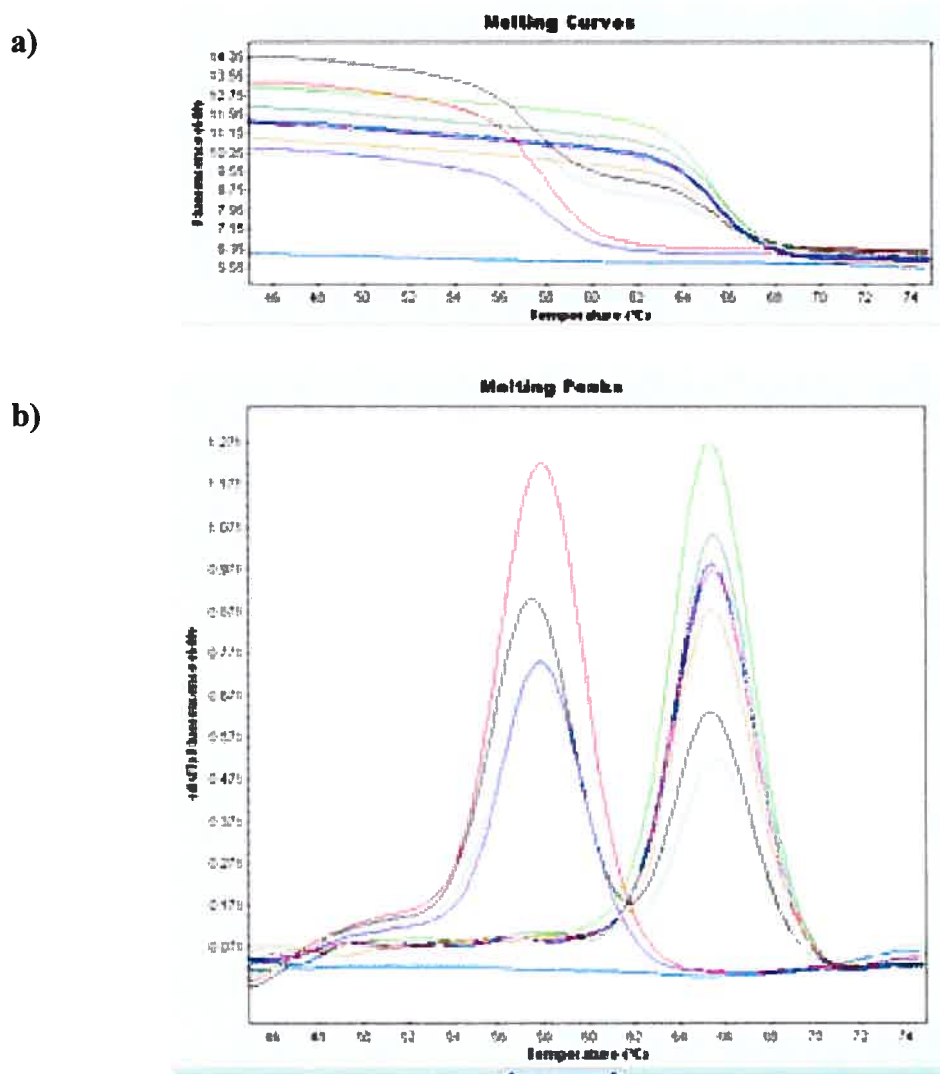
La spécificité des produits amplifiés s'effectue par la vérification de la température de fusion ( $T_m$  ou *melting temperature*), c'est-à-dire la température à laquelle 50 % des brins d'ADN formés se dénaturent. Les produits de PCR amplifiés ont une taille et un contenu en oligonucléotides connus qui correspondent à une température de fusion précise. À la fin de chaque routine de PCR, l'appareil effectue une courbe de température au cours de laquelle l'intensité de la fluorescence est captée

à chaque augmentation de 0,1 °C. La fluorescence chute drastiquement lorsque la température de l'appareil atteint le point de fusion des produits de PCR formés. Par la suite, le logiciel effectue un graphique du dérivé de la fluorescence en fonction de la température. Un pic est alors observé à la température de fusion spécifique au produit amplifié et indique que la fluorescence du SYBR Green I est une mesure directe de l'accumulation du produit d'intérêt (Figure 8).



**Figure 7 : Quantification d'ARNm par PCR quantitative en temps réel sur le système Light Cycler.**

a) Signal de fluorescence en fonction du nombre de cycles effectués par PCR quantitative en temps réel sur le système Light Cycler. Les courbes de gauche à droite correspondent à  $10^{10}$ ,  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  et 1 copie(s)/réaction. La courbe n'ayant subi aucune amplification correspond à un échantillon négatif. b) Courbe étalon d'où les quantités d'ARN d'échantillons inconnus sont extrapolées.



**Figure 8 : Spécificité de la PCR.**

Vérification de la spécificité des fragments amplifiés via l'obtention d'une température de fusion attendue pour chaque produit amplifié. Dans cet exemple, deux produits différents ont été amplifiés. a) La fluorescence des échantillons diminue au fur et à mesure que la température augmente. b) Dérivée de la fluorescence en fonction de la température.

## **2. OBJECTIFS**

### **2.1. Mise au point d'une méthode RT-PCR en temps réel pour le dosage du TNF- $\alpha$ et de l'IL-6.**

Le dosage des cytokines par les méthodes immunologiques n'est pas assez sensible pour détecter des taux de cytokines inférieurs à 1 ng par litre. Les données de la littérature ne sont pas très convaincantes pour démontrer la surexpression de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  dans l'obésité. Pour pallier cette limitation, nous allons, dans un premier temps, tenter de quantifier les deux cytokines par RT-PCR en temps réel.

### **2.2. Vérification de la production de TNF- $\alpha$ et d'IL-6 par les cellules périphériques circulantes.**

Dans un deuxième volet, nous allons vérifier si les cellules circulantes périphériques sont impliquées dans la surproduction d'IL-6 et du TNF- $\alpha$ . Les niveaux d'expression leucocytaire d'IL-6 et du TNF- $\alpha$  seront comparés chez des individus obèses, des individus en surcharge pondérale et des individus minces (individus contrôles). Comme il n'y a aucune citation dans la littérature des valeurs de référence pour l'ARN messager de l'IL-6 ou du TNF- $\alpha$ , nous comptons rapporter la distribution des taux d'ARNm pour ces deux cytokines dans un échantillon de la population et établir pour la première fois des valeurs de référence pour ces taux.

### **2.3. Investigation du potentiel pro-inflammatoire de certains paramètres biochimiques rencontrés en excès dans l'obésité**

Dans un troisième temps, nous allons investiguer le potentiel pro-inflammatoire de plusieurs paramètres biochimiques perturbés dans l'obésité. Des corrélations positives ont été rapportées entre l'hyperglycémie, les acides gras libres et

triglycérides, le cholestérol et la leptine dans le sang et l'expression et/ou la production du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6. À l'inverse, l'insuline semblerait plutôt produire un effet anti-inflammatoire. Les systèmes utilisés dans ces études sont toutefois variés : lignées cellulaires U-937 et THP-1, cellules mononucléées et monocytes humains. L'utilisation d'une matrice sanguine n'a cependant pas été utilisée à ce jour. Nous espérons reproduire l'effet de ces différents facteurs dans un environnement semblable à celui retrouvé in vivo chez les sujets obèses. Une telle démonstration confirmerait le lien entre des facteurs métaboliques en excès et une réponse immunitaire via des cytokines pro-inflammatoires.

Des échantillons de sang total d'individus minces ont été stimulés soit par le glucose, l'insuline, un mélange de triglycérides et de cholestérol et finalement par la leptine à des concentrations rencontrées chez des individus obèses. Certains facteurs responsables de l'induction du gène du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 dans les cellules circulantes périphériques pourront ainsi être confirmés.



### **3. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **3.1. Vérification de la production de TNF- $\alpha$ et d'IL-6 par les cellules périphériques circulantes.**

##### **3.1.1. Populations à l'étude**

Les populations visées par cette étude, approuvée par les comités scientifique et d'éthique du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) (annexes 2 et 3) et qui s'est déroulée entre avril 2005 et juillet 2006, sont des populations adultes âgées entre 30 et 60 ans, n'ayant aucun problème de santé apparent (évalué à l'aide d'un questionnaire présenté à l'annexe 4), présentant des bilans biochimiques et hématologiques normaux mais ayant différents indices de masse corporelle. Sur les 77 patients recrutés, 55 ont terminé l'étude, 22 ont été exclus (critères d'inclusion non respectés lors du recrutement ou dosages biochimiques trois écarts-types hors des valeurs normales). Les sujets ont été classifiés dans les catégories suivantes selon leur IMC : individus présentant un poids normal (IMC entre 18,5 et 24,9 kg/m<sup>2</sup>), individus présentant un excès de poids (IMC se situant entre 25,0 et 29,9 kg/m<sup>2</sup>) et individus obèses (IMC supérieur à 30,0 kg/m<sup>2</sup>). Vingt-deux sujets présentant un poids normal (10 femmes et 12 hommes), 20 sujets présentant un excès de poids (6 femmes et 14 hommes) et 13 sujets obèses (7 femmes et 6 hommes) ont été recrutés dans le cadre de cette étude. Aucun abandon n'est survenu.

Aucun des sujets recrutés ne présentait d'histoire de tabagisme, de maladie auto-immune ou inflammatoire chronique, d'infection au cours des quatre dernières semaines, de chirurgie ou de traumatisme physique au cours des deux derniers mois, d'allergies, de cancer, d'hyperlipidémie primaire, d'histoire médicale de greffe, d'histoire connue d'alcoolisme et aucun sujet n'avait subi de changement de poids supérieur à 5 % de son poids initial au cours des trois derniers mois. Tous les patients ont confirmé qu'ils n'avaient pas pris d'anti-inflammatoires de tous genres au cours du mois précédant le prélèvement sanguin. Aucune des femmes recrutées n'était enceinte,

sous hormonothérapie ou n'avait subi d'hystérectomie ou d'ovariectomie. En plus des critères d'exclusion mentionnés précédemment, aucun des sujets contrôles, c'est-à-dire ayant un poids normal, ne présentait de diabète, d'hypertension, d'apnée du sommeil, de dyslipidémie, de maladie hépatique ou rénale.

Le tableau IV compare les caractéristiques physiques et métaboliques des hommes dans les trois populations à l'étude et le tableau V, les caractéristiques physiques et métaboliques des femmes dans les trois populations à l'étude.

**Tableau IV : Caractéristiques physiques et métaboliques des hommes des populations à l'étude (n=32)**

	Poids normal (n=12)	Excès de poids (n=14)	Obèses (n=6)	Valeurs de référence au CHUM
Âge (années) *	48,0 ± 8,5	49,0 ± 8,5	51,7 ± 7,1	-
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) †	23,6 ± 0,9	26,9 ± 1,3	33,0 ± 3,2	-
Glucose (mmol/L) *	5,3 ± 0,4	6,1 ± 3,0	6,4 ± 1,5	4,0 – 6,2
Créatinine (µmol/L) *	80 ± 9	81 ± 15	77 ± 12	55 - 130
Bilirubine totale (µmol/L) *	19,3 ± 5,5	18,5 ± 6,0	13,6 ± 0,5	7 - 23
Cholestérol total (mmol/L) *	5,25 ± 1,01	5,08 ± 0,69	4,72 ± 1,41	3,16 – 7,00
Triglycérides (mmol/L) *	1,48 ± 0,58	1,30 ± 1,05	1,58 ± 0,73	0,49 – 2,82
HDL (mmol/L) ‡	1,26 ± 0,24	1,47 ± 0,31	1,15 ± 0,28	0,84 – 1,98
LDL (mmol/L) *	3,32 ± 0,91	3,02 ± 0,77	2,85 ± 0,97	1,53 – 4,88
Insuline (pmol/L) *	42 ± 25	99 ± 102	126 ± 46	21 - 174
CRP (mg/L) *	1,29 ± 0,48	2,20 ± 1,82	2,86 ± 0,84	< 5,00
Leptine (ng/L) †	3067 ± 1445	5721 ± 3912	14 669 ± 5947	ND
Numération leucocytaire (X10 <sup>9</sup> /L) *	5,0 ± 0,6	6,0 ± 1,3	6,3 ± 1,9	4,0 – 11,0

Les valeurs mentionnées dans le tableau représentent la moyenne ± l'écart-type.

† p < 0,0001

‡ p < 0,05

\* non significatif

ND : Non disponible

**Tableau V : Caractéristiques physiques et métaboliques des femmes des populations à l'étude (n=23)**

	<b>Poids normal (n=10)</b>	<b>Excès de poids (n=6)</b>	<b>Obèses (n=7)</b>	<b>Valeurs de référence au CHUM</b>
Âge (années) *	45,9 ± 9,6	47,8 ± 10,2	46,6 ± 10,3	-
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) †	21,3 ± 1,7	27,3 ± 1,9	33,4 ± 3,4	-
Glucose (mmol/L) ‡	5,0 ± 0,3	5,4 ± 0,3	6,5 ± 2,1	4,0 – 6,2
Créatinine (µmol/L) *	66 ± 9	66 ± 10	71 ± 9	55 - 130
Bilirubine totale (µmol/L) ‡	16,4 ± 3,0	10,4 ± 2,1	12,9 ± 1,5	7 - 23
Cholestérol total (mmol/L) *	5,16 ± 0,89	5,08 ± 1,04	4,84 ± 0,41	3,16 – 7,00
Triglycérides (mmol/L) ‡	0,95 ± 0,42	1,27 ± 0,57	1,82 ± 0,47	0,49 – 2,82
HDL (mmol/L) ‡	1,70 ± 0,29	1,41 ± 0,24	1,33 ± 0,28	0,84 – 1,98
LDL (mmol/L) *	3,03 ± 0,81	3,10 ± 0,93	2,69 ± 0,65	1,53 – 4,88
Insuline (pmol/L) ‡	35 ± 17	53 ± 28	197 ± 165	21 - 174
CRP (mg/L) ‡	1,51 ± 0,89	3,91 ± 2,79	5,63 ± 4,71	< 5,00
Leptine (ng/L) †	5969 ± 3520	30 791 ± 15 041	42 511 ± 16 025	ND
Numération leucocytaire (X10 <sup>9</sup> /L) ‡	5,4 ± 1,2	6,0 ± 1,4	7,0 ± 1,0	4,0 – 11,0

Les valeurs mentionnées dans le tableau représentent la moyenne ± l'écart-type.

† p < 0,0001

‡ p < 0,05

\* non significatif

ND : Non disponible

### **3.1.2. Mode de recrutement**

Les sujets ont été recrutés au Centre des prélèvements de l'Hôpital Saint-Luc du CHUM. Lors de leur visite de routine, les sujets correspondant aux critères d'inclusion et d'exclusion du projet ont été sollicités pour participer au projet. Après avoir expliqué la nature de leur participation à l'étude et répondu à leurs questionnements, les sujets ont tous fourni un consentement libre et éclairé et ont signé le formulaire à cet effet (annexe 5). Ils ont par le fait même accepté de se soumettre à un questionnaire de santé général (annexe 4) et à ce que l'on prélève un volume de sang supplémentaire (6 tubes ou 25 mL) pour effectuer l'étude.

### **3.1.3. Prélèvements sanguins**

Un prélèvement veineux unique composé de cinq tubes de 4 mL avec EDTA et un tube 5 mL avec gel séparateur, soit 25 mL de sang, a été effectué pour chacun des individus ayant participé à l'étude. Ces tubes ont servi au dosage d'un bilan de base ainsi qu'aux dosages de TNF- $\alpha$  et d'IL-6.

#### **3.1.3.1. Bilan de base**

Le bilan de base consistait en une série de tests prescrits d'emblée pour tous les patients qui nécessitent une investigation de première ligne. Généralement, ce bilan vise à investiguer la fonction hépatique, rénale et également à détecter tout désordre physiologique tel que le diabète et les dyslipidémies. Dans le cadre du suivi médical des patients obèses, les dosages sanguins recommandés par les Lignes directrices 2006 de Santé Canada incluent entre autres la glycémie à jeun, les taux de lipides à jeun (cholestérol total, triglycérides, LDL calculées, HDL) et les épreuves de la fonction hépatique. Dans le cadre de cette étude, deux paramètres d'investigation supplémentaires ont été considérés en plus de ce qui a été nommé précédemment : l'inflammation et la détection des phénomènes de résistance à l'insuline et à la leptine. Le bilan de base employé dans cette étude comprenait donc les dosages suivants

effectués à jeun : glucose, créatinine, bilirubine totale, gammaglutamyltransférase, bilan lipidique, leptine, insuline, CRP et formule sanguine complète.

### **3.1.4. Classification des sujets**

La taille et le poids déclarés par les sujets lors de leur recrutement ont été utilisés pour calculer leur IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Les sujets ont été divisés en trois catégories suivant leur IMC : individus présentant un poids normal (IMC entre 18,5 et 24,9  $\text{kg}/\text{m}^2$ ), individus présentant un excès de poids (IMC se situant entre 25,0 et 29,9  $\text{kg}/\text{m}^2$ ) et individus obèses (IMC supérieur à 30,0  $\text{kg}/\text{m}^2$ ).

### **3.1.5. Dosages biologiques**

Tous les échantillons sanguins ont été centrifugés en dedans de 40 minutes suivant le prélèvement et, s'ils n'étaient pas dosés immédiatement, les échantillons ont immédiatement été décantés et congelés à  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  jusqu'au moment de leur dosage. De plus, tous les dosages biologiques ont été faits à l'aveugle, chaque échantillon étant identifié par un code numérique.

#### **3.1.5.1. Bilan de base**

Les dosages biochimiques du bilan de base ont été effectués sur les systèmes multianalyseur Synchron LX-20, Image et LH 755 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA) et ADVIA Centaur (Bayer, Tarrytown, NY).

#### **3.1.5.2. Dosages ELISA en sandwich quantitatifs R&D systems**

Les dosages plasmatiques de la leptine et de l'IL-6 ont été faits en duplicata par une technique ELISA en sandwich quantitatif (R&D Systems, Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, Ontario) et selon les instructions fournies par les manufacturiers. La sensibilité des techniques était respectivement de 7,8 ng/L et de 0,70 ng/L (selon les manufacturiers).

### **3.1.5.3. TNF- $\alpha$ plasmatique**

Le TNF- $\alpha$  plasmatique des échantillons a été dosé en duplicata par un ELISA en sandwich quantitatif en phase solide (BD Biosciences, Mississauga, Ontario) selon les instructions incluses avec la trousse. La sensibilité rapportée de la technique était de 2 ng/L.

### **3.1.6. Isolation des cellules périphériques circulantes**

Un échantillon de sang total (EDTA) a été prélevé pour le dosage de l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6. À partir de la trousse QIAmp® RNA Blood Mini (Qiagen Mississauga, Ontario), les leucocytes ont tout d'abord été isolés sur glace à partir de 3 mL de sang total. Après une étape préalable d'hémolyse en présence d'une solution hypotonique fournie avec la trousse et suite à une centrifugation à 2500 RPM pendant 10 minutes, les leucocytes ont été récupérés puis lysés avec un tampon isothiocyanate de guanidine et  $\beta$ -mercaptoéthanol. À noter que les conditions hautement dénaturantes utilisées pour lyser les leucocytes permettent l'inactivation des RNAses et l'isolation d'ARN intact. Les lysats cellulaires ont été entreposés à  $-70$  °C jusqu'au moment de l'extraction de l'ARN avec la trousse QIAmp RNA Blood MiniKit (Qiagen, Mississauga, Ontario).

### **3.1.7. Extraction de l'ARN total**

Afin d'assurer une bonne pureté et un bon rendement, la première étape d'extraction de l'ARN total se devait d'être une homogénéisation des échantillons de lysat cellulaire conservés à  $-70$  °C. L'usage de colonnes ayant une membrane de silica-gel fournies avec la trousse ainsi que la microcentrifugation ont permis cette étape d'homogénéisation des échantillons. Enfin, une étape de traitement à la DNase visant à éliminer toute trace d'ADN a été effectuée pour chacun des échantillons. La pureté de l'ARN total a été vérifiée par l'absorbance de l'échantillon à 260 et 280 nm.

### **3.1.8. Électrophorèse à 1% d'agarose**

Après l'étape d'extraction, 200 ng d'ARN total ont été chargés sur un gel d'agarose à 1% et soumis à la migration sous 90 volts et 150 milliampères pendant 35 minutes. L'intégrité de l'ARN extrait a été vérifiée par la visualisation des bandes 18S et 28S d'ARN ribosomal après électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 %.

### **3.1.9. Transcription inverse**

150 ng d'ARN total ont été transcrits en ADNc sur le thermocycleur PTC-100 (MJ Research Inc., MA, ÉU) dans un volume réactionnel de 20  $\mu$ L contenant 1X de tampon RT (tampon commercial 5X composé de 50 mmol/L tris-HCl pH 8,3, 75 mmol/L KCl, 3 mmol/L  $MgCl_2$  et 10 mmol/L DTT) (Promega, Madison, ÉU), 4 mmol/L de dNTP (Amersham Biosciences Inc., UK), 2,5 mmol/L d'hexamères aléatoires (Amersham Pharmacia Biotech., UK), 1 U/ $\mu$ L de RNAsine (Promega, Madison, ÉU) et 10 U/ $\mu$ L de transcriptase inverse (Promega, Madison, ÉU). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 60 min. à 42 °C, inactivé à 99 °C pendant 5 min. puis refroidi à 4 °C. Les échantillons ont été conservés à 4 °C jusqu'à l'étape d'amplification. Quatre microlitres d'ADNc ont été utilisés pour les PCR quantitatives subséquentes.

### **3.1.10. Amplification par PCR en temps réel**

Les techniques d'amplification par PCR en temps réel suivantes ont toutes été développées dans le cadre de cette étude afin de quantifier l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 dans les cellules périphériques circulantes.

#### **3.1.10.1. TNF- $\alpha$**

La PCR quantitative en temps réel a été effectuée en duplicata chez tous les patients. Le volume réactionnel total était de 20  $\mu$ L contenant 1,25X de Tampon PCR (tampon maison composé de 20 mmol/l de Tris-HCl, 100 mmol/L de KCl, 1 mmol/L



de dithiothreitol, 0,1 mmol/L EDTA, 0,5 % de nonidet, glycérol à 50,4 % et H<sub>2</sub>O désionisée), 0,245 U/ $\mu$ L de Taq polymérase (Expand High Fidelity PCR System, Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne), 2,5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario), 2,45 mmol/L des amorces sens et antisens (Université McGill, Sheldon Biotechnology Centre, Montréal) et 0,1X SYBR GREEN I (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario). La PCR quantitative en temps réel a été effectuée sur le Light Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Les conditions suivantes ont été appliquées : 1 min. de dénaturation initiale à 95 °C et 30 cycles d'amplification. Chaque cycle comprend 1 sec. de dénaturation à 95 °C, 10 sec. d'appariement à 58 °C et 8 sec. d'extension à 72 °C. Le programme des courbes de température comprend 10 sec. à 95 °C, 10 sec. à 65 °C suivi d'un passage à 95 °C à raison de 0,1 °C/sec. jusqu'à 95 °C puis d'un refroidissement à 4 °C pendant 60 sec. Les amorces utilisées ont été synthétisées chez Operon Biotechnologies (Operon Biotechnologies Inc., Alabama, ÉU) et ont été conçues pour amplifier un produit de 279 pb dans la région 5'. Les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 %. Les étalons ont été préparés à partir d'un échantillon d'ARN total extrait de cellules U-937 stimulées au LPS.

### 3.1.10.2. IL-6

La PCR quantitative en temps réel a été effectuée en duplicata chez tous les patients. Le volume réactionnel total était de 20  $\mu$ L contenant 1,25X de Tampon PCR (tampon maison composé de 20 mmol/L de Tris-HCl, 100 mmol/L de KCl, 1 mmol/L de dithiothreitol, 0,1 mmol/L EDTA, 0,5 % de Nonidet, glycérol à 50,4 % et H<sub>2</sub>O désionisée), 0,245 U/ $\mu$ L de Taq polymérase (Expand High Fidelity PCR System, Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne), 4,0 mmol/L de MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario), 2,0 mmol/L des amorces sens et antisens (Université McGill, Sheldon Biotechnology Centre, Montréal) et 0,1X SYBR GREEN I (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario). La PCR quantitative en temps réel a été effectuée sur le Light Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Les conditions suivantes ont été appliquées : 1 min. de dénaturation initiale à 95 °C et 30 cycles d'amplification. Chaque cycle comprend 1 sec. de dénaturation à 95 °C, 10 sec. d'appariement à 58 °C

et 8 sec. d'extension à 72 °C. Le programme des courbes de température comprend 10 sec. à 95 °C, 10 sec. à 65 °C suivi d'un passage à 95 °C à raison de 0,1 °C/sec. jusqu'à 95 °C puis d'un refroidissement à 4 °C pendant 60 sec. Les amorces utilisées ont été synthétisées chez Operon Biotechnologies (Operon Biotechnologies Inc., Alabama, ÉU) et ont été conçues pour amplifier un produit de 251 pb dans la région 5'. La séquence des amorces ayant servi au dosage de l'ARNm de l'IL-6 est décrite à la Figure 9b. Les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. Les étalons ont été préparés à partir d'un échantillon d'ARN total extrait de cellules U-937 stimulées au LPS.

### **3.1.11. Collecte et gestion des résultats**

Les différentes analyses ont été effectuées au laboratoire regroupé de l'hôpital Saint-Luc du CHUM, au laboratoire regroupé de l'Hôpital Notre-Dame du CHUM (dosage de la CRP) ainsi qu'au laboratoire regroupé de l'Hôpital Hôtel-Dieu du CHUM (dosage de l'insuline). Les résultats ont été gérés par le système informatique Méditech. La confidentialité a été respectée, chaque échantillon du projet étant identifié par un code numérique.

### **3.1.12. Statistiques**

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel SigmaStat. Les taux de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 entre les trois catégories d'individus ont été comparés par un test de Shapiro-Wilk.

### **3.2. Investigation du potentiel pro-inflammatoire de paramètres biochimiques rencontrés en excès dans l'obésité : glucose, insuline, leptine, cholestérol et triglycérides.**

La réponse des cellules circulantes périphériques au glucose, à l'insuline, à la leptine et aux triglycérides a été vérifiée en stimulant in vitro le sang total d'individus ayant un poids normal en ajoutant les facteurs métaboliques rencontrés comme étant élevés chez les individus obèses à une concentration que l'on rencontre chez ces derniers. Le culot cellulaire et l'ARN ont été extraits après deux heures d'incubation à 37 °C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub> sous des conditions d'homogénéisation constantes alors que la protéine circulante a été recueillie dans le plasma après centrifugation et ce, suivant six heures d'incubation dans les mêmes conditions que celles énumérées précédemment. Les techniques d'extraction du culot cellulaire et de l'ARN, de PCR en temps réel pour le dosage de l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 ainsi que les techniques ELISA utilisées sont les mêmes que celles décrites dans la section précédente. Tous les échantillons ont été dosés en duplicata.

#### **3.2.1. Stimulation du sang veineux périphérique avec le glucose, l'insuline et la leptine**

Le sang veineux hépariné prélevé chez six individus présentant un poids normal a été stimulé avec une solution isotonique stérile (0,9 % NaCl) (Baxter, Mississauga, Ontario) à titre de contrôle négatif, ou 20 mmol/L de glucose (Biosource, Medicorp Inc., Montréal, Québec, Canada), ou 5000 pmol/L d'insuline recombinante humaine (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) ou 100 000 ng/L de leptine recombinante humaine (Biosource, Medicorp Inc., Montréal, Québec, Canada). Un contrôle positif a été réalisé avec l'ajout de 0,02 mg/L de LPS (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario)

Après deux heures d'incubation à 37 °C et sous des conditions d'homogénéisation constante, le culot cellulaire et l'ARN du sang total stimulé ont été extraits à partir de 3 mL de sang total dans le but de doser l'ARN messager du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 par RT-PCR en temps réel. Après six heures d'incubation à 37 °C et sous des conditions d'homogénéisation constante, le tube de sang a été centrifugé à 13 000 RPM pendant 10 minutes puis le plasma a été décanté et congelé à -70 °C jusqu'au moment du dosage du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 plasmatiques.

### **3.2.2. Stimulations avec le cholestérol et les triglycérides**

Un prélèvement a été effectué à jeun chez trois individus d'IMC normal et le tube de sang veineux a été immédiatement placé à 37 °C sous des conditions d'homogénéisation constantes. Par la suite, les individus ont été ingéré un repas calorique riche en matières grasses. Ce repas était composé de 350 mL de crème 35 % fouettée, 2 cuillerées à thé de sirop à saveur de chocolat, 1 cuillerée à thé de sucre granulé et une cuillerée à thé de lait en poudre sans gras. Des 1400 calories ingérées, 3% provenaient de protéines (9,5 g), 14% d'hydrates de carbone (48 g) et 83 % de gras (130 g). Le contenu en cholestérol était de 480 mg et le ratio gras polyinsaturés/saturés de 0,06 (Patsch JR, 1987). Par la suite, ce repas a été remplacé par un déjeûner de type américain composé de deux œufs, bacon, cretons, deux rôties avec beurre, pommes de terres frites et fèves au lard (environ 1200 calories). Les individus ont subi une ponction veineuse deux heures après l'ingestion de ce repas. Trois mL de ce deuxième prélèvement ainsi que trois mL du premier prélèvement effectué à jeûn ont servi à extraire le culot cellulaire dans le but de doser l'ARN messager du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 par RT-PCR en temps réel. Trois autres mL de sang total veineux ont été placés à 37 °C sous des conditions d'homogénéisation constante. Six heures après la première ponction veineuse où l'individu était à jeun, le tube de sang a été centrifugé à 13 000 RPM pendant 10 minutes puis le plasma a été décanté dans le but de doser le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 plasmatiques. Les triglycérides, le cholestérol total, HDL et LDL ainsi que le glucose ont été dosés aux temps zéro, deux heures et six heures post-prandial.

### **3.2.3. Dosages biologiques**

Les dosages biologiques étaient les mêmes que ceux décrits dans la section précédente à l'exception du dosage de la leptine utilisée pour les stimulations.

Le dosage de la leptine utilisée dans le cadre des stimulations de sang total (Biosource, Medicorp Inc., Montréal, Québec, Canada) a été effectué en duplicata par une trousse commerciale fournie par Biosource (Biosource, Medicorp Inc., Montréal, Québec, Canada) et en se référant aux instructions qui y étaient liées. La sensibilité de ce test était de 3,5 ng/L selon le manufacturier.

### **3.2.4. Statistiques**

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel SigmaStat. Les taux de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 exprimés et produits par les différents inducteurs ont été comparés par un test non-paramétrique de Wilcoxon pour échantillons appariés. La significativité statistique des différences entre les temps zéro et six heures post-stimulation des dosages de glucose, d'insuline, de leptine et des triglycérides a été déterminée par un test de Student pour échantillons appariés à l'aide du logiciel R2.3.1.

## 4. RÉSULTATS

### 4.1. Mise au point et validation analytique des techniques de réaction de polymérase en chaîne en temps réel du TNF- $\alpha$ et de l'IL-6.

#### 4.1.1. Choix des amorces

Afin de déterminer quelles séquences d'amorces allaient être employées pour amplifier les fragments de TNF- $\alpha$  et d'IL-6, plusieurs séquences d'amorces publiées ont été retracées dans diverses publications. Sept paires d'amorces pour l'IL-6 et quatre paires d'amorces pour le TNF- $\alpha$  ont été placées sur la séquence de l'ARNm de l'IL-6 ou du TNF- $\alpha$ . La taille du fragment amplifié pour chacune des paires d'amorces possibles a été ainsi calculée. La figure 9 illustre un exemple de paires d'amorces placées sur la séquence d'ARNm de l'IL-6 (Pubmed NM\_000600) ainsi que la taille du fragment amplifié. La procédure a été la même pour chacune des treize autres amorces pour l'IL-6 et des six amorces dans le cas du TNF- $\alpha$ .

```
gaattccgggaacgaaagagaagctctatctccctccaggagcccagctatgaactccttctccacaagcgccctcgggtccagttgccttctccctgg
ggctgctcctggtgttgcctgctgccttccctgccccagtagccccaggagaagattccaagatgtagccgccacacagacagccactcacctct
tcagaacgaattgacaaacaaattcgggtacatctcgcagggcatctcagccctgagaaaggagacatgtaacaagagtaacatgtgtgaaagcagca
aagaggcactggcagaaacaacctgaaccttccaagatggctgaaaaagatggatgcttccaatctgattcaatgaggagacttgcctggtgaaa
atcatcactggtcttttgagtttgaggtatacctagtagtacctccagaacagattgagagtagtgaggacaagccagagctgtgcagatgagtaca
aagtctgatccagttctgcagaaaaaggcaagaatctagatgcaataaccaccctgaccaaccacaaatgccagcctgtgacgaagctgca
ggcacagaaccagtggtcgcaggacatgacaactcatctcattctgcgcagctttaaaggagttcctgcagtcacccctgagggtctctcggcaaatgta
gcatgggcacctcagattgttgtttaatgggcattccttcttctggtcagaaacctgtccactgggcacagaactatgttctctatggagaactaaa
agtagtagcgttaggacactatitaaattatitaaattatitaaatattaaatattgtaagctgagttatgttaagtcataatitaaagaagtagcact
tgaacattttatgattagtttgaataataatgaaagtggctatgcagttgaaatccittgttccagaccagatcatttctgaaagtgtaggcttac
ctcaataaatggctaactatatacatatitaaagaatattatattgtattatataatgtataaatggttttataccaataaatggcattttaaaaaatc
```

Légende :

**Amorces 11 D**

S : 5'-**aactccttctccacaagcg**-3'

AS : 5'-**ttcctcaaggacgtcaggt**-3'

**Figure 9 : Séquence nucléotidique complète de l'ARNm de l'IL-6 humain**

Par la suite des PCRs avec les différentes combinaisons d'amorces sens et anti-sens possibles ont été effectuées (Figure 10a). Afin de nous assurer que les fragments amplifiés étaient spécifiques et que leur taille réelle correspondait à leur taille théorique, les températures de fusion (Figure 10b), ainsi que la taille des fragments amplifiés sur gel d'agarose 1 % ont été visualisées (Figure 10c).

#### **4.1.2. Détermination de la concentration du $MgCl_2$**

Une fois assurés que la taille du fragment amplifié correspondait à la taille théorique, une mise au point fine de la technique s'imposait et a débuté par la détermination de la concentration du chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ) à employer. La concentration du chlorure de magnésium employée au cours d'une PCR est d'une importance cruciale. En effet, le rôle du  $MgCl_2$  consiste à promouvoir d'une part les interactions ADN/ADN et d'autre part, à former des complexes avec les dNTPs, complexes qui font office de substrat pour la Taq Polymérase. Typiquement, la courbe obtenue qui témoigne de l'efficacité de la PCR en fonction de la concentration de  $MgCl_2$  est une courbe en forme de cloche avec un pic maximal. Quand la concentration en  $MgCl_2$  est trop faible, les amorces ne se fixent pas à l'ADN. À l'inverse, lorsque la concentration en  $MgCl_2$  est trop élevée, l'appariement des bases devient très fort de sorte que les amplicons ne réussissent plus à se dénaturer complètement lorsque la température grimpe à 94 °C (Williams et al., 1989, Elsworth et al. 1993).

Une PCR avec différentes concentrations de  $MgCl_2$  s'étalant de 1 à 5 mmol/L a été effectuée (Figure 11a). Le choix de la concentration du  $MgCl_2$  a été fonction de l'aspect des courbes obtenues. La sensibilité et la spécificité des méthodes développées étaient en effet associées à la courbe dont le pic maximal était le plus élevé et le plus filiforme. (Figure 11b). Dans notre cas, la concentration en  $MgCl_2$  correspondant à ces critères a été établie à 4 mmol/L pour l'IL-6 et à 2 mmol/L pour le TNF- $\alpha$ .

### 4.1.3. Détermination de la concentration des amorces

De la même façon, la concentration des amorces à utiliser devait être déterminée. Une PCR avec différentes concentrations d'amorces a été effectuée (0,25 à 2,00  $\mu\text{mol/L}$  (IL-6) ou à 2,45  $\mu\text{mol/L}$  (TNF-  $\alpha$ )) (Figure 12a). Le choix de la concentration des amorces a été fait selon l'aspect des courbes obtenues. Encore une fois, la courbe dont le pic maximal était le plus élevé et le plus filiforme (pour les mêmes raisons que celles énumérées précédemment) confirmait la meilleure sélection des concentrations d'amorces. Les concentrations d'amorces retenues étaient 2,0  $\mu\text{mol/L}$  pour l'IL-6 et 2,45  $\mu\text{mol/L}$  pour le TNF- $\alpha$  (Figure 12b).

### 4.1.4. Sensibilité analytique

Généralement, on entend par sensibilité analytique la limite de détection ou plus petite quantité de substance pouvant être détectée avec la précision requise pour une application donnée. Pour déterminer la sensibilité des techniques PCR développées, nous avons fait des dilutions sériées d'une quantité connue d'ARN et avons identifié la plus petite quantité donnant une réponse mesurable pour chacune des techniques. Pour l'IL-6, la méthode développée présentait une sensibilité de 7,8 ng d'ARN total U937 stimulées au LPS alors que pour le TNF- $\alpha$ , jusqu'à 0,1 ng d'ARN total U937 stimulées au LPS pouvaient être détectés (Figure 13a).

### 4.1.5. Spécificité

La spécificité de l'amplification pouvait être assurée d'une part par l'obtention de températures de fusion de 86,0 °C pour l'IL-6 et de 87,5 °C pour le TNF- $\alpha$ , tel que déterminé à partir des amorces choisies pour chacune des méthodes (Figure 13c) et d'autre part, par la visualisation sur gel d'agarose à 1 % de bandes de taille correspondant à 251 pb pour l'IL-6 et à 279 pb pour le TNF- $\alpha$  (Figure 13d). Enfin, basé sur le principe que seul l'ADN complémentaire qui a été transcrit de l'ARNm de nos échantillons devait être amplifié, l'absence d'amplification avec de l'ADN génomique confirme également la spécificité de la technique (Figure 13d). Le cas



échant, une amplification avec l'ADN génomique aurait démontré une absence de spécificité d'amplification.

#### **4.1.6. Linéarité**

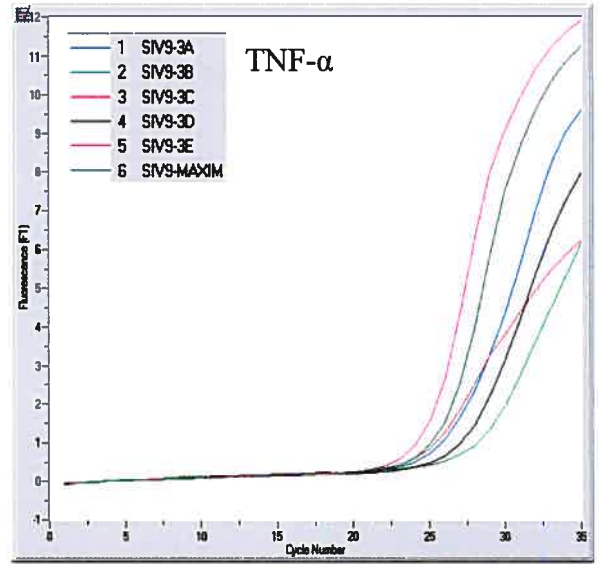
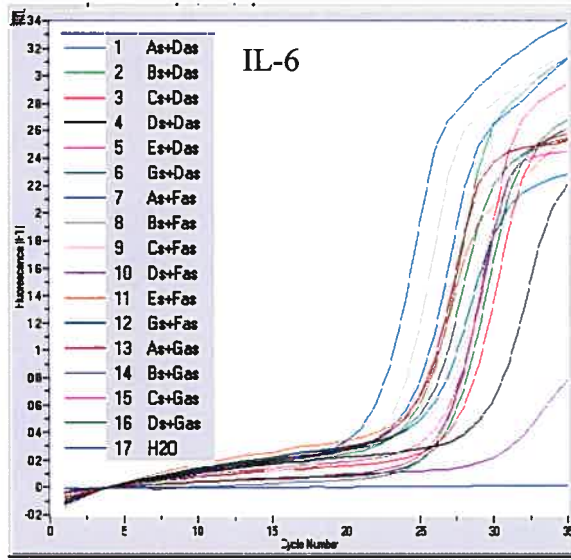
À titre de courbe étalon, une série de dilutions d'ARNm provenant de cellules U937 stimulées au LPS a été effectuée (Figure 14a). La concentration en ARN a été déterminée par une lecture au spectrophotomètre à 260 et 280 nm. La Figure 14b indique que la linéarité des méthodes développées s'étendait de 7,8 ng à 500 ng d'ARN total U937 stimulées au LPS.

#### **4.1.7. Précision**

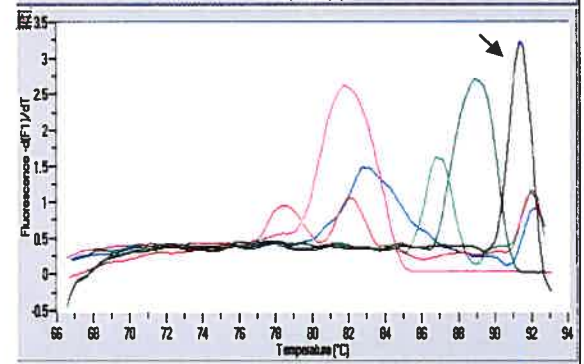
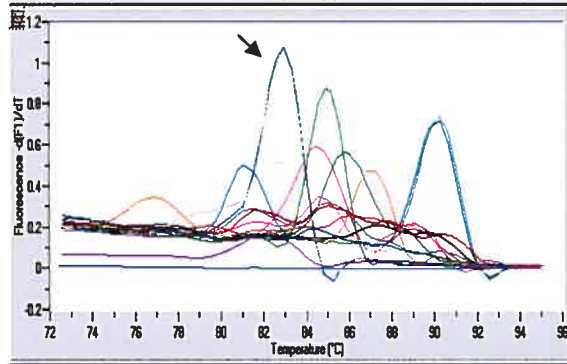
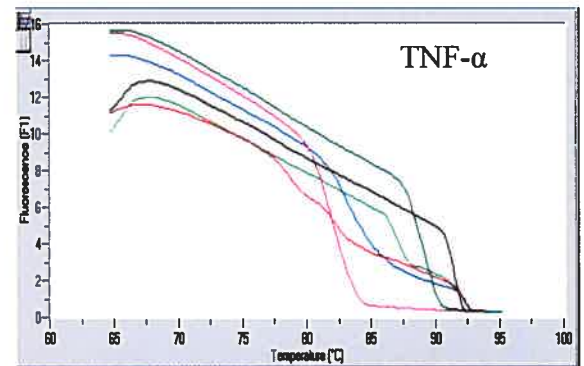
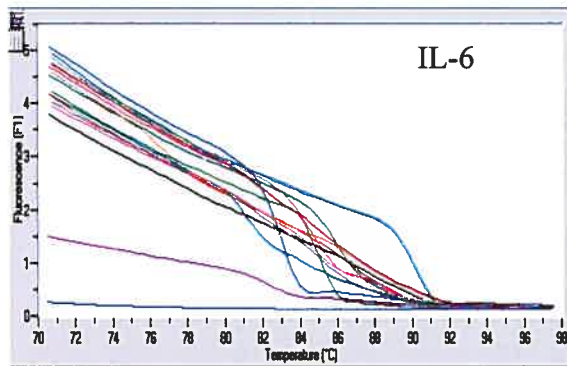
Deux échantillons de concentration connue (50 et 200 ng d'ARN total U937-LPS) ont été dosés dix fois dans une même routine afin de vérifier la précision et la variabilité intra-essai des méthodes développées (Tableau VI). Les moyennes obtenues pour les dix répétitions de l'échantillon à 50 ng d'ARN total U937-LPS sont de  $42,2 \pm 6,2$  ng d'ARN total U937-LPS pour l'IL-6 et de  $49,6 \pm 3,6$  ng d'ARN total U937-LPS pour le TNF- $\alpha$ . Pour l'échantillon à 200 ng d'ARN total U937-LPS, les moyennes obtenues sont de  $160,6 \pm 25,5$  ng d'ARN total U937-LPS pour l'IL-6 et de  $183,5 \pm 12,3$  ng d'ARN total U937-LPS pour le TNF- $\alpha$ .

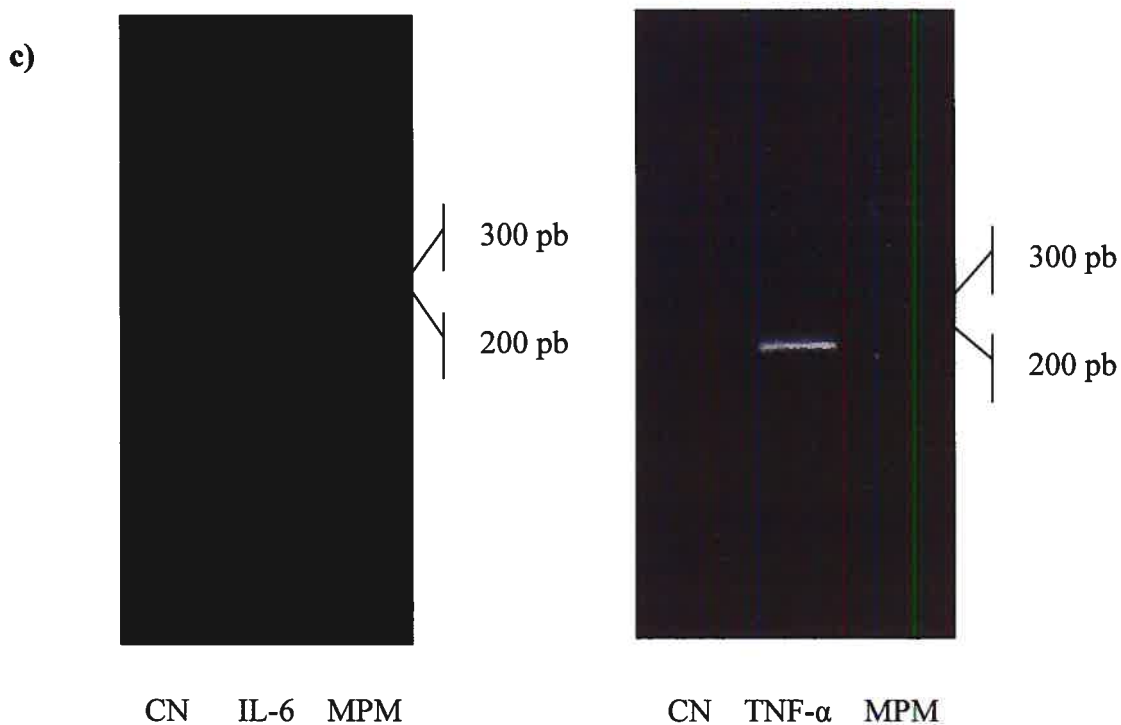
La précision inter-essai a également été étudiée et les résultats de chacun des dosages effectués dans 11 essais différents sont répertoriés dans le tableau VII. Les moyennes obtenues pour le dosage de l'ARNm de l'IL-6 sont de  $34,6 \pm 7,8$  ng d'ARN total U937-LPS pour l'échantillon à 50 ng d'ARN total U937-LPS et de  $144,6 \pm 32,6$  ng d'ARN total U937-LPS pour l'échantillon à 200 ng d'ARN total U937-LPS. La précision inter-essai pour le dosage de l'ARNm du TNF- $\alpha$  est de  $43,5 \pm 3,8$  ng d'ARN total U937-LPS pour l'échantillon à 50 ng d'ARN total U937-LPS et  $204,4 \pm 29,4$  ng d'ARN total U937-LPS pour l'échantillon à 200 ng d'ARN total U937-LPS.

a)



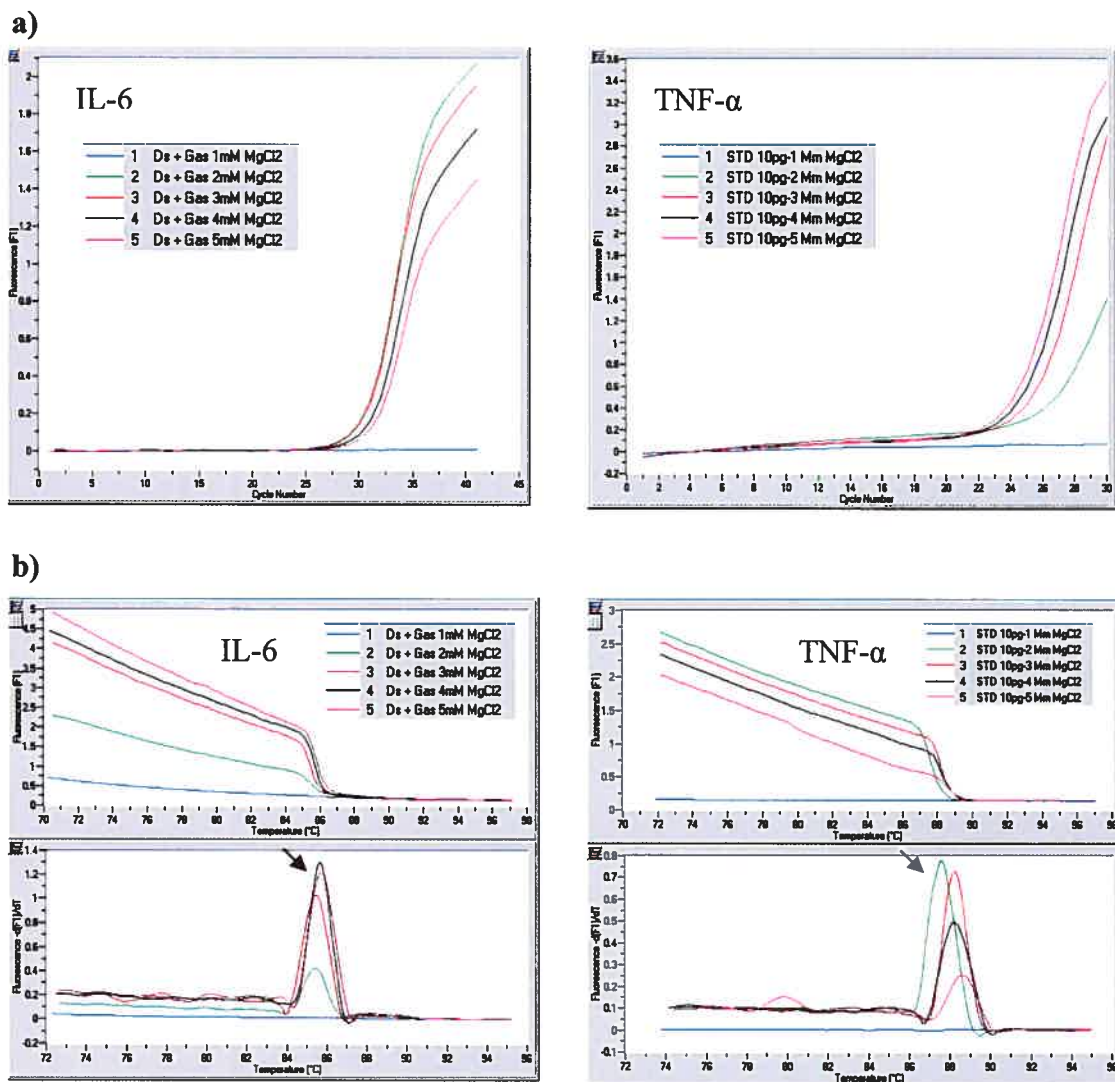
b)





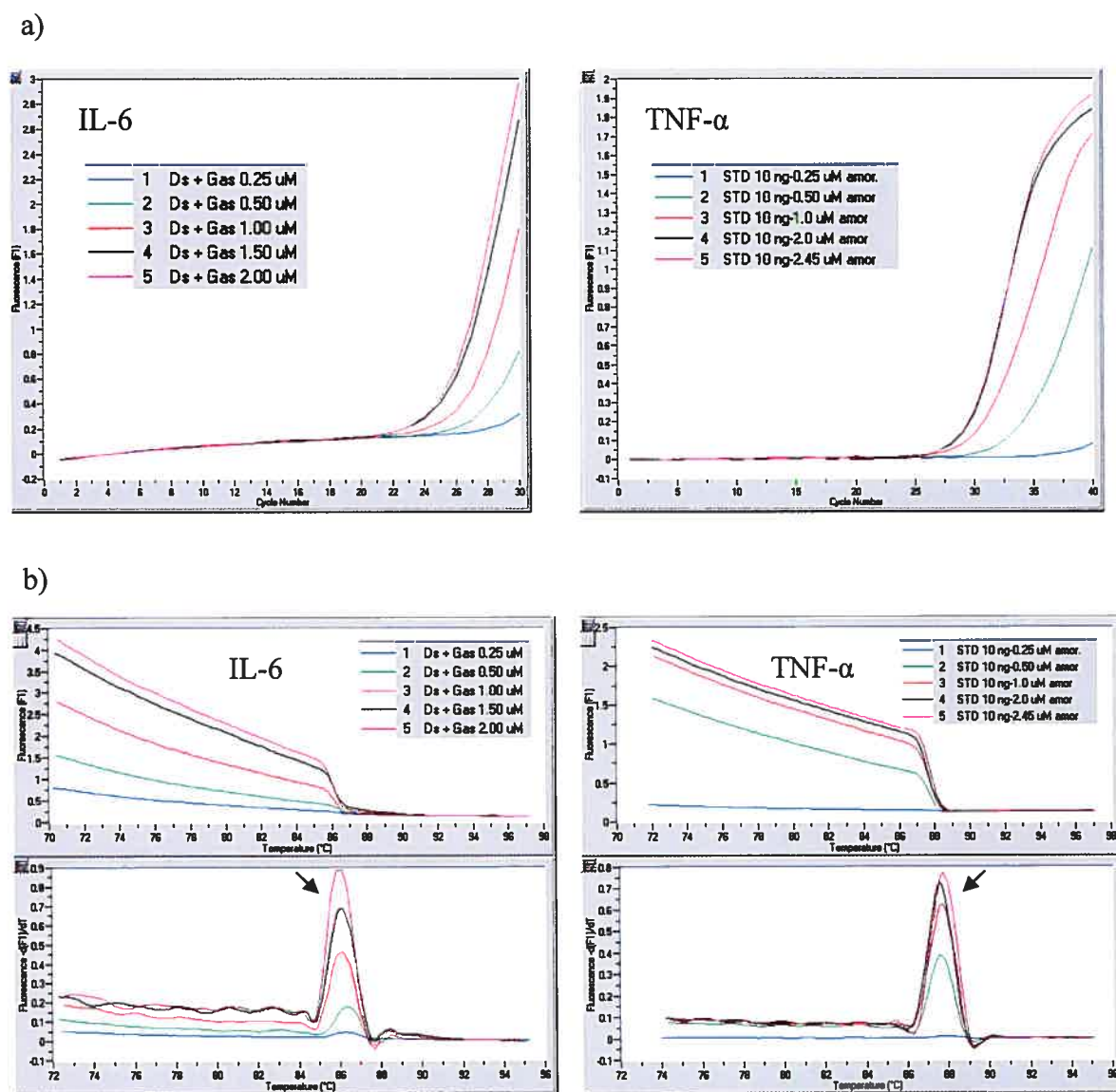
**Figure 10 : Étapes menant à la sélection des amorces.**

a) Chaque courbe d'amplification représente la fluorescence provenant des fragments amplifiés en fonction du nombre de cycles selon les différentes combinaisons d'amorces pour l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ . À noter que ce ne sont pas toutes les combinaisons d'amorces possibles qui sont illustrées dans cette figure et que plusieurs essais distincts ont été requis pour évaluer l'ensemble de ces combinaisons. b) Courbes de température illustrant (parties du haut) la chute de fluorescence en fonction de la température de fusion du fragment amplifié, et, parties du bas, dérivée de cette fluorescence en fonction de la température mettant ainsi en évidence le pic de la température de fusion pour l'IL-6 et pour le TNF- $\alpha$ . Le pic le plus étroit et le plus filiforme (indiqué par une flèche) a été retenu. c) Visualisation de la taille des fragments amplifiés sur gel d'agarose 1 % avec les amorces retenues : on voit une seule bande située à 251 pb pour l'IL-6 et à 279 pb pour le TNF- $\alpha$  et l'absence de bande avec le contrôle négatif (CN). Chacune des bandes du marqueur de poids moléculaire (MPM) représente de bas en haut la position de fragments sur le gel correspondant à 50 à 2000 pb.



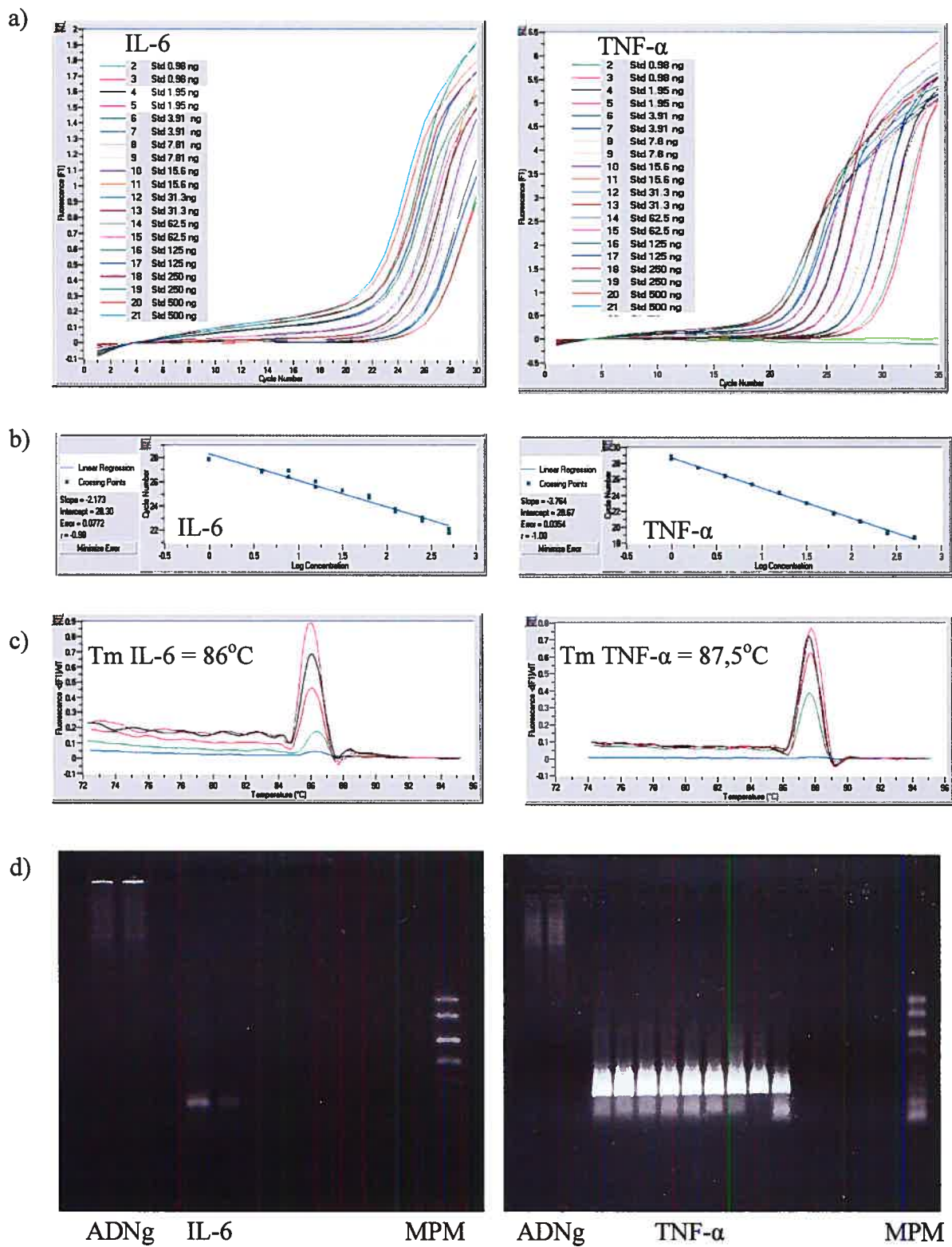
**Figure 11 : Détermination de la concentration en MgCl<sub>2</sub>.**

a) Courbes d'amplification des fragments obtenus avec les différentes concentrations de MgCl<sub>2</sub> pour l'IL-6 et le TNF-α : Fluorescence émise en fonction du nombre de cycles. b) Courbes de température et visualisation des températures de fusion pour les différentes concentrations de MgCl<sub>2</sub> testées pour l'IL-6 et le TNF-α. Les flèches identifient les concentrations de MgCl<sub>2</sub> retenues pour l'IL-6 (4 mmol/L) et le TNF-α (2 mmol/L).



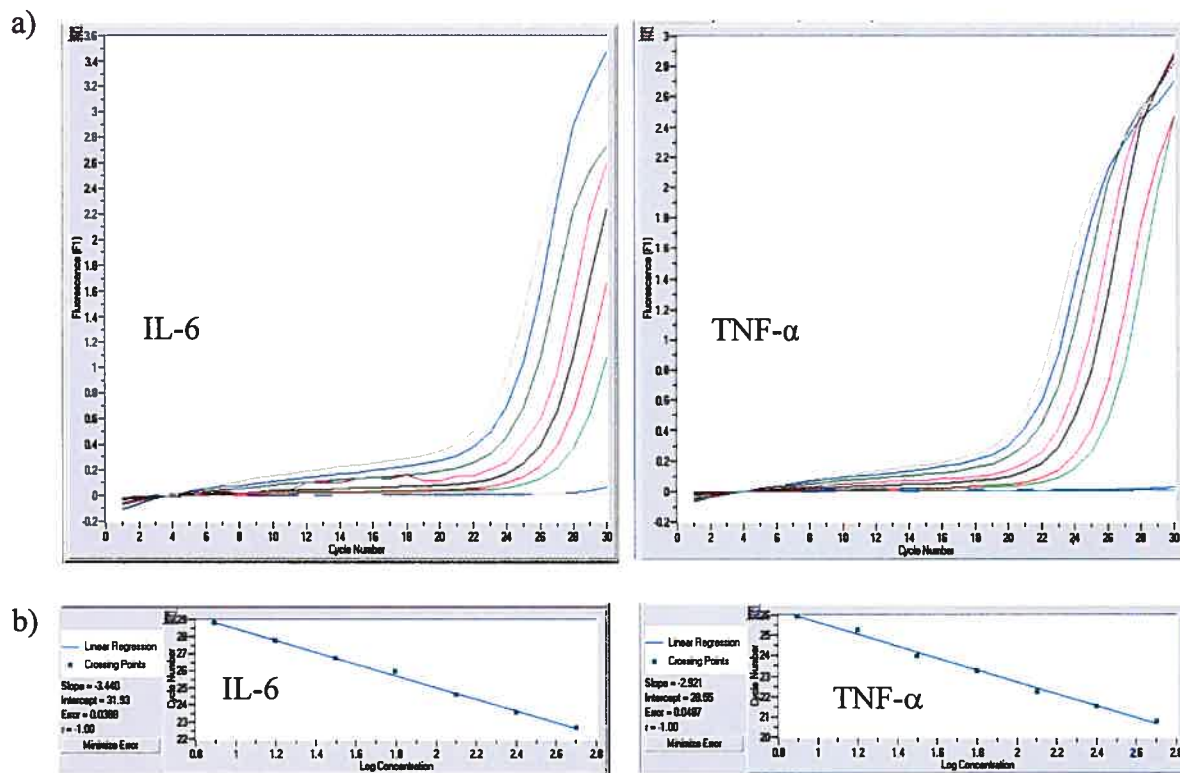
**Figure 12 : Détermination de la concentration des amorces**

a) Courbes d'amplification des fragments obtenus avec les différentes concentrations d'amorces pour l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  : Fluorescence émise en fonction du nombre de cycles. b) Courbes de température et visualisation des températures de fusion des différentes concentrations d'amorces testées pour l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ . Les concentrations d'amorces choisies sont identifiées par une flèche.



**Figure 13 : Validation analytique.**

**a)** Courbes d'amplification pour l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  : Fluorescence en fonction du nombre de cycles. Des concentrations allant de 0,98 à 500 ng d'ARN total U937-LPS ont été amplifiées en duplicata. **b)** Nombre de cycle requis pour obtenir une fluorescence cible en fonction du log de la concentration. On observe ici la régression linéaire des duplicata mentionnés a la figure a) ( $r = -0,99$  pour l'IL-6 et  $r = -1,00$  pour le TNF- $\alpha$ ). Le logiciel sélectionne deux points dans la section log-linéaire des courbes d'amplification de chacun des étalons. L'intersection entre ces points et l'endroit sur la courbe où il n'y a plus de bruit de fond est exprimée sous forme de fraction du nombre de cycle et est positionnée en fonction du log de la concentration. **c)** Visualisation des températures de fusion autant pour l'IL-6 ( $T_m = 86$  °C) que pour le TNF- $\alpha$ . ( $T_m = 87,5$  °C) qui confirment la spécificité des fragments amplifiés. **d)** Visualisation de la taille des fragments amplifiés sur gel d'agarose 1 % : On voit une seule bande située à 251 pb pour l'IL-6 et à 279 pb pour le TNF- $\alpha$  et l'absence de bande avec le contrôle négatif (CN) ainsi qu'avec l'ADN génomique (ADNg). Chacune des bandes du marqueur de poids moléculaire (MPM) représente l'endroit sur le gel où migrent les fragments de 50 à 2000 pb.



**Figure 14 : Linéarité**

a) Série de dilutions d'ARNm provenant de cellules U937 stimulées au LPS. Les courbes de gauche à droite correspondent à 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6 et 7,8 ng d'ARN total U937 stimulées au LPS. Les deux courbes ne montrant aucune amplification correspondent aux contrôles négatifs. b) Nombre de cycles en fonction du log de la concentration des étalons. Les graphiques montrent une linéarité quasi-parfaite de la courbe de calibration pour les 7 étalons utilisés ( $r = -1,00$ ).



**Tableau VI : Précision et variabilité intra-essai pour le dosage de l'ARNm de l'IL-6 et du TNF $\alpha$ .**

	IL-6		TNF- $\alpha$	
	C1 (50 ng)	C2 (200 ng)	C1 (50 ng)	C2 (200 ng)
	51,6	155,1	50,7	182,5
	39,4	142,3	49,1	179,4
	40,6	172,6	51,9	201,7
	42,4	222,0	52,5	196,9
	47,0	168,5	40,1	189,7
	41,2	143,9	51,2	194,4
	30,1	136,0	51,1	176,0
	42,4	155,0	51,6	184,1
	38,1	171,7	48,3	158,7
	49,6	138,7	49,2	171,1
Moyenne	42,2	160,6	49,6	183,5
Écart-type	6,2	25,5	3,6	13,0
CV	14,6	15,9	7,2	7,1

**Tableau VII : Précision et variabilité inter-essai pour le dosage de l'ARNm de l'IL-6 et du TNF $\alpha$ .**

	IL-6		TNF- $\alpha$	
	C1 (50 ng)	C2 (200 ng)	C1 (50 ng)	C2 (200 ng)
	37,3	129,7	40,2	151,6
	38,3	123,2	42,9	165,0
	28,9	99,36	47,3	248,1
	29,8	149,8	49,6	226,3
	28,8	113,2	44,1	189,6
	20,2	117,5	45,4	205,0
	28,9	135,0	45,1	196,7
	42,7	196,1	46,4	241,8
	40,2	166,8	39,1	218,0
	46,6	193,7	36,8	207,7
	38,5	166,7	41,3	198,6
Moyenne	34,6	144,6	43,5	204,4
Écart-type	7,8	32,6	3,8	29,4
CV	22,6	22,5	8,8	14,4

## 4.2. Production de TNF- $\alpha$ et d'IL-6 par les cellules péricellulaires circulantes

### 4.2.1. Valeurs de référence préliminaires établies à partir d'un échantillon d'individus minces (n=22)

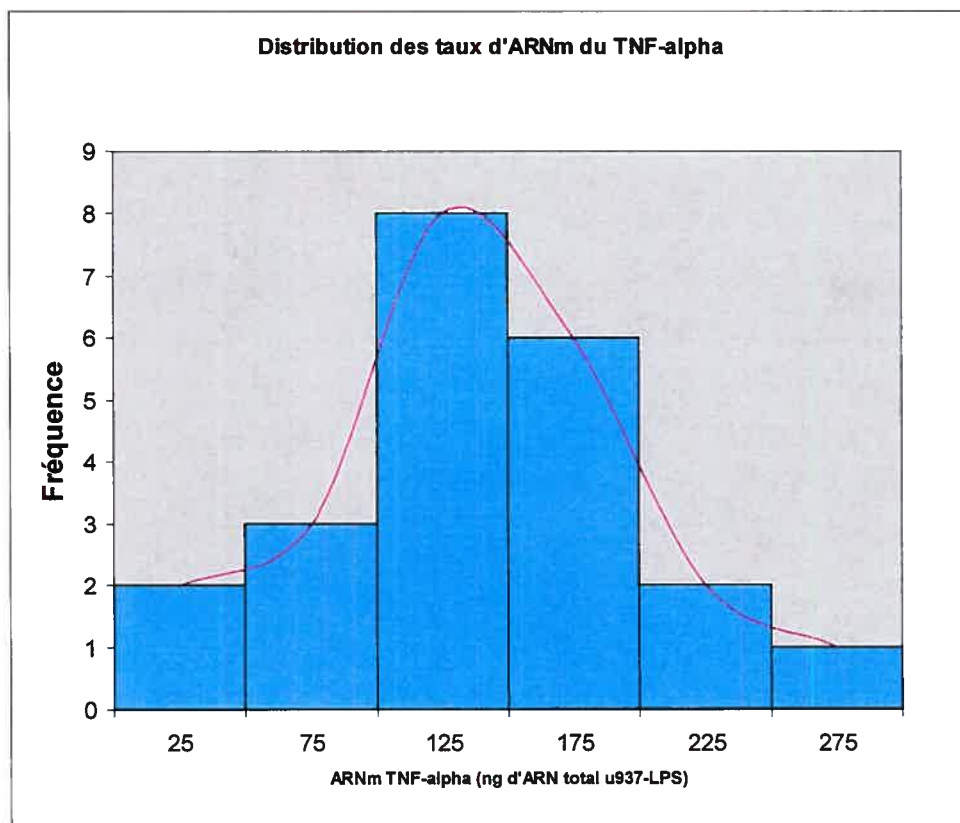
Les résultats présentés proviennent de 22 individus (10 femmes et 12 hommes) apparemment en bonne santé et présentant un poids normal (IMC entre 18,5 et 24,9 kg/m<sup>2</sup>). Le tableau VIII rapporte, pour la première fois, les valeurs de référence des taux d'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 chez des individus normaux, genres confondus, ainsi que les valeurs de référence chez les hommes et les femmes. Les moyennes et intervalles de référence, genres confondus, établis pour le TNF- $\alpha$  correspondaient à 138 [21-256] et pour l'IL-6, à 190 [0-446] ng d'ARN total U937-LPS.

**Tableau VIII: Intervalles de référence des taux d'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6**

	Quantiles	
	2,5 centile	97,5 centile
<b><i>Genres confondus (n=22)</i></b>		
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN total U937-LPS)	21 [0-63]	256 [213-299]
ARNm IL-6 (ng d'ARN total U937-LPS)	0 [0-140]	446 [353-539]
<b><i>Hommes (n=12)</i></b>		
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN total U937-LPS)	34 [0-106]	262,3 [206-318]
ARNm IL-6 (ng d'ARN total U937-LPS)	0 [0-195]	477 [388-606]
<b><i>Femmes (n=10)</i></b>		
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN total U937-LPS)	4 [0-70]	250 [184-316]
ARNm IL-6 (ng d'ARN total U937-LPS)	0 [0-133]	410 [277-543]

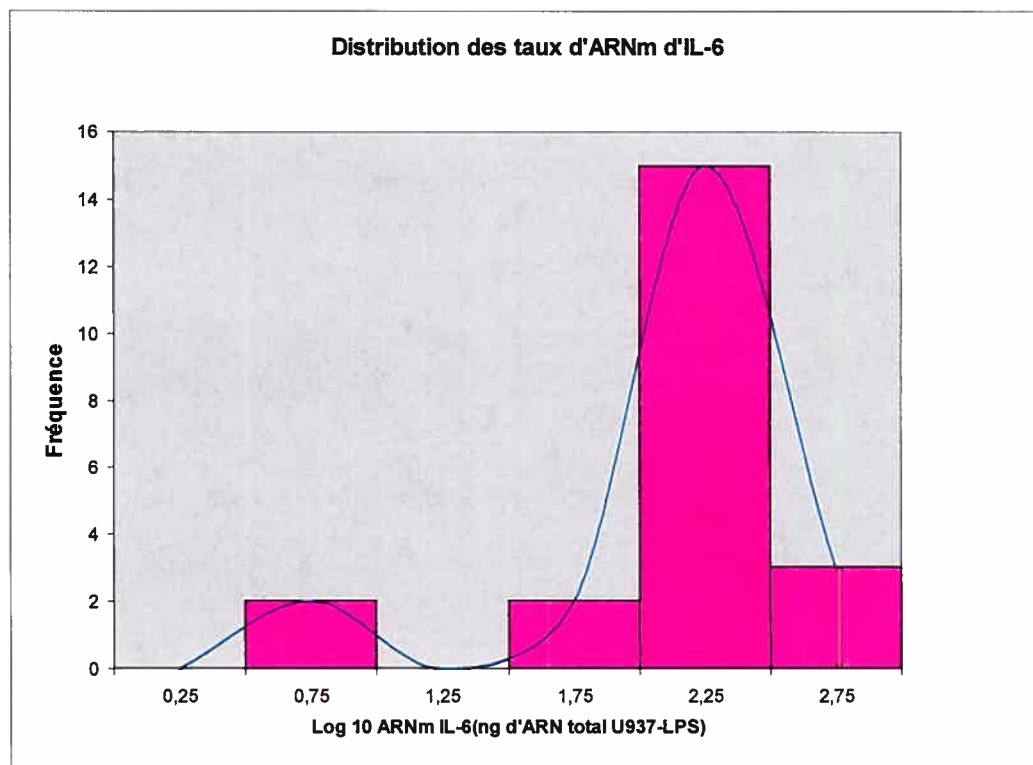
Résultats exprimés sous forme de moyenne et intervalle de confiance à 95%

La distribution des taux d'ARNm du TNF- $\alpha$  est illustrée sur la figure 15. Les valeurs de l'ARNm du TNF- $\alpha$  s'étendent de 7,8 à 263,2 ng d'ARN total U927-LPS. Il n'y a pas de différence significative entre les distributions observées chez les hommes et les femmes et la distribution est d'allure gaussienne.



**Figure 15: Distribution des taux d'ARNm du TNF- $\alpha$  chez des individus normaux.**

La figure 16 illustre la distribution des taux d'IL-6 chez des individus normaux. Les valeurs de la distribution de l'ARNm de l'IL-6 correspondent à 7,8 à 492,0 ng d'ARN total U93-LPS. Tel qu'observé pour le TNF- $\alpha$ , les distributions pour l'ARNm de l'IL-6 chez les hommes et les femmes ne présentaient pas de différence significative. La distribution des résultats n'était cependant pas d'allure gaussienne.



**Figure 16 : Distribution des taux d'ARNm de l'IL-6 chez des individus normaux.**

#### 4.2.2. Corrélation entre l'IMC et l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$ et de l'ARNm de l'IL6

Le tableau IX rapporte les concentrations du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 pour chacune des catégories de poids des patients recrutés. Les différences observées entre ces trois classes de poids ne sont pas significatives.

**Tableau IX : Concentrations du TNF- $\alpha$  et d'IL-6 par catégories de poids.**

	TNF- $\alpha$ (ng/L)	IL-6 (ng/L)	ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN**)	ARNm IL-6 (ng d'ARN**)
<b>GENRES CONFONDUS (n=55)</b>				
Poids normal (n=22)	< 2,00*	1,61 $\pm$ 0,83 <sup>†</sup>	138 $\pm$ 59 <sup>†</sup>	190 $\pm$ 128 <sup>†</sup>
Excès de poids (n=20)	< 2,00*	2,24 $\pm$ 2,40 <sup>†</sup>	177 $\pm$ 68 <sup>†</sup>	220 $\pm$ 98 <sup>†</sup>
Obèses (n=13)	< 2,00*	6,03 $\pm$ 13,73 <sup>†</sup>	160 $\pm$ 53 <sup>†</sup>	157 $\pm$ 99 <sup>†</sup>
<b>HOMMES (n=32)</b>				
Poids normal (n=12)	< 2,00*	1,82 $\pm$ 0,86 <sup>†</sup>	161 $\pm$ 38 <sup>†</sup>	214 $\pm$ 132 <sup>†</sup>
Excès de poids (n=14)	< 2,00*	2,16 $\pm$ 2,66 <sup>†</sup>	184 $\pm$ 74 <sup>†</sup>	223 $\pm$ 106 <sup>†</sup>
Obèses (n=6)	< 2,00*	2,21 $\pm$ 1,24 <sup>†</sup>	180 $\pm$ 65 <sup>†</sup>	187 $\pm$ 105 <sup>†</sup>
<b>FEMMES (n=23)</b>				
Poids normal (n=10)	< 2,00*	1,36 $\pm$ 0,77 <sup>†</sup>	127 $\pm$ 62 <sup>†</sup>	162 $\pm$ 124 <sup>†</sup>
Excès de poids (n=6)	< 2,00*	2,41 $\pm$ 1,86 <sup>†</sup>	161 $\pm$ 54 <sup>†</sup>	213 $\pm$ 87 <sup>†</sup>
Obèses (n=7)	< 2,00*	9,29 $\pm$ 18,67 <sup>†</sup>	144 $\pm$ 38 <sup>†</sup>	131 $\pm$ 94 <sup>†</sup>

Résultats exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type

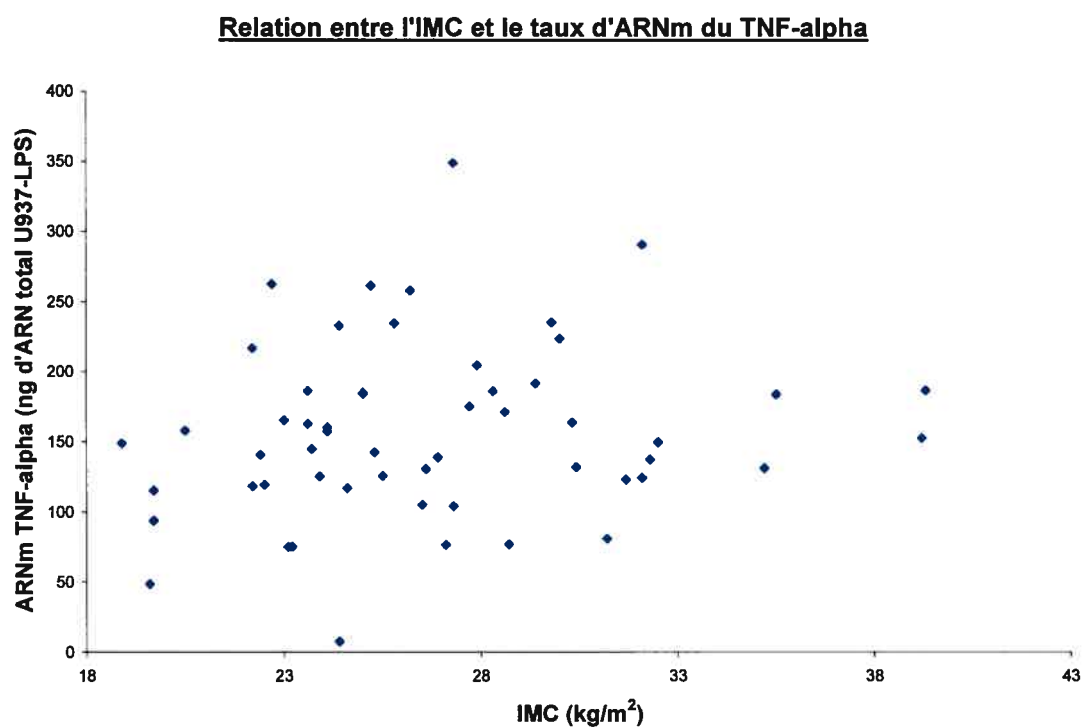
\* Médianes

\*\* Unités d'ARN total U937-LPS

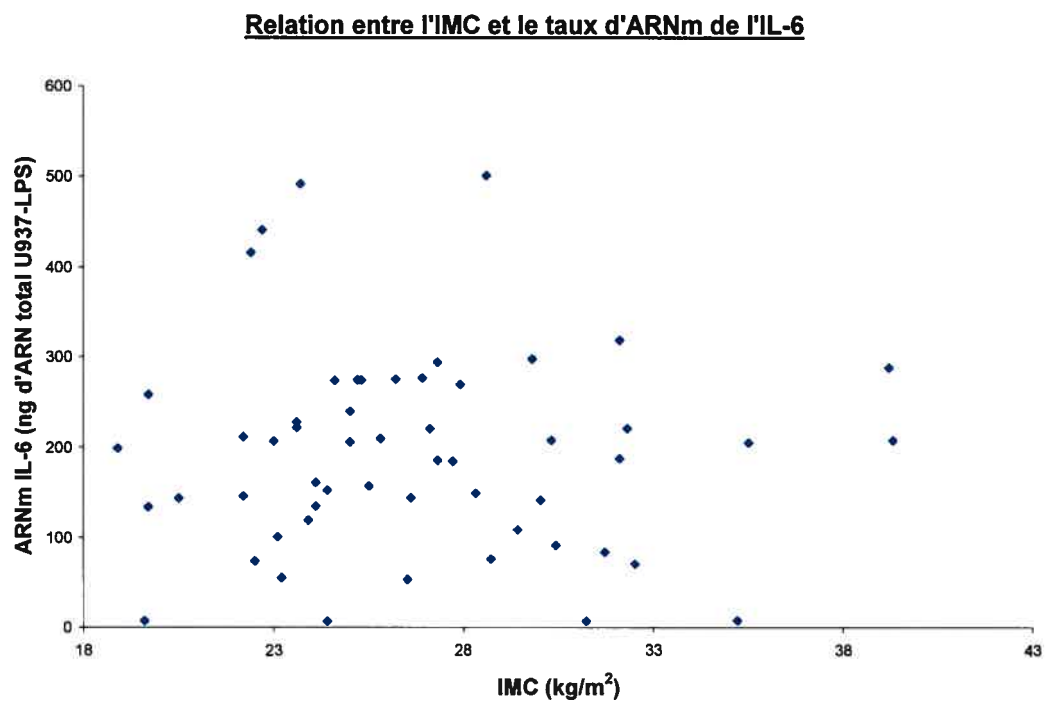
<sup>†</sup> non significatif

La figure 17 illustre la faible tendance existant entre l'IMC et les taux d'ARNm du TNF- $\alpha$  (non significatif). Le coefficient de détermination obtenu démontre que 2,6 % de la variation totale des taux de TNF- $\alpha$  est expliquée par l'IMC. Dans la figure 18, on note une absence de relation linéaire entre les taux d'IL-6 et l'IMC (non significatif).

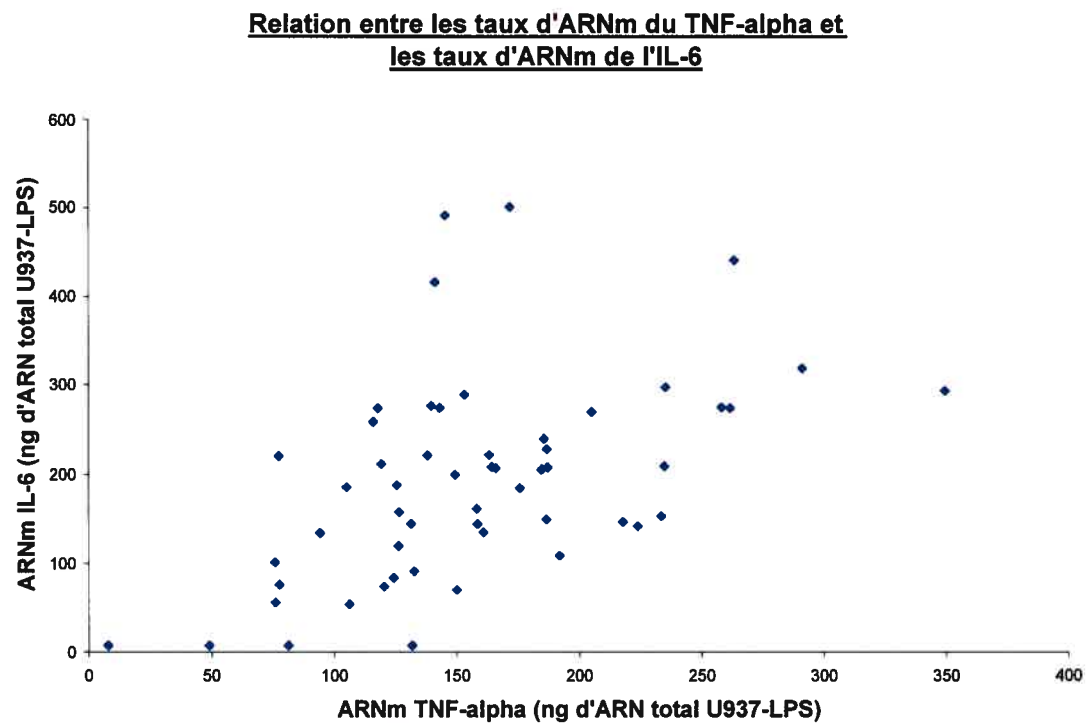
Par ailleurs, il existe une relation linéaire faible, mais très significative ( $p < 0,001$ ) entre les taux d'ARNm du TNF- $\alpha$  et les taux d'ARNm de l'IL-6 (Figure 19).



**Figure 17 : Étude de la relation entre l'IMC et l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$ .**



**Figure 18 : Étude de la relation entre l'IMC et l'expression de l'ARNm de l'IL-6.**



**Figure 19 : Relation entre les taux d'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6.**



### **4.3. Investigation du potentiel pro-inflammatoire de 4 paramètres biochimiques rencontrés en excès dans l'obésité**

#### **4.3.1. Effet de l'hyperglycémie sur les taux et l'expression du TNF- $\alpha$ et de l'IL-6**

L'effet du glucose 20 mmol/L dans du sang total stimulé pendant 2 heures avant l'extraction de l'ARNm et six heures avant l'extraction des protéines TNF $\alpha$  et IL-6 a été testé chez six individus normaux. Afin de s'assurer que les cellules périphériques circulantes étaient réellement soumises à des conditions d'hyperglycémie, les glycémies ont été mesurées après six heures d'incubation. Les concentrations de glucose dans le sang variaient entre 26,3 et 31,2 mmol/L ( $28,4 \pm 1,8$  mmol/L) et étaient significativement différentes des glycémies au temps zéro ( $5,4 \pm 0,5$  mmol/L) ( $p=0,001$ ). Toutefois, les résultats d'un individu ont été rejetés de l'étude car il présentait des niveaux élevés de TNF- $\alpha$  au temps zéro (17,25 ng/L).

Les résultats obtenus pour les cinq autres individus ayant participé à l'étude apparaissent dans les tableaux X et XI et sont résumés dans le tableau XII. Un seul sujet a montré une augmentation des taux mesurables de TNF- $\alpha$  tandis que les niveaux sont demeurés non détectables chez les quatre autres. Au total, aucun effet significatif n'a été observé entre les spécimens non-stimulés et ceux soumis à 20 mmol/L de glucose pendant 6 heures. Par ailleurs, les taux d'IL-6 étaient mesurables chez tous les individus et ont montré une baisse mesurable chez deux d'entre eux après stimulation au glucose. Au total, les taux d'IL-6 n'étaient pas significativement différents après stimulation avec 20 mmol/L de glucose. Des résultats semblables ont été observés pour l'expression des ARNm du TNF $\alpha$  et de l'IL-6 avec des taux mesurables chez tous les sujets mais des baisses chez trois individus sur cinq et des hausses chez les deux autres ont rendu non-significatives les différences entre le temps zéro et le temps deux heures post-stimulation. Afin de démontrer la capacité des

leucocytes de synthétiser du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 dans nos conditions ex vivo, nous avons soumis les échantillons de sang total à 0,02 mg/L de LPS. Tous les sujets ont montré des taux d'ARNm et de protéines supérieurs à la limite de linéarité des méthodes employées, alors que les échantillons stimulés avec de la saline (contrôle négatif) ont montré des taux stables de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 (ARNm et protéines).

**Tableau X : Taux de TNF- $\alpha$  individuels pour les stimulations avec 20 mmol/L de glucose**

	Saline (0,89 % NaCl)	Glucose (20 mmol/L)	LPS (0,02 mg/L)
<b>Individu 1</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	< 2,00	< 2,00	> 250
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	365	339	> 500
<b>Individu 2</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	< 2,00	< 2,00	> 250
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	282	345	> 500
<b>Individu 3</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	< 2,00	< 2,00	> 250
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	267	280	> 500
<b>Individu 4</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	< 2,00	3,58	> 250
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	40	34	> 500
<b>Individu 5**</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	17,25	18,22	> 250
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	> 500	> 500	> 500
<b>Individu 6</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	< 2,00	< 2,00	> 250
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	355	208	> 500

\* Unités d'ARN total U937-LPS

\*\* Individu éliminé

**Tableau XI : Taux d'IL-6 individuels pour les stimulations avec 20 mmol/L de glucose**

	Saline (0,89 % NaCl)	Glucose (20 mmol/L)	LPS (0,02 mg/L)
<b>Individu 1</b>			
IL-6 (ng/L)	3,93	3,99	> 250
ARNm IL-6 (ng d'ARN*)	201	217	> 500
<b>Individu 2</b>			
IL-6 (ng/L)	2,11	1,01	> 250
ARNm IL-6 (ng d'ARN*)	182	168	> 500
<b>Individu 3</b>			
IL-6 (ng/L)	6,64	6,34	> 250
ARNm IL-6 (ng d'ARN*)	144	135	> 500
<b>Individu 4</b>			
IL-6 (ng/L)	9,44	7,77	> 250
ARNm IL-6 (ng d'ARN*)	136	145	> 500
<b>Individu 5**</b>			
IL-6 (ng/L)	20,01	21,65	> 250
ARNm IL-6 (ng d'ARN*)	1952	284	> 500
<b>Individu 6</b>			
IL-6 (ng/L)	1,99	2,11	> 250
ARNm IL-6 (ng d'ARN*)	141	68	> 500

\* ng d'ARN total U937-LPS

\*\* Individu éliminé

**Tableau XII : Moyennes des taux de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 pour les stimulations avec 20 mmol/L de glucose**

	n	Saline (0,89 % NaCl)	Glucose (20 mmol/L)	LPS (0,02 mg/L)	p
TNF- $\alpha$ (ng/L)	5	< 2,00	< 2,00	> 250	ns
IL-6 (ng/L)	5	4,82 $\pm$ 2,86	4,23 $\pm$ 2,53	> 500	ns
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	5	262 $\pm$ 118	241 $\pm$ 115	> 500	ns
ARNm IL-6 (ng d'ARN)*	5	161 $\pm$ 26	146 $\pm$ 49	> 500	ns

Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type

\* ng d'ARN total U937-LPS

ns: non significatif

### **4.3.2. Effet de l'hyperinsulinémie sur la production et l'expression du TNF- $\alpha$ et de l'IL-6**

L'investigation de l'effet de l'hyperinsulinémie rencontrée chez les sujets obèses a été effectuée chez six individus normaux. Les échantillons de sang total ont tous été soumis à 5000 pmol/L d'insuline recombinante humaine. L'insulinémie mesurée après 6 heures d'incubation oscillait entre 264 et 2042 pmol/L ( $1181 \pm 828$  pmol/L) et était significativement différente des concentrations d'insuline au temps zéro ( $70 \pm 25$  pmol/L) ( $p=0,02$ ). Un individu (individu 5) a dû être rejeté de l'étude car son taux d'insuline six heures post-stimulation était de 11 pmol/L seulement comparativement à 42 pmol/L au temps zéro.

Les concentrations de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 sont fournies dans les tableaux XIII et XIV et leurs moyennes sont rapportées dans le tableau XV. Aucun effet significatif de l'insuline n'a été observé, ni pour les taux mesurables des protéines IL-6 et TNF- $\alpha$ , ni pour les ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6. Les taux de TNF- $\alpha$  étaient à la baisse pour quatre individus sur cinq, soit chez les mêmes individus que pour l'étude de l'hyperglycémie. Les échantillons stimulés au salin représentaient la production et l'expression basale du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6. Les stimulations avec le LPS donnaient des résultats très élevés montrant le maintien des capacités de synthèse des deux paramètres mesurés dans notre système de mesure.

**Tableau XIII : Taux de TNF- $\alpha$  individuels pour les stimulations avec 5000 pmol/L d'insuline**

	Saline (0,89 % NaCl)	Insuline (5000 pmol/L)	LPS (0,02 mg/L)
<b>Individu 1</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	< 2,00	< 2,00	> 250
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	365	311	> 500
<b>Individu 2</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	< 2,00	< 2,00	> 250
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	282	535	> 500
<b>Individu 3</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	< 2,00	< 2,00	> 250
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	267	131	> 500
<b>Individu 4</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	< 2,00	< 2,00	> 250
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	40	282	> 500
<b>Individu 5**</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	17,25	ND	> 250
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	> 500	ND	> 500
<b>Individu 6</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	< 2,00	< 2,00	> 250
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	355	> 500	> 500

\* ng d'ARN total U937-LPS

\*\* Individu éliminé

**Tableau XIV : Taux d'IL-6 individuels pour les stimulations avec 5000 pmol/L d'insuline**

	Saline (0,89 % NaCl)	Insuline (5000 pmol/L)	LPS (0,02 mg/L)
<b>Individu 1</b>			
IL-6 (ng/L)	3,93	3,21	> 250
ARNm IL-6 (ng d'ARN*)	201	175	> 500
<b>Individu 2</b>			
IL-6 (ng/L)	2,11	2,23	> 250
ARNm IL-6 (ng d'ARN*)	182	155	> 500
<b>Individu 3</b>			
IL-6 (ng/L)	6,64	4,77	> 250
ARNm IL-6 (ng d'ARN*)	144	99	> 500
<b>Individu 4</b>			
IL-6 (ng/L)	9,44	6,99	> 250
ARNm IL-6 (ng d'ARN*)	136	212	> 500
<b>Individu 5 **</b>			
IL-6 (ng/L)	20,01	ND	> 250
ARNm IL-6 (ng d'ARN*)	> 500	ND	> 500
<b>Individu 6</b>			
IL-6 (ng/L)	1,99	1,87	> 250
ARNm IL-6 (ng d'ARN*)	141	165	> 500

\* ng d'ARN total U937-LPS

\*\* Individu éliminé



**Tableau XV : Moyennes des taux de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 pour les stimulations avec 5000 pmol/L d'insuline.**

	n	Saline (0,89 % NaCl)	Insuline (5000 pmol/L)	LPS (0,02 mg/L)	p
TNF- $\alpha$ (ng/L)	5	< 2,00	< 2,00	> 250	ns
IL-6 (ng/L)	5	4,82 $\pm$ 2,86	3,81 $\pm$ 1,88	> 500	ns
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	5	262 $\pm$ 118	414 $\pm$ 237	> 500	ns
ARNm IL-6 (ng d'ARN)*	5	161 $\pm$ 26	161 $\pm$ 37	> 500	ns

Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type

\* ng d'ARN total U937-LPS

ns: non significatif

### **4.3.3. Effet de l'hypertriglycéridémie sur la production et l'expression du TNF- $\alpha$ et de l'IL-6**

La réponse à l'hypertriglycéridémie des cellules périphériques circulantes a été évaluée après ingestion d'un repas lipidique très gras chez trois individus. Les triglycérides dosés deux heures post-prandial se situaient entre 1,70 et 3,56 mmol/L ( $2,34 \pm 0,86$  mmol/L) et étaient près du double de la valeur des triglycérides à jeun ( $1,14 \pm 0,46$  mmol/L) ( $p=0,03$ ).

Les tableaux XVI et XVII présentent les taux de base (sujets à jeun, stimulation à la saline), deux heures (taux d'ARNm) et 6 heures (taux protéiques) post-ingestion du repas riche en triglycérides du TNF- $\alpha$  et d'IL-6. Les taux moyens sont rapportés dans le tableau XVIII. Deux sujets sur trois n'ont pas montré de taux mesurables de TNF- $\alpha$  avant ou après stimulation par les triglycérides. Le troisième individu est passé de 37,4 à 30,5 ng/L six heures post-prandial. Les taux d'IL-6 étaient non détectables pour un individu et diminués de moitié pour les deux autres sujets. L'ARNm du TNF- $\alpha$  a montré une diminution de près de trois fois pour les trois individus testés alors que l'ARNm de l'IL-6 a montré une augmentation de près de 1,5 fois chez deux individus sur trois. Le troisième sujet n'a montré ni augmentation, ni diminution. Au total, les différences observées étaient statistiquement non significatives.

Le contrôle négatif (stimulation avec la saline) a encore une fois servi à montrer les concentrations basales du TNF- $\alpha$  et d'IL-6. La stimulation avec le LPS a montré une augmentation très marquée de ces mêmes concentrations démontrant le fonctionnement adéquat de la réponse leucocytaire dans le système utilisé.

**Tableau XVI : Taux de TNF- $\alpha$  individuels en situation d'hypertriglycémie**

	Saline (0,89 % NaCl)	Triglycérides	LPS (0,02 mg/L)
<b>Individu 1</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	< 2,00	< 2,00	> 250
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	300	111	> 500
<b>Individu 2</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	37,44	31	> 250
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	234	91	> 500
<b>Individu 3</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	< 2,00	< 2,00	> 250
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	279	74	> 500

\* ng d'ARN total U937-LPS

**Tableau XVII : Taux d'IL-6 individuels en situation d'hypertriglycémie**

	Saline (0,89 % NaCl)	Triglycérides	LPS (0,02 mg/L)
<b>Individu 1</b>			
IL-6 (ng/L)	< 0,70	< 0,70	> 250
ARNm IL-6 (ng d'ARN*)	242	230	> 500
<b>Individu 2</b>			
IL-6 (ng/L)	4,76	2,20	> 250
ARNm IL-6 (ng d'ARN*)	118	156	> 500
<b>Individu 3</b>			
IL-6 (ng/L)	6,68	2,20	> 250
ARNm IL-6 (ng d'ARN*)	75	105	> 500

\* ng d'ARN total U937-LPS

**Tableau XVIII : Moyennes des taux de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 en situation d'hypertriglycéridémie**

	n	Saline (0,89 % NaCl)	Triglycérides	LPS (0,02 mg/L)	p
TNF- $\alpha$ (ng/L)	3	12,48 $\pm$ 21,61	10,17 $\pm$ 17,62	> 250	ns
IL-6 (ng/L)	3	3,81 $\pm$ 3,44	1,47 $\pm$ 1,27	> 500	ns
ARNm TNF- $\alpha$ (ng d'ARN*)	3	271 $\pm$ 34	92 $\pm$ 18	> 500	ns
ARNm IL-6 (ng d'ARN)*	3	145 $\pm$ 87	163 $\pm$ 63	> 500	ns

Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type

\* ng d'ARN total U937-LPS

ns: non significatif

#### **4.3.4. Effet de l'hyperleptinémie sur la production et l'expression du TNF- $\alpha$ et de l'IL-6**

L'effet de l'hyperleptinémie a été vérifié chez six individus normaux. Les échantillons de sang total obtenus de ces six sujets ont été stimulés avec 100 000 ng/L de leptine recombinante humaine pendant deux et six heures. La leptinémie chez ces patients à jeûn après six heures d'incubation se situait entre 5048 et 7860 ng/L ( $6862 \pm 1240$  ng/L) et était significativement différente des taux de base ( $1495 \pm 915$  ng/L) ( $p=0,0003$ ). Deux individus (individus 1 et 2) ont été éliminés de cette partie de l'étude puisque leurs taux endogènes de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 étaient très élevés.

Les tableaux XIX et XX rapportent les effets observés d'une leptinémie à 100 000 ng/L chez des individus normaux sur les taux mesurables de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 (résultats moyens rapportés dans le tableau XXI). La différence entre les concentrations de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 entre le tube stimulé (leptine) versus le tube non stimulé (salin) n'était pas significative (Tableau XXI). Les résultats pour l'ARNm des deux cytokines ne sont toutefois pas disponibles pour des raisons techniques. Encore une fois, le contrôle négatif reflétait les taux endogènes des deux cytokines à l'étude et le contrôle positif, les taux élevés de ces mêmes protéines.

**Tableau XIX : Taux de TNF- $\alpha$  individuels pour les stimulations avec 100 000 ng/L de leptine**

	Saline (0,89 % NaCl)	Leptine (100 000 ng/L)	LPS (0,02 mg/L)
<b>Individu 1**</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	212,7	124,6	> 250
<b>Individu 2**</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	131,4	231,8	> 250
<b>Individu 3</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	< 2,00	< 2,00	> 250
<b>Individu 4</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	8,19	6,16	> 250
<b>Individu 5</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	9,48	14,05	> 250
<b>Individu 6</b>			
TNF- $\alpha$ (ng/L)	19,24	16,48	> 250

\* ng d'ARN total U937-LPS

\*\* Individu éliminé

**Tableau XX : Taux d'IL-6 individuels pour les stimulations avec 100 000 ng/mL de leptine**

	Saline (0,89 % NaCl)	Leptine (100 000 ng/L)	LPS (0,02 mg/L)
<b>Individu 1**</b>			
IL-6 (ng/L)	ND	ND	ND
<b>Individu 2**</b>			
IL-6 (ng/L)	ND	ND	ND
<b>Individu 3</b>			
IL-6 (ng/L)	3,20	1,17	> 250
<b>Individu 4</b>			
IL-6 (ng/L)	32,21	45,50	> 250
<b>Individu 5</b>			
IL-6 (ng/L)	40,15	64,11	> 250
<b>Individu 6</b>			
IL-6 (ng/L)	30,51	37,89	> 250

\* ng d'ARN total U937-LPS

\*\* Individu éliminé

**Tableau XXI : Moyennes des taux de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 pour les stimulations avec 100 000 ng/L de leptine**

	n	Saline (0,89 % NaCl)	Leptine (100 000 ng/L)	LPS (0,02 mg/L)	P
TNF- $\alpha$ (ng/L)	4	9,48 $\pm$ 7,50	9,34 $\pm$ 7,29	> 250	ns
IL-6 (ng/L)	4	26,52 $\pm$ 16,10	37,27 $\pm$ 26,40	> 500	ns

Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type

\* ng d'ARN total U937-LPS

## 5. DISCUSSION

Nous avons entrepris cette étude pour évaluer tout d'abord l'expression basale du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 dans les cellules circulantes périphériques dans une population adulte normale ainsi qu'en fonction de la classe d'obésité. Par la suite, nous espérons éclaircir le lien entre une certaine réponse pro-inflammatoire et les anomalies biochimiques reliées à l'obésité. L'originalité du projet réside d'une part dans l'utilisation de tests RT-PCR quantitatifs développés dans le cadre de cette étude pour doser l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  dans l'obésité et d'autre part, par la création d'un modèle ex vivo de la biochimie de l'obésité dans lequel on pouvait vérifier certaines interactions « immunométaboliques » dans une matrice et un microenvironnement similaires à ceux se produisant chez des individus obèses.

### 5.1. Mise au point d'une méthode RT-PCR en temps réel pour le dosage du TNF- $\alpha$ et de l'IL-6.

L'utilisation de la technique d'amplification en chaîne par la polymérase (PCR) dans le diagnostic moléculaire est désormais bien établie. En cancérologie, c'est principalement la recherche de mutations qui est visée. On peut citer à titre d'exemple le gène RET dans les néoplasies endocriniennes multiples ou encore les gènes BRCA dans le cancer du sein. Le dosage, à titre de marqueur de tumeur, de l'ARNm dans la circulation par la RT-PCR suscite également beaucoup d'intérêt. Plusieurs études sur le sujet ont été publiées en particulier dans les cancers de la thyroïde et de la prostate. Enfin, la quantification par RT-PCR en temps réel revêt une importance particulière dans le domaine de la connaissance des profils des cytokines impliquées dans plusieurs processus pathologiques. Comme beaucoup de sources d'erreurs font partie intégrante des dosages classiques des cytokines (dosages immunologiques), une alternative à ces limitations consiste donc à quantifier par RT-PCR en temps réel l'ARNm des cytokines, habituellement exprimé à un très faible niveau. Deux techniques de PCR ont été mises au point dans le cadre de cette étude afin de quantifier l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 et par le fait même établir des



valeurs de référence pour ces deux analyses. De plus, ces tests moléculaires plus sensibles que les dosages immunologiques devaient permettre dans un deuxième temps de mettre en évidence les différences des taux plasmatiques du TNF- $\alpha$  entre les individus obèses et les sujets contrôles via le dosage de leurs ARN messagers.

Les techniques développées ont permis la quantification absolue de l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 dans les cellules périphériques circulantes d'individus minces, en surcharge pondérale et obèses. Afin d'en arriver à ce résultat, plusieurs aspects généraux de mise au point de techniques utilisant la PCR en temps réel ont été considérés. En premier lieu, il est généralement recommandé d'employer des amorces ayant une longueur de 15 à 30 pb, le nombre statistique minimum de nucléotides composant une amorce devant être égal à 17. Les amorces choisies avaient 19 pb pour l'amorce IL-6 sens, 20 pb pour l'amorce IL-6 antisens, 20 pb pour l'amorce TNF- $\alpha$  sens et 18 pb pour l'amorce TNF- $\alpha$  antisens. En plus, le contenu en GC doit se situer entre 30 et 80 % et ce, afin de permettre une meilleure dissociation des amorces au brin d'ADNc à amplifier. Encore une fois, le choix de nos amorces a respecté ces règles. Le contenu en GC pour les amorces de l'IL-6 sens et antisens était de 53 % et 50 % respectivement, alors que les amorces sens et antisens pour le TNF- $\alpha$  avaient un contenu en GC de 45 et 47 % respectivement. Un autre aspect à considérer concernant le choix des amorces est la longueur de l'amplicon. De façon optimale, le fragment amplifié doit être d'une longueur maximale de 500 pb, idéalement de 50 à 100 pb. À noter que plus les amplicons sont petits, plus les résultats obtenus seront consistants. Ceci se traduit par le fait que la PCR aura une efficacité augmentée et tolérera mieux différentes conditions de réaction. Les amplicons générés par les techniques PCR développées répondaient à ces critères : la taille du fragment amplifié correspondait à 251 pb pour l'IL-6 et à 279 pb pour le TNF- $\alpha$ . Nous sommes conscients que des amplicons de plus petite taille auraient pu être générés si nous avions choisi d'autres paires d'amorces. Toutefois, les amorces désignées pour cette étude sont celles qui ont présenté le plus grand signal de fluorescence et la température de fusion la plus précise.

La concentration en  $MgCl_2$  s'avère un point crucial dans le développement de techniques PCR. Tel que mentionné précédemment, le chlorure de magnésium joue un rôle important dans les interactions ADN/ADN ainsi que dans la formation de complexes avec les dNTPs qui forment les substrats pour la Taq Polymérase. Les valeurs généralement rapportées dans la littérature sont de 1 à 4  $\mu\text{mol/L}$ . Les concentrations employées ont été établies à 4 mM pour l'IL-6 et à 2 mmol/L pour le TNF- $\alpha$ . Le risque encouru avec l'utilisation de concentrations de  $MgCl_2$  élevées est que les amplicons ne réussissent plus à se dénaturer complètement lorsque la température grimpe à 94 °C. Si tel avait été le cas, nous n'aurions pas observé une amplification exponentielle de nos amplicons. Ces concentrations élevées de  $MgCl_2$  peuvent s'expliquer par le fait qu'une grande quantité d'ADNc (150 ng) a été soumise à la PCR. Pour la même raison, les concentrations d'amorces utilisées pour 30 cycles de PCR (2,00  $\mu\text{mol/L}$  pour l'IL-6 et 2,45  $\mu\text{mol/L}$  pour le TNF- $\alpha$ ) étaient largement plus élevées que les concentrations d'amorces généralement employées (idéalement entre 10 et 50 pmol/L). Cette fois-ci, l'utilisation de grandes concentrations d'amorce peut être risquée et peut engendrer la formation de dimères d'amorces très tôt dans la réaction de PCR. Toutefois, ces dimères d'amorces sont visibles et même immanquables sur le graphique de la dérivée de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. Ces derniers sont trahis par la formation de pics correspondant à des températures plus basses que celle du fragment amplifié. Dans notre cas, des dimères d'amorces n'ont pas été observés ni pour la technique d'amplification de l'ARNm du TNF- $\alpha$ , ni pour celle de l'ARNm de l'IL-6.

Une étape importante suivant l'élaboration de nouvelles techniques de laboratoire est la validation analytique des méthodes développées. Entre autres, la reproductibilité (précision) et l'exactitude doivent être sérieusement évaluées pour produire des résultats cliniquement valables. La sensibilité analytique des techniques d'amplification de l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 a été déterminée à partir de la perte de linéarité de la réaction d'amplification. Dans le cadre de cette étude, la sensibilité visée était de 2 pg d'ARN total cible soit l'équivalent d'une cellule unique. La

sensibilité analytique obtenue pour l'ARNm du TNF- $\alpha$  était de 1,9 ng d'ARN total U937-LPS et pour l'IL-6, 7,8 ng d'ARN total U937-LPS.

La spécificité de la technique a été confirmée d'une part par l'obtention d'une température de fusion de 86 °C pour l'IL-6 et de 87,5 °C pour le TNF- $\alpha$  et d'autre part par la visualisation sur gel d'agarose à 1 % des amplicons de taille prévue de 251 pb pour l'IL-6 et de 279 pb pour le TNF- $\alpha$ . Cet aspect de la validation analytique est par ailleurs influencé par le nombre de cycles. Idéalement, la réaction de PCR doit donner un signal de fluorescence entre 25 et 30 cycles. Plus le nombre de cycles augmente, plus la possibilité d'obtenir des dimères d'amorces s'en trouve augmentée et par conséquent, la spécificité diminuée. Enfin, l'absence d'amplification avec de l'ADNg, témoignant de la spécificité des méthodes générées à l'ARNm, élimine la possibilité de génération de faux positifs par les techniques d'amplification mises au point.

L'exactitude, généralement définie comme étant la capacité d'une technique à détecter la vraie valeur ou valeur exacte d'un analyte dans un échantillon, est une autre caractéristique essentielle de tout test diagnostique. En raison d'un manque de méthode de référence reconnue comme étant sans biais ou encore d'étalon certifié, ce paramètre analytique n'a pas été évalué dans le cadre de cette étude. Toutefois, la précision des méthodes développées permet tout de même la distinction des taux d'ARNm de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 entre des individus d'IMC normal et des individus obèses.

Dans un autre ordre d'idées, la linéarité des deux méthodes développées s'étendait de 7,8 à 500 ng d'ARN total U937-LPS. On a noté par ailleurs une excellente régression linéaire pour les deux techniques ( $r = -1,00$  ou  $-0,99$ ).

La RT-PCR est une méthode rapide, spécifique et sensible qui permet la détection de faibles quantités d'ARN. Toutefois, même des variations mineures au niveau de l'extraction d'ARN et de la transcription inverse vont être multipliées par la PCR. Ceci explique les variations intra et inter-essais observées. Le CV intra-essai visé était de 6 % et le CV inter-essai, de 10 %. Ces CV n'ont pas été atteints : la variation intra-essai observée était 15,24 % et 7,15 % pour l'IL-6 et le TNF- $\alpha$

respectivement alors que la variation inter-essai observée était de 22,5 % pour l'IL-6 et de 11,60 % pour le TNF- $\alpha$ . La variabilité inter-essai observée était plus grande que la variabilité intra-essai et semble expliquée par le fait que les échantillons soumis à différentes routines provenaient de RT différentes. Enfin, la différence de variabilité inter-essai entre l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  démontre que la technique développée pour amplifier l'ARNm du TNF- $\alpha$  semble beaucoup plus robuste que celle ayant été élaborée pour le dosage de l'ARNm de l'IL-6. Une solution pour améliorer la variation inter-essai aurait été de doser les contrôles et les patients en triplicata, voire en quadruplicata.

Finalement, il est difficile de conclure définitivement à propos de la validité clinique des deux méthodes de quantification de l'ARNm développées. En effet, la comparaison avec d'autres techniques est complexe : les autres techniques rapportées dans la littérature utilisent des lignées cellulaires et/ou un type de quantification et/ou un type de calibrateurs (lignées cellulaires versus insertion de gènes dans des vecteurs) qui diffèrent de ce qui a été utilisé dans le cadre de cette étude. De plus, il n'y pas encore de méthode de référence établie pour comparer toutes les méthodes développées. Toutefois, il est possible d'affirmer que quelques faiblesses caractérisent nos méthodes. Ces faiblesses résident dans l'extraction du culot cellulaire du sang total. La technique d'extraction employée dans cette étude isole toute la couche leucocytaire, alors que la lignée cellulaire à partir de laquelle nous avons construit notre courbe de calibration est une lignée de monocytes humains. Il aurait été préférable d'utiliser une technique d'extraction au Ficoll puis extraire les monocytes seulement, d'autant plus que ce type cellulaire est abondamment rapporté comme étant impliqué dans la production du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 dans l'obésité. Enfin, même si la RT-PCR est une technique puissante et utile, il y a tout de même un besoin d'optimisation plus précis et plus extensif. Entre autres, la normalisation des résultats avec un gène de référence, l'utilisation d'étalons commerciaux standardisés ainsi que des ampoules commercialisées servant à titre de contrôles constituent des solutions devant être envisagées. Par contre, il est important de rappeler que les techniques développées ont tout de même permis une quantification valable de l'ARNm du TNF-

$\alpha$  et de l'IL-6 dans les cellules périphériques circulantes originant de populations mince, en surcharge pondérale et obèse. À notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir quantifié ces paramètres pour comparer les statuts inflammatoires des différents statuts pondéraux.

## **5.2. Vérification de la production de TNF- $\alpha$ et d'IL-6 par les cellules périphériques circulantes.**

Dans cette partie de l'étude, nous avons voulu vérifier si les cellules circulantes périphériques étaient impliquées dans la surproduction d'IL-6 et du TNF- $\alpha$ . Par le fait même, les niveaux d'expression leucocytaire d'IL-6 et du TNF- $\alpha$  comparés chez des individus ayant un poids normal, un excès de poids ou obèses ont été compilés pour établir des valeurs de référence de l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 à jeun chez des individus sains et présentant différents indices de masse corporelle. Comme des valeurs de référence pour ces analyses n'avaient pas encore été rapportées dans la littérature et comme l'engouement pour le dosage du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 ne cesse de croître, les valeurs que nous avons établies à partir de la plage de valeurs se situant entre les 2,5 et 97,5 centiles de la population étudiée pourraient également servir à titre de référence dans la pratique clinique.

### **5.2.1. Valeurs de référence établies à partir d'un échantillon d'individus minces**

En vue de définir une population adulte normale à titre de référence, nous avons identifié les individus ayant un IMC se situant entre 18,5 et 24,9 kg/m<sup>2</sup> et nous avons éliminé les individus recrutés qui ne présentaient pas des profils biochimiques et hématologiques normaux (c'est-à-dire des valeurs supérieures à trois écart-types de la moyenne). Aucune des valeurs obtenues de l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 n'était supérieure à trois écart-types de la moyenne. Ceci ayant été vérifié, les valeurs de référence obtenues qui correspondaient aux 2,5 et 97,5 centiles étaient de 21[0-63] et

256[213-299] ng d'ARN total U937-LPS pour l'ARNm du TNF- $\alpha$ , et de 47 [0-140] et 446 [353-539] ng d'ARN total U937-LPS pour l'ARNm de l'IL-6.

On note une distribution d'allure gaussienne pour l'ARNm du TNF- $\alpha$ , indiquant que l'ensemble des individus recrutés pourrait être représentatif de la population saine alors que ce n'est pas le cas pour l'ARNm de l'IL-6. Afin de déterminer si les observations obtenues étaient issues d'une distribution normale, un test de Shapiro-Wilk a été effectué pour les valeurs de l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6, pour les genres confondus. La distribution des valeurs de l'ARNm du TNF- $\alpha$ , pour les genres confondus, a été confirmée par le test. Cependant, comme la distribution de l'ARNm de l'IL-6 ne présentait pas une distribution normale avec le test de Shapiro-Wilk, les valeurs ont été transformées en log. Ceci ayant été fait, la normalité de la courbe n'a pas plus été obtenue chez les deux genres combinés. Il va sans dire qu'étant donné la faible taille de l'échantillon d'individus normaux recrutés ( $n=22$ ), la normalité ne peut être totalement confirmée, mais on devrait plutôt parler de tendance à la normalité. En effet, un échantillon doit avoir une taille d'au minimum 120 individus pour pouvoir établir des valeurs de référence avec des percentiles précis (Solberg HE, 1999). Le délai imposé par la durée de la maîtrise combiné aux grandes difficultés de recrutement de sujets résultant des nombreux critères d'exclusion restrictifs de l'étude, ne nous ont malheureusement pas permis d'atteindre une taille d'échantillon composée d'au minimum 120 individus pour établir de façon précise des valeurs de référence pour l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6.

D'autres aspects de l'étude ont pu influencer les valeurs de référence obtenues et par conséquent, leur distribution. Il est important de se rappeler que l'IMC a été calculé en fonction de la taille et du poids rapporté par l'individu lui-même lors de son recrutement. Ainsi, puisque aucune mesure de la taille ni du poids n'a été effectuée, il se peut qu'un biais soit survenu dans la cueillette des données basée sur la franchise des individus recrutés. Un autre aspect pouvant influencer les distributions de l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 est le choix de la mesure employant l'IMC pour classifier les individus recrutés. L'IMC peut être surestimé chez des individus minces mais qui ont une forte masse musculaire. Pour pallier ce problème, une mesure du tour de taille

aurait été intéressante à effectuer chez tous les patients recrutés. De cette façon, la classification des patients dans les catégories « individus minces », « individus ayant un surpoids » et « individus obèses » aurait été plus juste. Toutefois, la mesure du tour de taille et la pesée ont délibérément été omises pour deux raisons pratiques. Tout d'abord, le recrutement ayant été effectué chez des patients se présentant au Centre des prélèvements pour ne subir qu'une ponction veineuse, certains auraient pu trouver inacceptable d'y ajouter la mesure de leur tour de taille et de leur poids. Dans un second temps, la prise de ces mesures aurait considérablement augmenté le temps passé dans les salles de prélèvement et, considérant la situation actuelle dans les hôpitaux, il aurait été inacceptable d'allonger encore plus le temps d'attente dans les cliniques, déjà très long.

### **5.2.2. Corrélations entre l'IMC et l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$ et de l'ARNm de l'IL6**

Dans un premier temps, les analyses ANOVA ont révélé que les différences entre les résultats des dosages du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 des différentes catégories d'individus n'étaient pas statistiquement significatives. Ceci n'était vraisemblablement pas dû à un manque de différence significative entre l'IMC des trois catégories de patients qui étaient tous significativement différents ( $p < 0,0001$ ). En conséquence, l'absence de différence significative entre les taux de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 s'explique par le fait que le nombre d'individus recrutés était largement insuffisant pour obtenir des résultats significatifs. Encore une fois, les difficultés de recrutement et les délais de maîtrise sont à l'origine de la petite taille de l'échantillon. Avant de conclure sur le sujet, il serait nécessaire d'augmenter la taille échantillonnale et de répéter l'expérience. Par ailleurs, il se peut que les différences dans les dosages du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 ne soient pas détectables. Les individus obèses recrutés étaient généralement métaboliquement sains. Par contre, les individus obèses métaboliquement non sains risquaient plus de présenter des différences dans les dosages du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 que chez notre catégorie d'individus obèses mais apparemment sains au niveau

métabolique. Il aurait donc été intéressant d'effectuer les dosages chez des individus obèses métaboliquement non sains afin de comparer les concentrations.

Dans un deuxième temps et contrairement à ce que nous avons anticipé, nous n'avons pas démontré de relation linéaire entre les taux d'ARNm du TNF- $\alpha$  et l'IMC ainsi qu'entre les taux d'ARNm de l'IL-6 et l'IMC. Il est bien évident qu'encore une fois, un nombre plus élevé d'individus aurait pu démontrer le contraire. Pour l'instant, il est difficile de conclure à propos de relation existant ou non entre ces variables continues. Par contre, une relation significative a été démontrée entre les taux d'ARNm du TNF- $\alpha$  et les taux d'ARNm de l'IL-6. Ceci voudrait donc dire qu'un individu ayant un taux élevé d'ARNm du TNF- $\alpha$  aurait également un taux élevé d'ARNm de l'IL-6 et vice-versa. La possibilité que ces résultats aient été le résultat d'une infection quelconque est à exclure puisque tout patient présentant une possibilité d'infection a été rejeté de l'étude par le biais du questionnaire de santé rempli lors du recrutement. Cependant, la corrélation observée dans le cadre de cette étude peut s'expliquer par le fait que les taux d'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 ont été dosés à partir d'un spécimen provenant d'une seule et même extraction du culot cellulaire et d'une seule et même extraction d'ARN. Afin de voir si la relation linéaire existant entre les taux du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 est due à cette étape préanalytique, il aurait été intéressant de doser l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 provenant d'extraction de culots cellulaires et d'ARN différents. Enfin, il est justifié de se questionner à propos de la possibilité de changements dans l'expression d'un gène qui pourraient survenir durant la phase préanalytique de la préparation des échantillons. Par exemple, se pourrait-il que les cellules subissent un choc ou une agression quelconque de sorte que les taux d'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 présenteront une relation linéaire entre eux?

Malgré tout, l'ARNm a pu être quantifié pour toutes les catégories de poids investiguées alors que les dosages plasmatiques du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 se sont avérés inférieurs à la limite de la sensibilité de la technique. Ainsi, même si la sensibilité visée des techniques de PCR développées n'a pas été atteinte, il en demeure pas moins que ces techniques étaient suffisamment sensibles pour permettre la quantification de



l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 chez des individus minces, présentant un excès de poids et chez des individus obèses.

### **5.3. Investigation du potentiel pro-inflammatoire de 4 paramètres biochimiques rencontrés en excès dans l'obésité : glucose, insuline, leptine et triglycérides**

L'objectif de cette partie de l'étude était d'examiner les effets de certains facteurs métaboliques à taux élevé de façon chronique chez les individus obèses sur les taux mesurables et l'expression des ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6. La mise au point d'un modèle ex vivo de la biochimie de l'obésité dans lequel on pouvait vérifier certaines interactions « immunométaboliques » dans une matrice et un microenvironnement similaires à ce qui pouvait se produire in vivo chez les individus obèses constituait une approche innovatrice qui aurait pu nous permettre plusieurs observations relatives à la biochimie de l'obésité.

Il a été clairement démontré dans la littérature que l'hyperglycémie stimule la synthèse et la sécrétion de TNF- $\alpha$  avec les monocytes humains frais (Shanmugam et al., 2003, Moroshi et al., 1996, Guha et al., 2000). Nos résultats n'ont pas démontré une telle relation. Au niveau protéique, un seul individu a montré une augmentation de TNF- $\alpha$ , les quatre autres sujets ayant présenté des taux non détectables avant et après stimulation. La production d'IL-6 en conditions d'hyperglycémie est restée inchangée pour trois sujets alors qu'une légère diminution du taux protéique a été observée chez deux individus sur cinq. En ce qui a trait l'ARNm du TNF- $\alpha$ , deux individus ont montré une diminution, deux individus sont restés inchangés et un individu a montré une augmentation de concentration. L'ARNm de l'IL-6 n'a pas montré de profil semblable : deux individus ont montré une légère augmentation des taux et deux autres individus ont montré une diminution tandis qu'un individu est demeuré inchangé. L'individu ayant montré une diminution assez marquée pour l'ARNm du TNF- $\alpha$  a subi une diminution assez marquée également pour l'IL-6. Toutefois, aucun des taux d'ARNm ne semble corrélérer avec les taux protéiques respectifs pour chacun des

individus. En plus, les analyses ANOVA ont démontré que les différences observées entre les taux endogènes et les taux soumis à 20 mmol/L de glucose du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 n'étaient pas significatives. Par contre, ceci ne semble pas la conséquence d'une mauvaise stimulation puisque les glycémies six heures post-stimulation étaient toutes élevées ( $p=0,001$ ) et que le système ex vivo répondait bien à la stimulation par le LPS montrant que la capacité des leucocytes à synthétiser le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 était préservée.

Tel qu'attendu, les effets de l'hyperinsulinémie (élevée chez tous les patients mis à part un individu exclu en raison de la possibilité de dégradation de l'insuline ou de la possibilité d'avoir ajouté une quantité insuffisante d'insuline dans le tube) sur la production du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 se sont révélés comme étant anti-inflammatoires. D'une part, les taux protéiques du TNF- $\alpha$  sont tous restés indétectables après stimulation avec une concentration élevée d'insuline alors que trois individus sur cinq ont montré une diminution des concentrations en IL-6 protéique. Toutefois, les différences observées concernant l'expression du TNF- $\alpha$  et d'IL-6 sont un peu révélatrices. Une tendance à la hausse pour trois sujets a été dégagée alors que les deux autres individus ont montré une légère baisse des taux d'ARNm du TNF- $\alpha$ . Un effet inverse a étonnamment été observé chez trois individus sur les taux d'ARNm d'IL-6. Il est nécessaire de préciser que les trois individus ayant montré une tendance à la hausse pour le TNF- $\alpha$  ne sont pas les trois mêmes individus ayant montré une baisse d'IL-6. D'autre part, les taux d'ARNm ne concordaient pas avec les concentrations protéiques rapportées. En plus, toutes les différences rapportées concernant les effets de l'hyperinsulinémie sur les cellules périphériques du sang total n'ont pas été significatives encore une fois.

Nous avons observé une récupération seulement partielle de l'insuline six heures post-stimulation. En effet, les concentrations rapportées sont nettement plus basses, près de la moitié des concentrations attendues. Par contre, plusieurs essais ont été effectués avant de procéder aux stimulations avec l'insuline et cette tendance a été observée à chaque fois. Considérant ceci, nous avons décidé de stimuler avec de plus grandes concentrations d'insuline, qui demeuraient néanmoins plus élevées que celles

rencontrées chez les individus obèses, afin de compenser pour la dégradation ou l'inhibition observée.

Un problème d'ordre technique concernant la stimulation de sang total in vitro d'individus minces avec les acides gras libres, le cholestérol et les triglycérides nous a limités pour cette partie de l'étude. Effectivement, la reconstitution in vitro de ces substances commerciales n'est possible qu'avec de l'éthanol absolu et des solvants organiques. Puisque l'éthanol absolu engendre une hémolyse prononcée et les solvants organiques ne sont nullement représentatifs de l'environnement in vivo et auraient pu affecter la synthèse du TNF  $\alpha$  et de l'IL6, nous avons dû rejeter l'utilisation des acides gras libres, du cholestérol et des triglycérides vendus en poudre commercialement pour cette partie du projet. Toutefois, une solution de rechange entraînant une modification au protocole a été considérée. Il s'agissait de faire ingérer un repas lipidique à des individus minces à jeun et d'effectuer un prélèvement pré-prandial et deux heures post-prandial. Ce repas était composé de 350 mL de crème 35 % fouettée, 2 cuillerées à thé de sirop à saveur de chocolat, 1 cuillerée à thé de sucre granulé et une cuillerée à thé de lait en poudre sans gras. Des 1400 calories ingérées, 3 % provenaient de protéines (9,5 g), 14 % d'hydrates de carbone (48 g) et 83 % de gras (130 g). Le contenu en cholestérol était de 480 mg et le ratio gras polyinsaturés/saturés de 0,06 (Patsch JR, 1987). Toutefois, après quelques répétitions de ce repas chez différents individus, les taux de triglycérides obtenus deux heures post-prandial se sont révélés non-représentatifs du statut lipidique rencontré chez les obèses. Par conséquent, nous avons opté pour l'ingestion d'un repas très calorique à jeun (déjeuner américain) et les résultats du bilan lipidique obtenu deux heures après ingestion du repas se sont révélés satisfaisants. La triglycéridémie post-prandiale a doublé chez nos trois participants. Ce dernier protocole a été retenu pour cette étape de l'étude visant à vérifier in vitro l'effet de l'hypertriglycéridémie rencontrée chez les individus obèses sur la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 par les cellules périphériques circulantes. Un même individu a montré une baisse des taux mesurables de TNF- $\alpha$  et d'IL-6, effet contraire de ce qui a été rapporté dans la littérature. Un autre individu a également montré une diminution du taux d'IL-6. Étonnamment, les cellules

périphériques circulantes ont montré une forte diminution de l'ARNm du TNF- $\alpha$  en présence de l'hypertriglycéridémie. Par contre, cet effet peut avoir été le résultat de conditions différentes d'exposition à la saline et aux triglycérides : le sang stimulé avec de la saline a été prélevé à jeun (au temps zéro) et a immédiatement été placé à 37 °C jusqu'à l'extraction de l'ARN du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6, deux heures après le prélèvement. La stimulation en présence d'hypertriglycéridémie a par contre été effectuée in vivo puisque le prélèvement et l'extraction d'ARN ont été effectués deux heures post-prandial. Sachant ceci, il est possible d'expliquer les taux d'ARNm du TNF- $\alpha$  plus élevés rencontrés dans le spécimen ex-vivo stimulé avec de la saline comme étant le résultat d'un stress cellulaire subi in vitro pendant les deux heures d'incubation. Toutefois, si un stress cellulaire était survenu, cet effet aurait été retrouvé dans le dosage de l'ARNm d'IL-6, ce qui n'a pas été le cas. Encore une fois, il est impossible d'affirmer que les effets observés étaient dus à l'hypertriglycéridémie puisque toutes les différences observées n'étaient pas significatives.

La dernière étape dans l'évaluation de la réponse des cellules périphériques circulantes aux conditions biochimiques rencontrées dans l'obésité était celle de l'effet de l'hyperleptinémie sur la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-6. Des concentrations de leptine dans le sang total équivalentes à 100 000 ng/L (50 à 80 % de récupération) ont engendré une diminution de la production du TNF- $\alpha$  chez deux individus sur quatre, une augmentation chez un sujet et aucun effet auprès d'un participant. À l'inverse, trois sujets sur quatre ont montré une augmentation de l'IL-6 protéique alors qu'un individu a montré des taux inchangés. Ces différences observées ne sont toutefois pas significatives. Comme pour le glucose, l'insuline et les triglycérides, l'investigation de l'effet de l'hyperleptinémie n'a pas été concluante.

Cette partie de l'étude visant à investiguer les effets des paramètres biochimiques perturbés dans l'obésité est sujette à plusieurs critiques. En premier lieu, nous devons nous questionner sur les choix faits concernant les temps d'incubation pour permettre l'expression de l'ARNm (deux heures post-stimulation) et la sécrétion des protéines (six heures post-stimulation). La stratégie que nous avons employée était de tester tout d'abord la réponse au glucose, à l'insuline, à la leptine et aux

triglycérides pour mesurer l'effet initial puis d'effectuer des courbes temps-réponses pour l'expression des ARNms et pour la production des protéines. La limite de temps imposée par la durée de la maîtrise ne nous a pas permis de procéder à ces courbes temps-réponse.

Dans un deuxième temps, les concentrations utilisées des paramètres biochimiques qui sont perturbés dans l'obésité ont été quelque peu exagérées afin de tenter d'obtenir un effet aigu de production et d'expression du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6. Toutefois, l'objectif de cette étude était d'essayer de reproduire le plus fidèlement possible la biochimie de l'obésité. Les concentrations de glucose, d'insuline et de leptine employées étaient plutôt représentatives d'une stimulation aiguë. Idéalement, il aurait été préférable de stimuler avec des concentrations moins élevées de glucose, d'insuline et de leptine mais de stimuler sur une plus longue durée afin d'observer de façon pseudo-chronique les effets de ces paramètres biochimiques. En plus, la chronicité de l'hyperglycémie et du stress oxydatif engendre des paramètres non-évalués dans cette étude. En effet, il a été démontré que l'hémoglobine glyquée et les peroxydes lipidiques ou LDL oxydés exercent un effet stimulant sur la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 par les monocytes isolés (Desfaits et al., 1998). Par contre, il s'avère difficile de tester cette chronicité de la biochimie de l'obésité dans notre modèle puisque les cellules sanguines ne sont plus dans un environnement semblable à celui rencontré *in vivo*. La déplétion des nutriments et l'accumulation des déchets ont sans doute pu provoquer un stress aux cellules périphériques circulantes qui produisent les cytokines pro-inflammatoires à l'étude et ce, sans que ce soit le résultat de la stimulation avec le glucose, l'insuline, la leptine et les triglycérides.

En troisième lieu, nous ne pouvons conclure de relation de cause à effet pour cette partie du projet puisqu'il aurait fallu, en plus de tout ce qui a été rapporté précédemment, combiner les différents paramètres biochimiques investigués pour être le plus fidèles possible à l'environnement sanguin d'un sujet obèse. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, le bilan biochimique d'un obèse est caractéristique et comprend entre autres une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, une hyperleptinémie et une hypertriglycéridémie, tous ces paramètres étant combinés

ensemble dans la circulation sanguine. Une combinaison de ces différents « inducteurs métaboliques » aurait pu démontrer une synergie d'effet entre certains de ces facteurs.

En quatrième lieu, nous devons nous questionner sur les différences rapportées entre les taux de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 résultant de la stimulation avec de la saline et les taux résultant des stimulations avec le glucose, l'insuline, la leptine et les triglycérides. En effet, les valeurs protéiques rapportées sont à la limite de détection des techniques ELISA employées. De plus, les différences observées, que ce soit pour la protéine ou pour l'ARNm peuvent résulter de la précision analytique des techniques. Bien que chaque dosage ait été effectué en duplicata, il aurait été préférable de répéter les mêmes stimulations avec les mêmes individus plusieurs fois pour mieux pouvoir détecter un effet. Par contre, un risque est associé à une telle procédure puisque le statut inflammatoire d'un même individu peut changer énormément d'une journée à l'autre et même à l'intérieur d'une même journée.

## 6. CONCLUSION

Dans les présents travaux, j'ai réussi à mettre au point deux techniques originales de réaction de polymérase en chaîne en temps réel qui permettent non seulement de quantifier l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 présent dans les cellules circulantes périphériques mais qui, en plus, compensent pour le manque de sensibilité des techniques immunologiques habituellement employées pour doser ces cytokines, exprimées à la plupart du temps à un très faible niveau. Toutefois, ces techniques demeurent (surtout dans le cas de l'IL-6) encore sujettes à des variations hors de notre volonté dans la fabrication commerciale des amorces.

Sur la base de nos résultats, nous avons également tenté d'établir des valeurs de référence pour l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6. Malheureusement, les grandes difficultés de recrutement ne nous ont pas permis d'obtenir un nombre suffisant d'individus pour établir de telles valeurs qui auraient pu servir à titre de référence dans la pratique clinique. Nos critères de rejet sont grandement responsables de cette difficulté. Toutefois, il était nécessaire de démontrer une certaine rigueur dans le recrutement, particulièrement à propos du statut inflammatoire des patients recrutés. Le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 étant deux cytokines pro-inflammatoires très vite induites par différents stimuli, nous devions être certains que les individus recrutés ne présentaient aucune forme d'inflammation ou de maladie inflammatoire et surtout, que ces individus n'avaient pas pris de médicaments anti-inflammatoires. D'autre part, la quantification des ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 chez les sujets minces, présentant une surcharge pondérale et obèses ne nous a pas permis de démontrer de différence dans le statut inflammatoire rapporté entre ces trois groupes et ce, en bonne partie par des difficultés de recrutement. Puisque les taux protéiques mesurables du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 sont très faibles et que les différences entre les individus minces et obèses rapportés dans la littérature ne sont pas très impressionnantes, il aurait été fort intéressant de démontrer une telle différence à partir de nos dosages d'ARNm. En plus, une façon d'augmenter la différence entre les sujets minces et obèses aurait été d'effectuer les dosages chez des individus obèses métaboliquement non sains et qui risquent par conséquent d'avoir

un statut inflammatoire chronique un peu plus sévère que les individus obèses mais métaboliquement sains, afin de comparer les concentrations.

Finalement, il reste beaucoup de travail à faire pour valider notre modèle de stimulation in vivo. Nous avons tout de même démontré que nos cellules gardaient la capacité de fabriquer des cytokines pro-inflammatoires sous stimulation avec le LPS, mais pas nécessairement avec des « agresseurs » plus physiologiques tels que ceux utilisés dans nos études de façon séparée.



## RÉFÉRENCES

Adam O. Dietary fatty acids and immune reactions in synovial tissue. *Eur J Med Res* 2003;8:381-7.

Adderley-Kelly B and Williams-Stephens E. The relationship between obesity and breast cancer. *ABNF J* 2003; 14:61-5.

Aekplakorn W, Chaiyapong Y, Chariyalertsak S, Kunanusont C, Phoolcharoen W and Suriyawongpaisal P. Prevalence and determinants of overweight and obesity in Thai adults: results of the Second National Health Examination Survey. *J Med Assoc Thai* 2004;87:685-93.

Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R and White MF. The c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate and phosphorylation of Ser<sup>307</sup>. *J Biol Chem* 2000; 275:9047-54.

Ahima RS and Flier JS. Leptin. *Ann Rev Physiol* 2000;62:413-37.

Ajani UA, Ford ES and Mokdad AH. Prevalence of high c-reactive protein in persons with serum lipid concentrations within recommended values. *Clin Chem* 2004;50:1618-22.

Anderson JJ and Felson DT. Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health And Nutrition Examination Survey (HANES I) *Am J Epidemiol* 1988;128:179-89.

Barrett KE. Cytokines : sources, receptors, and signaling. *Baillières Clin Gastroenterol* 1996;10:1-15.

Basdevant A. Clinique des obésités de l'adulte. *Médecine/Sciences* 1998;14:925-34.

Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3338-42.

Belahsen R, Mziwira M and Fertat F. Anthropometry of women childbearing age in Morocco : body composition and prevalence of overweight and obesity. *Public Health Nutr* 2004;7:523-30.

Bélanger-Ducharme F and Tremblay A. Prevalence of obesity in Canada. *Obes Rev* 2005;6:183-6.

Bienvenu J, Coulon L, Doche C, Gutowski MC, Grau GE. Analytical performances of commercial ELISA-Kits for IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$ . A WHO study. *Eur Cytokine Netw*, 1993;4:447-51.

Birmingham CL, Muller JL, Palepu A, Spinelli J and, Anis AH. The cost of obesity in Canada. *CMAJ* 1999;160:483-8.

Browning LM, Krebs JD and Jebb SA. Discrimination ratio analysis of inflammatory markers : implications for the study of inflammation in chronic disease. *Metabolism* 2004;53:899-903.

Bruun JM, Pedersen SB and Richelson B. Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1267-73.

Bruun JM, Verdich C, Toubro S, Astrup A, Richelsen B. Association between measures of insulin sensitivity and circulating levels of interleukin-8, interleukin-6 and

tumor necrosis factor- $\alpha$ . Effect of weight loss in obese men. *Eur J Endocrinol* 2003;148:535-42.

Bruun JM, Lihn AS, Madan AK, Pedersen SB, Schiott KM, Fain JN, Richelsen B. Higher production of IL-8 in visceral vs subcutaneous adipose tissue. Implication of nonadipose cells in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E8-E13.

Bullo M, Garcia-Lorda P, Megias I, Salas-Salvado J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes Res* 2003;11:525-31.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MD. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;348:1625-38.

Capeau J. Voies de signalisation de l'insuline: mécanismes affectés dans l'insulino-résistance. *Médecine/Sciences* 2003;19:834-9.

Campos G, Ryder Diez-Ewald M, Rivero F, Fernandez V, Raleigh X and Arocha-Pinango CL. Prevalence of obesity and hyperinsulinemia: its association with serum lipid and lipoprotein concentrations in healthy individuals from Maracaibo, Venezuela. *Invest Clin* 2003;44:5-19.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, and Caro JF. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *NEJM* 1996;334:292-5.

Dandonna P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E and Ahmad S. Insulin inhibits intranuclear factor  $\kappa$ B and stimulates I $\kappa$ B in mononuclear cells in obese subjects: Evidence for an anti-inflammatory effect ? *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3257-65.

Del Rio-Navarro BE, Velazquez-Monroy O, Sanchez-Castillo CP, Lara-Esqueda A, Berber A, Fanghanel G, Violante R, Tapia-Conyer R and James WP. The high prevalence of overweight and obesity in mexican children. *Obes Res* 2004;12:215-23.

De Sereday M, Gonzalez C, Giorgini D, De Loredo L, Braquinsky J, Cobenas C, Libman C and Tesone C. Prevalence of diabetes, obesity, hypertension and hyperlipidemia in the central area of Argentina. *Diabetes Metab* 2004;30:335-9.

Desfaits AC, Serri O and Renier G. Normalization of plasma lipid peroxides, monocyte adhesion, and tumor necrosis factor- $\alpha$  production in NIDDM patients after gliclazide treatment. *Diabetes Care* 1998;21:487-93.

Duncan BD, Schmidt MI, Offenbacher S, Wu KK, Savage PJ, Heiss G. Factor VIII and other hemostasis variables are related to incident diabetes in adults. *Diabetes Care* 1999;22:767-72.

Duncan BB, Schmidt MI, Chambless LE, Folsom AR, Carpenter M, Heiss G. Fibrinogen, other putative markers of inflammation, and weight gain in middle-aged adults- The ARIC study. *Obes Res* 2000;8:279-86.

Eckel RH. Obesity and heart disease. *Circulation* 1997;96:3248-50.

Edrees AF, Misra SN and Abdou NI. Anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in rheumatoid arthritis: correlation of TNF-alpha serum level with clinical response and benefit from changing dose or frequency of infliximab infusions. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23:469-74.

Ellsworth DL, Rittenhouse KD and Honeycutt RL. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques* 1993;14:214-7.

Engeli S, Feldpaush M, Gorzelniak K, Hartwig F, Heintze U, Janke J, Mohlig M, Pfeiffer AFH, Luft FC, Sharma AM. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes* 2003;52:942-7.

Erem C, Arslan C, Hacıhasanoğlu A, Deger O, Topbas M, Ukinç K, Ersoz HO and Telatar M. Prevalence of obesity and associated risk factors in a Turkish population (Trabzon city, Turkey). *Obes Res* 2004;12:1117-27.

Fain JN, Madan AK, Hiler L, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004;145:2273-82.

Feingold KR, Serio MK, Adi S, Moser AH and Grunfeld C. Tumor necrosis factor stimulates hepatic lipid synthesis and secretion. *Endocrinology* 1989;124:2336-42.

Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J and Ricart W. Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. *Diabetes Care* 2003;26:1362-8.

Fernandez-Real M, Lopez-Bermejo A, Broch M, Vendrell J, Richart C and Ricart W. Circulating soluble CD14 monocyte receptor is associated with increased alanine aminotransferase. *Clin Chem* 2004;50:1456-7.

Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998;22:39-47.

Folsom AR, Qamhich HT, Flack JM, Hilner JE, Liu K, Howard BV, Tracy RP. Plasma fibrinogen: levels and correlates in young adults. The Coronary Artery Risk Development in Young Adult (CARDIA) study. *Am J Epidemiol* 1993;138:1023-36.

Ford ES, Giles WH, Mokdad AH and Myers CL. Distribution and correlates of c-reactive protein concentrations among adult US women. *Clin Chem* 2004; 50:574-81.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissue of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:847-50.

Frühbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ and Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E827-47.

Garaulet M, Perez-Llamas F, Perez-Ayala M, Martinez P, Sanchez de Medina F, Tebar FJ and Zamora S. Site-specific differences in the fatty acid composition of abdominal adipose tissue in an obese population from a Mediterranean area: relation with dietary fatty acids, plasma lipid profile, serum insulin, and central obesity. *Am J Clin Nutr* 2001;74:585-91.

Garfinkel L. Overweight and cancer. *Ann Intern Med* 1985;103:1034-6.

Gargari BP, Behzad MH, Ghassabpour S and Ayat A. Prevalence of overweight and obesity among high-school girls in Tabriz, Iran, in 2001. *Food Nutr Bull* 2004;25:288-91.

Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P and Dandonna P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 2004;110:1564-71.

Giovannucci E, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Physical activity, obesity, and risk of colorectal adenoma in women (United States). *Cancer Causes Control* 1996;7:253-63.

Grimble RF. Inflammatory status and insulin resistance. *Curr Opin Nutr Metab Care* 200 ;5:551-9.

Guha M, Bai W, Nadler JL, Natarajan R. Molecular mechanism of tumor necrosis factor  $\alpha$  gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 2000;275:17728-39.

Haffner SM, Miettinen H, Mykkanen L, Karhapaa P, Rainwater DL and Laakso M. Leptin concentrations and insulin sensitivity in normoglycemic men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;21:393-9.

Han SN, Leka LS, Lichtenstein AH, Ausman LM, Schaefer EJ and Meydani SN. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2002;43:445-52.

Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, Byrd-Holt DD. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. *Diabetes Care* 1998;21:518-24.

Hedley A, Ogden CL, Johnson CL, Carroll MD, Curtin LR, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. *JAMA* 2004;291:2847-50.

Hermann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Bara L, Parra HJ, Poirier O and Cambien F. Polymorphisms of the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene, coronary heart disease and obesity. *Eur J Clin Invest* 1998;28:59-66.

Hotamisligil GS, Shargill NS and Spiegelman BM. Adipose tissue of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995;95:2409-15.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavar A, Ellis R, White MF and Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity of TNF- $\alpha$  and obesity induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-70.

Hube F, Birgel M, Lee YM, Hauner H. Expression pattern of tumor necrosis factor receptors in subcutaneous and omental human adipose tissue: role of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*. 1999;29:672-8.

Hukshorn CJ, Lindeman JHN, Toet KH, Saris WHM, Eilers PHC, Westerterp-Plantenga MS and Kooistra T. Leptin and the proinflammatory state associated with human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1773-8.

Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K and Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptor. *Ann Rev Immunol* 1995;13:369-98.

Katzmarzyk PT. The Canadian obesity epidemic, 1985-1998. *CMAJ* 2002;166:1039-40.

Katzmarzyk PT, Ardern CI. Overweight and obesity mortality trends in Canada, 1985-2000. *Can J Public Health* 2004;95:16-20.

Kirwan JP, Krishnan RK, Weaver JA, Del Aguila LF, Evans WJ. Human aging is associated with altered TNF- $\alpha$  production during hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E1137-43.



Klein S, Fontana L, Young VL, Coggan AR, Kilo C, Patterson BW and Mohammed S. Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factor for coronary heart disease. *N Eng J Med* 2004;350:2549-57.

Kopp HP, Kopp CW, Festa A, Krzyzanowska K, Kriwanek S, Minar E, Roka R, Schernthaner G. Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1042-7.

Krobot K, Hense HW, Cremer P, Eberle E, Keil U. Determinants of plasma fibrinogen: a relation to body weight, waist-to-hip ratio, smoking, alcohol, age, and sex. Results from the second MONICA Augsburg survey 1989-1990. *Arterioscler Thromb* 1992;12:780-8.

Kroder G, Bossenmaier B, Kellerer M, Capp E, Stoyanov B, Muhlhofer A, Berti L, Horikoshi H, Ullrich A and Haring H. Tumor necrosis factor-alpha and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *J Clin Invest* 1996;97:1471-7.

Lambert M, Delvin EE, Paradis G, O'Loughlin J, Hanley JA and Levy E. C-reactive protein and features of the metabolic syndrome in a population-based sample of children and adolescents. *Clin Chem* 2004;50:1762-8.

Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, Maachi M, Capeau J and Caron M. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone *Biochem Biophys Res Com* 2003;311:372-9.

Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 1998;12:57-65.

Macdonald SM, Reeder BA, Chen Y, Despres JP. Obesity in Canada: a descriptive analysis. Canadian Health Health Surveys Research Group. CMAJ 1997;157(Suppl.1):S3-9.

Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Hankinson SE, Hennekens CH and Speizer FE. Body weight and mortality among women. N Engl J Med 1995;333:677-85.

Mantzoros CS, Moschos S, Avramopoulos I, Kaklamani V, Liolios A, Doulgerakis DE, Griveas I, Katsilambros N, Flier JS. Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor- $\alpha$  system in humans. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:3408-13.

Mao Y, Pan S, Wen SW and Johnson KC. Physical inactivity, energy intake, obesity and the risk of colorectal cancer in Canada. Int J Cancer 2003;105:831-7.

McCarty MF. Interleukine-6 as a central mediator of cardiovascular risk associated with chronic inflammation, smoking, diabetes, and visceral obesity: down-regulation with essential fatty acids, ethanol and pentoxifylline. Med Hypot 1999;52:465-77.

Melez KA, Harrison LC, Gilliam JN and Steinberg AD. Diabetes is associated with autoimmunity in the New Zealand obese (NZO) mouse. Diabetes 1980; 29: 835-40.

Mizia-Stec K, Zahorska-Markiewicz B, Mandecki T, Janowska J, Szulc A, Jastrzebska-Maj E and Gasior Z. Hyperlipidemias and serum cytokines in patients with coronary artery disease. Acta Cardiol 2003;58:9-15.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- $\alpha$ , in vivo. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:4196-200.

Moon YS, Kim DH and Song DK. Serum tumor necrosis factor- $\alpha$  levels and components of the metabolic syndrome in obese adolescents. *Metabolism* 2004;53:863-7.

Mooney RA, Senn J, Cameron S, Inamdar N, Boivin LM, Shang Y, and Furlanetto RW. Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J Biol Chem* 2001;276:25889-93.

Morin CL, Eckel RH, Marcel T, Pagliassotti MJ. High fat diets elevate adipose tissue-derived tumor necrosis factor- $\alpha$  activity. *Endocrinology* 1997;138:4665-71.

Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F. Glucose-dependant interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. *Diabetes* 1996;45:954-9.

Mustillo S, Worthman C, Erkanli A, Keeler G, Angold A and Costello EJ. Obesity and psychiatric disorder: Developmental trajectories. *Pediatrics* 2003;111:851-9.

Muurling M, Mensink RP, Pijl H, Romijn JA, Havekes LM and Voshol PJ. A fish oil diet does not reverse insulin resistance despite decreased adipose tissue TNF- $\alpha$  protein concentration in ApoE-3 Leiden mice. *J Nutr* 2003;133:3350-5.

Nahar IK, Shojania K, Marra CA, Alangir AH and Anis AH. Infliximab treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Ann Pharmacother*.2003;37:1256-65.

Njelekela M, Kuga S, Nara Y, Ntogwisangu J, Masesa Z, Mashalla Y, Ikeda K, Mtabaji, Yamori Y and Tsuda K. Prevalence of obesity and dyslipidemia in middle-aged men and women in Tanzania, Africa : relationship with resting energy expenditure and dietary factors. *J Nutr Sci Vitamol (Tokyo)* 2002;48:352-8.

Nicklas BJ, Ambrosius W, Messier SP, Miller GD, Phennix BWJH, Loeser RF, Palla S, Bleecker E and Pahor M. Diet-induced weight loss, exercise, and chronic inflammation in older, obese adults : a randomized controlled clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2004;79:544-51.

Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, Moser AH, Staprans I, Grunfels C, Feinglod KR. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology* 1995;136:2143-9.

Nunez-Rivas HP, Monge-Rojas R, Leon H and Rosello M. Prevalence of overweight and obesity among Costa Rican Elementary School Children. *Rev Panam Salud Publica* 2003;13:24-32.

Organisation mondiale de la santé. World health statistics annual 1995. Geneva, World Health Organization, 1996.

O'Shea M, Bassaganya-Riera J and Mohede ICM. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *Am J Clin Nutr* 2004;79(suppl):1199S-206S.

Pasquet P, Temgoua LS, Melaman-Sego F, Froment A and Rokong-Adie H. Prevalence of overweight and obesity for urban adults in Cameroon. *Ann Hum Biol* 2003;30:551-62.

Patsch JR. Postprandial lipaemia. In: Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism. Vol.1, No.3, 1987. pp.551-80.

Pradhan AD, Cook NR, Buring JE, Marison JE, Ridker PM. C-reactive protein is independently associated with fasting insulin in nondiabetic women. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2003;23:650-5.

Purasiri P, Murray A, Richardson S, Heys SD, Horrobin D, Eremin O. Modulation of cytokine production in vivo by dietary essential fatty acids in patients with colorectal cancer. *Clin Sci (Lond)* 1994;87:711-7.

Rami B, Schober E, Kirchengast S, Waldhor T and Sefranek R. Prevalence of overweight and obesity in male adolescents in Austria between 1985 and 2000. A population based study. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2004;17:67-72.

Reaven GM. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-607.

Rieusset J, Bouzakri K, Chevillotte E, Ricard N, Jacquet D, Bastard JP, Laville M and Vidal H. Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2004;53:2232-41.

Rimm EB, Stampfer MJ, Giovannucci E, Ascherio A, Spiegelman D, Colditz GA, Willett WC. Body size and fat distribution as predictors of coronary heart disease among middle-aged and older US men. *Am J Epidemiol* 1995;141:1117-27.

Rosenson RS, Tangney CC, Levine DM, Parker TS and Gordon BR. Elevated soluble tumor necrosis factor receptor levels in non-obese adults with the atherogenic dyslipoproteinemia. *Atherosclerosis* 2004;177:77-81.

Ruan H and Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2003;14:447-55.

Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S and White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 2002;277:42394-8.

Schmidt MI, Watson RL, Duncan BB, Metcalf P, Brancati FL, Sharrett AR, Davis CE, Heiss G. Clustering of dyslipidemia, diabetes, and hypertension and its association with fasting insulin and central and overall obesity in a general population. Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators. *Metabolism* 1996;45:699-706.

Seufert J. Leptin effects on pancreatic  $\beta$ -cell gene expression and function. *Diabetes* 2004;53(Suppl.1):S152-8.

Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, Natarajan R. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes* 2003;52:1256-64.

Shea S, Aymon E, Zybert P, Shamoon H, Tracy RP, Deckelbaum RJ, Bash CE. Obesity, fasting plasma insulin, and c-reactive protein levels in healthy children. *Obes Res* 2003;11:95-103.

Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 126:137-45.

Shields M. Obésité mesurée. L'embonpoint chez les enfants et les adolescents au Canada. *Nutrition : Résultats de l'enquête sur la santé dans les collectivités canadiennes Numéro 1*. Statistique Canada Cat no. 82-620-MWF2005001.

Skolnik EY and Marcusohn J. Inhibition of insulin receptor signaling by TNF : potential role in obesity and non-insulin-dependant diabetes mellitus. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 1996;7:161-73.

Solberg HE. Establishment and use of reference values. In: CA Burtis and ER Ashwood, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Third edition. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1999. pp.336-56.

Sonnenberg GE, Krakower GR, Kissebah AH. A novel pathway to the manifestation of metabolic syndrome. *Obes Res* 2004;12:180-6.

Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffman K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer A FH. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes. Results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study. *Diabetes* 2003;52:812-7.

Stephens J, Pekala PH. Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* 1991;266:21839-45.

Straczkowski M, Dzienis-Straczkowska S, Stepień A, Kowalska I, Szelachowska M, Kinalska I. Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor- $\alpha$  system. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4602-6.

Svenungsson E, Gunnarsson I, Fei GZ, Lundberg IE, Klareskog LL and Frostegard J. Elevated triglycerides and low levels of high-density lipoprotein as markers of disease activity in association with up-regulation of the tumor necrosis factor alpha/tumor necrosis factor receptor system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003;48:2533-40.

Tappia PS, Man WJ and Grimble RF. Influence of unsaturated fatty acids on the production of tumor necrosis factor and interleukin-6 by rat peritoneal macrophages. *Mol Cell Biochem* 1995;143:89-98.

Tee ES. Obesity in Asia: prevalence and issues in assessment methodologies. *Asia Pac J Clin Nutr* 2002; 11(Suppl8):S694-701.

AW Thomson and MT Lotze, editors. *The cytokine Handbook*. 4<sup>th</sup> ed. Orlando : Academic Press, 2003.

Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A and Dandonna P. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 2003;52:2882-7.

Troiano RP, Frongillo EA Jr, Sobal J, Levitsky DA. The relationship between body weight and mortality : a quantitative analysis of combined information from existing studies. *Int J Obes Relat Metab* 1996;20:63-75.

Twickler TB, Dallinga-Thie GM, Visseren FLJ, De Vries WR, Erkelens DW and Koppeschaar HPF. Induction of postprandial inflammatory response in adult onset growth hormone deficiency is related to plasma remnant-like particle-cholesterol concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1228-33.



Van Dielen FMH, Veer CV, Schols AM, Soeters PB, Buurman WA and Greve JWM. Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. *Int J Obes* 2001;25:1759-66.

Varo JJ, Martinez-Gonzalez MA and Martinez JA. Obesity prevalence in Europe. *An Sist Sanit Navar* 2002;25(Suppl.1):103-8.

Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, Molina A, Gomez JM, Gutierrez C, Simon I, Soler J, Richart C. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res* 2004;12:962-71.

Venegas HL, Perez CM, Suarez EL and Guzman M. Prevalence of obesity and its association with blood pressure, serum lipids and selected lifestyles in a Puerto Rican population of adolescents 12-16 years of age. *P R Health Sci J*. 2003;22:137-43.

Vessby B, Gustafsson IB, Tengblad S, Boberg M and Anderson A. Desaturation and elongation of fatty acids and insulin action. *Ann NY Acad Sci* 2002;967:183-95.

Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1313-6.

Vidal H, Auboeuf D, De Vos P, Staels B, Riou JP, Auwerx J and Laville M. The expression of *ob* gene is not acutely regulated by insulin and fasting in human abdominal subcutaneous adipose tissue *J Clin Invest* 1996;98:251-5.

Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Low-grade systemic inflammation in overweight children. *Pediatrics* 2001;107:E13.

Vojarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni A, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 2001;9:414-7.

Wasmuth HE, Kunz D, Graf J, Stanzel S, Purucker EA, Koch A, Gartung C, Heintz B, Gressner AM, Matern S, Lammert F. Hyperglycemia at admission to the intensive care unit is associated with elevated serum concentrations of interleukin-6 and reduced ex vivo secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Crit Care Med* 2004;32:1109-14.

Webber J. Energy balance in obesity. *Proc Nutr Soc* 2003;62:539-43.

Weyer C, Tataranni RA, Pratley RE. Insulin action and insulinemia are closely related to the fasting complement C3, but not acylation stimulating protein concentration. *Diabetes Care* 2000;23:779-85.

Weyer C, Udkin JS, Stehouwer CD, Schalkwijk CG, Pratley RE, Tataranni PA. Humoral markers of inflammation and endothelial dysfunction in relation to adiposity and in vivo insulin action in Pima Indians. *Atherosclerosis* 2002;161:233-42.

WHO : Obesity : preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva, 3-5 june (WHO/NUT/NCD/98.1) 1998.

Whicher JT, Evans SW. Cytokines in disease. *Clin Chem* 1990;37:1269-81.

Williams JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 1989;7:762-9.

Williamson DF, Pamuk E, Thun M, Flanders D, Byers T and Heath C. Prospective study of intentional weight loss and mortality in never-smoking overweight US white women aged 40-64 years. *Am J Epidemiol* 1995;141:1128-41.

Xing H, Northrop JP, Grove R, Kilpatrick KE, Su JL and Ringold G. TNF- $\alpha$ -mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPAR $\gamma$  without effects on Pref-1 expression. *Endocrinology* 1997;138:2776-83.

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols, Ross JS, Tartaglia LA and Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821-30.

Yudkin JS, Stehouwer CDA, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction. A potential role for cytokines originating from adipose tissue ? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:972-8.

Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease : is interleukin-6 the link ? *Atherosclerosis* 2000;148:209-14.

Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Adrea F, Molinari AM, Giugliano D. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* 2002;105:804-9.

## LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Pays ou régions où la prévalence de l'obésité est à la hausse.

ANNEXE 2 : Lettre d'approbation finale du projet *Effets d'anomalies biochimiques de l'obésité sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires* par les comités scientifique et d'éthique du CHUM

ANNEXE 3 : Lettre d'approbation du renouvellement du projet *Effets d'anomalies biochimiques de l'obésité sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires* pour une durée de un an par les comité scientifique et d'éthique du CHUM

ANNEXE 4 : Questionnaire d'évaluation de l'état de santé des individus recrutés.

ANNEXE 5 : Formulaire de consentement pour la participation au projet.

## ANNEXE 1

---

### Pays ou régions où la prévalence de l'obésité est à la hausse.

---

Région/Pays	Référence
Canada	Macdonald et al., 1997
Etats-Unis	Flegal et al., 1998
Mexique	Del Rio-Navarro et al., 2004
Venezuela	Campos et al., 2003
Costa Rica	Nunez-Rivas et al., 2003
Puerto Rico	Venegas et al., 2003
Argentine	De Sereday et al., 2004
Europe	Varo et al., 2002
Maroc	Belahsen et al., 2004
Tanzanie	Njelekela et al., 2002
Cameroun	Pasquet et al., 2003
Turquie	Erem et al., 2004
Iran	Gargari et al., 2004
Thaïlande	Aekplakorn et al., 2004
Asie	Tee et al., 2002
Australie	Rami et al., 2004

---

**CENTRE DE RECHERCHE**  
Comité d'éthique de la recherche  
Équipe Hôtel-Dieu du CHUM  
Édifice Cooper  
3981 St-Laurent, Mezzanine 2, Bureau M-205  
Montréal (Québec) H2W 1Y5  
Téléphone : (514) 890-8000 poste 14030 Télécopieur : (514) 412-7394

Le 25 avril 2005

Dr Julie Amyot  
Département de biochimie  
Local 3262  
Hôpital Saint-Luc du CHUM

**OBJET : HD 05.015 - Approbation initiale CÉR**

**Effets d'anomalies biochimiques de l'obésité sur l'expression des cytokines pro inflammatoires**

Docteur,

J'ai le plaisir de vous aviser que le Comité d'éthique de la recherche, à sa réunion plénière du 25 avril 2005, a évalué le projet mentionné ci-dessus.

À cette fin, ont notamment été examinés les documents suivants :

- Formulaire de présentation – Formulaire A
- Formulaire de renseignements supplémentaires – Annexe 2.2
- Résumé du protocole
- Protocole de recherche
- Formulaire de consentement, version française

Votre projet a été approuvé conditionnellement à ce que les précisions et modifications suivantes soient apportées.

**Précisions demandées par le comité :**

Le comité vous demande de décrire en détails le mode de recrutement, particulièrement pour les sujets avec surcharge pondérale et les sujets obèses. Considérant les nombreux critères d'inclusion et d'exclusion, le comité vous suggère de demander la collaboration des médecins s'occupant de la clinique d'obésité.



### Modifications au formulaire de consentement :

1. Dans la rubrique «Nature de votre participation», indiquer que vous allez devoir consulter le dossier médical.
2. Dans la rubrique «Confidentialité», préciser ce qui adviendra des échantillons sanguins : seront-ils conservés ? Le cas échéant, vous devez indiquer le lieu et la durée de conservation, l'usage qui en sera fait et les mesures prises pour assurer la confidentialité. Sinon, préciser qu'ils seront détruits, une fois les analyses terminées.
3. Faire toute autre correction indiquée sur le formulaire de consentement

Vous voudrez bien nous retourner un original et une copie – première page sur papier entête CHUM – du formulaire de consentement modifié, dont la copie indiquera en surligné au crayon jaune les modifications demandées. L'original vous sera retournée avec l'estampille d'approbation.

Il est entendu que vous ne pouvez commencer le recrutement de sujets avant d'avoir reçu L'APPROBATION FINALE du comité et que le formulaire de consentement modifié n'ait été APPROUVÉ ET ESTAMPILLÉ.

Vous souhaitant la meilleure des chances dans la poursuite de vos travaux, je vous prie d'accepter, Docteur, mes salutations les meilleures.

  
Marie-Claire Michoud, Ph.D.

Vice-présidente  
Comité d'éthique de la recherche  
Équipe Hôtel-Dieu du CHUM

MCM/kb

P. j. : Formulaire de consentement annoté

**CENTRE DE RECHERCHE**  
Comité d'éthique de la recherche  
Équipe Hôtel-Dieu du CHUM  
Édifice Cooper  
3981 St-Laurent, Mezzanine 2, Bureau M-205  
Montréal (Québec) H2W 1Y5  
Téléphone : (514) 890-8000 poste 14030 Télécopieur : (514) 412-7394

Le 27 avril 2006

Mme Julie Amyot  
Département de biochimie  
Local 3262  
Hôpital Saint-Luc du CHUM

**Objet : HD 05.015 - Renouvellement annuel 2006 - 2007**

**Effets d'anomalies biochimiques de l'obésité sur l'expression des cytokines pro inflammatoires.**

---

Madame,

J'accuse réception de votre lettre datée du 25 avril 2006 nous demandant d'approuver la poursuite du projet cité en rubrique pour une autre année. Votre projet a été approuvé initialement le 25 avril 2005.

Étant donné que l'approbation annuelle du projet se fait à la date anniversaire de l'approbation initiale, votre projet est **approuvé jusqu'au 25 avril 2007**. Votre rapport annuel est déposé au dossier.

Je vous prie d'accepter, Madame, mes salutations distinguées.



Marie-Claire Michoud, Ph.D.

Vice-présidente  
Comité d'éthique de la recherche  
Équipe Hôtel-Dieu du CHUM

MCM/If



## Détermination des valeurs de référence pour le TNF- $\alpha$ et l'IL-6

Responsables : Dr M'Bark Sadouk et Julie Amyot, étudiante à la maîtrise  
Téléphone : 34681 ou 36208

Lieu du prélèvement : Hôpital Saint-Luc du CHUM  
Laboratoire de biochimie et Centre des prélèvements

Nom :	_____	Prénom :	_____
Sexe :	Homme <input type="checkbox"/>	Femme <input type="checkbox"/>	
		Grossesse ?	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
		Hormonothérapie post-ménopause ?	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Date de naissance :	_____	Taille :	_____
Code du projet :	HD 05.015	Poids :	_____
Code de l'échantillon :	_____		

### Questionnaire

1. Fumeur(euse)?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
2. Avez-vous subi un changement de poids considérable au cours des trois derniers mois ? ( > 5 lbs)	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
3. Consommez-vous de l'alcool ?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Si oui, à quelle fréquence ? .....		
4. Avez-vous pris des médicaments au cours du dernier mois ? (Incluant les médicaments sans prescription tel que tyléno, aspirine, produits naturels...)		
Si oui, lesquels? .....	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
5. Dans les quatre dernières semaines, avez-vous eu de la fièvre (>37,5 °C) ou tout autre symptôme suggestif d'infection (toux, mal de gorge, nez qui coule...) ?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
6. Souffrez-vous de maladie rénale ou hépatique?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
7. Souffrez-vous d'une maladie auto-immune ou d'une maladie inflammatoire chronique ? (Arthrite, maladie de Crohn, lupus, thyroïdite, eczéma, psoriasis, asthme, allergies...)	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>

8. Souffrez-vous d'apnée du sommeil ?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
9. Êtes-vous suivi pour une maladie autre ?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Si oui, laquelle ? _____		
Nom du médecin : _____		
10. Au cours des deux derniers mois, avez-vous subi une chirurgie ?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
11. Au cours des deux derniers mois, avez-vous subi un traumatisme physique (blessure, ecchymose, brûlure...) ?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
12. Avez-vous déjà eu une transplantation d'organe ?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
13. Dans le passé, avez-vous eu une hystérectomie (ablation de l'utérus) et/ou une ovariectomie (ablation des ovaires) ?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
14. Bilans biochimique et hématologique de base normaux ?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>



Comité d'éthique de la recherche CHUM  
APPROUVÉ le 26/5/05  
par [REDACTED]

# Formulaire d'information et de consentement

## Titre du projet

Effets d'anomalies biochimiques de l'obésité sur l'expression des cytokines proinflammatoires.

## Investigatrice principale

Julie Amyot, Technologiste médicale, B.Sc., Étudiante à la maîtrise en biochimie, Hôpital Saint-Luc du CHUM, Département de biochimie, 1058 rue Saint-Denis, local 3262, Montréal (Québec), H2X 3J4.

Téléphone : (514) 890-8000 poste 34681 – Télécopieur : (514) 412-7361.

Courriel : [REDACTED]

Veuillez s'il vous plaît prendre le temps de lire soigneusement ce document et de bien comprendre tous les éléments. Posez des questions sur les informations qui ne vous semblent pas très claires.

## 1. Liberté de participation

Le Département de biochimie souhaite votre collaboration dans cette étude et vous invite à y participer. Votre participation est **volontaire** et vous êtes **totalemt libre** de participer ou non à cette étude. Vous pourrez vous retirer de l'étude **à tout moment** sans fournir de justification et sans subir quelque conséquence que ce soit.

## 2. But de l'étude

L'obésité est une condition de plus en plus rencontrée dans la population. Plusieurs maladies en découlent: diabète type 2, maladies cardiovasculaires, cancers, haute pression, hausse du cholestérol et des triglycérides sanguins, problèmes de foie. Au cours des dernières années, on a aussi remarqué qu'il existe une légère inflammation dans l'obésité. Nous pensons que cette inflammation pourrait être une des causes du développement de ces maladies.

Le département de biochimie a mis au point deux tests sanguins (ARNm TNF- $\alpha$  et ARNm IL-6) visant à détecter la présence d'inflammation dans le sang. Nous voulons comparer dans cette étude la différence entre les individus minces et les individus obèses. Ceci nous permettra également de voir la réaction des cellules sanguines face à des substances en excès dans l'obésité comme le cholestérol ou le glucose.

### 3. Nature et durée de votre participation

Un prélèvement de 25 ml de sang (c'est-à-dire 6 tubes ou 2 cuillerées à table) vous sera effectué à jeûn. Vous accepterez également de répondre à un bref questionnaire concernant votre histoire médicale. La durée de votre participation ne dépassera pas 15 minutes au total.

### 4. Financement du projet

Le projet n'est financé par aucun organisme public ni compagnie privée. Les coûts sont assumés par le département de biochimie dans le cadre de ses projets de développement. Il n'y a aucun intérêt commercial visé par l'étude.

### 5. Risques attribués à votre participation

Il n'y a pas de risque autre que celui d'une prise de sang normale, c'est à dire :

- 1- Un léger pincement au moment de l'introduction de l'aiguille dans la veine;
- 2- Parfois un sentiment d'inconfort ou d'étourdissement qui est passager;
- 3- Parfois l'apparition d'un bleu à l'endroit de la ponction et qui se résorbera quelques jours plus tard.

### 6. Bénéfices relatifs à votre participation

Vous ne retirerez aucun bénéfice financier ou autre de votre participation à cette étude. Si les résultats sont concluants, leur publication contribuera à

améliorer les connaissances sur l'obésité et les différentes maladies qui y sont associées.

## 7. Garantie de confidentialité

Les données de cette étude seront traitées en toute confidentialité. Votre **nom sera remplacé par un code numérique** auquel seul les investigateurs auront accès. Seuls votre âge, sexe et indice de masse corporelle apparaîtront sur un fichier dans lequel seront compilés les résultats de l'étude. Des représentants du comité d'éthique pourront vérifier à n'importe quel moment la conformité à toutes ces mesures. Les résultats de cette étude seront publiés mais votre identité ne sera pas révélée. Votre échantillon sanguin sera utilisé dans le cadre de cette étude uniquement et sera conservé dans un congélateur au laboratoire de biochimie à l'Hôpital Saint-Luc, local 3296, pendant deux ans. Les spécimens sont conservés pour répéter certaines analyses. Votre échantillon sera conservé de façon anonyme (votre nom n'apparaîtra jamais sur les tubes et sera remplacé par un code numérique). Une fois l'étude terminée, les échantillons seront détruits.

## 8. Consentement du participant

Par ma signature, j'atteste avoir lu les renseignements concernant ma participation à cette étude. Je reconnais qu'on a répondu à toutes mes questions et qu'on m'a laissé le temps voulu pour prendre ma décision librement.

J'accepte volontairement de participer à ce projet.

En signant, je ne renonce à aucun de mes droits légaux et je ne libère ni le chercheur, ni l'hôpital de leurs responsabilités civile et professionnelle. On m'a remis une copie signée de ce formulaire.

---

Nom du participant (*lettres moulées*)

Signature \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

---

Nom du témoin (*lettres moulées*)

Signature \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

Je certifie avoir expliqué au sujet la nature de l'étude ainsi que le contenu du présent formulaire, avoir répondu à toutes les questions et avoir indiqué qu'il reste à tout moment libre de mettre un terme à sa participation. Je lui remettrai une copie signée du présent formulaire de consentement.

---

Nom du chercheur (*lettres moulées*)

Signature \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

## 9. Personnes ressource

### **Investigatrice principale du projet :**

Julie Amyot, Technologiste médicale, B.Sc., Étudiante à la maîtrise en biochimie, Hôpital Saint-Luc du CHUM, Département de biochimie, 1058 rue Saint-Denis, local 3262, Montréal (Québec) H2X 3J4.

Téléphone : (514) 890-8000 poste 34681 – Télécopieur : (514) 412-7361.

Courriel : [REDACTED]

### **Les autres investigateurs :**

François Lessard, MD, Chef du département de biochimie du CHUM

Raymond Lepage, Biochimiste clinique

M'Bark Sadouk, Biochimiste clinique

Claudette de Montigny, Coordonnatrice technique

### **Responsables au traitement des plaintes au CHUM :**

Pour tous problèmes concernant les conditions de votre participation, vous pouvez contacter les responsables au traitement des plaintes au CHUM :

Hôpital Hôtel-Dieu : Michelle Morin Tél. (514) 890-8000 poste 12761

Hôpital Notre-Dame : Louise Brunelle Tél. (514) 890-8000 poste 26047

Hôpital Saint-Luc : Christine Siclait Tél. (514) 890-8000 poste 36366