

Université de Montréal

Effets de l'hyperglycémie avec ou sans hyperinsulinémie sur l'expression génique et
les taux plasmatiques d'hormones adipocytaires
(leptine, adiponectine et protéine de stimulation de l'acylation) chez le sujet sain

par

Geneviève Beauregard

Département de nutrition

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade M. Sc.
en nutrition

Août 2005

© Geneviève Beauregard, 2005



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 des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effets de l'hyperglycémie avec ou sans hyperinsulinémie sur l'expression génique et
les taux plasmatiques d'hormones adipocytaires
(leptine, adiponectine et protéine de stimulation de l'acylation) chez le sujet sain

Présenté par :
Geneviève Beauregard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

D^r Marc Prentki

Président-rapporteur

D^r Rémi Rabasa-Llhoret

Directeur de recherche

D^r Jean-Louis Chiasson

Codirecteur

D^r Eugenio Rasio

Membre du jury

**EFFETS DE L'HYPERGLYCÉMIE AVEC OU SANS HYPERINSULINÉMIE
SUR L'EXPRESSION GÉNIQUE ET LES TAUX PLASMATIQUES
D'HORMONES ADIPOCYTAIRES (LEPTINE, ADIPONECTINE ET
PROTÉINE DE STIMULATION DE L'ACYLATION)
CHEZ LE SUJET SAIN**

RÉSUMÉ

Objectif : Déterminer, chez des hommes sains, l'effet d'une hyperglycémie isolée et de la combinaison d'une hyperglycémie et d'une hyperinsulinémie sur la concentration plasmatique et l'expression génique, dans le tissu adipeux, de la leptine de l'adiponectine et de l'ASP.

Méthodologie : Des clamps normoinsulinémiques hyperglycémiques et hyperinsulinémiques hyperglycémiques de trois heures ont été réalisés chez huit hommes caucasiens en santé. Des biopsies de tissu adipeux ont été pratiquées avant et après chaque clamp.

Résultats : L'hyperglycémie isolée n'a pas modifié l'expression des ARNm de la leptine, de l'adiponectine, ni de la protéine C3 (précurseur de l'ASP). Les concentrations plasmatiques d'adiponectine et d'ASP n'ont pas non plus changé au cours de la stimulation. Par contre, la concentration de leptine a diminué significativement (20 %). La combinaison de l'hyperinsulinémie et de l'hyperglycémie a stimulé l'expression des ARNm de la leptine et de la protéine C3, mais n'a pas stimulé celle de l'adiponectine. Les concentrations plasmatiques de leptine et d'adiponectine n'ont pas changé, celle de l'ASP a augmenté (21 %).

Conclusion : Chez des hommes sains, l'hyperinsulinémie, en association avec l'hyperglycémie, a stimulé l'expression génique de la protéine C3 et de la leptine et augmenté la concentration plasmatique d'ASP. L'hyperglycémie seule a engendré une diminution de la concentration plasmatique de leptine.

Mots clés : leptine, adiponectine, ASP, hyperinsulinémie, hyperglycémie, gène, concentration plasmatique, régulation, clamp.

**EFFECTS OF HYPERGLYCEMIA WITH OR WITHOUT
HYPERINSULINEMIA ON THE GENE EXPRESSION AND THE
PLASMATIC LEVELS OF ADIPOSE TISSUE HORMONES (LEPTINE,
ADIPONECTINE AND ACYLATION STIMULATING PROTEIN) IN
HEALTHY SUBJECT**

ABSTRACT

Objective: To determine the effects, on healthy men, of an isolated hyperglycemia and the combination of hyperglycemia and hyperinsulinemia on the plasma level and gene expression in the adipose tissue of leptin, adiponectin and acylation stimulating protein (ASP).

Methods: Three hour normoinsulinemic hyperglycemic and hyperinsulinemic hyperglycemic clamps have been done on eight healthy Caucasian men. Biopsies of adipose tissue were performed before and after the clamp. The gene expression quantification was evaluated by RT-PCR.

Results: Isolated hyperglycemia did not modify the mRNA expression of leptine, adiponectin and C3 protein (ASP precursor) nor the plasma levels of adiponectin and ASP. However, the plasma levels of leptin decreased significantly (20%). The combination of hyperinsulinemia and hyperglycemia stimulated the mRNA expression of leptin and protein C3, but did not affect that of adiponectin. The increased mRNA expression of leptin was not associated with any change in plasma concentration. The plasma level of ASP increased (21%), but that of adiponectin did not change.

Conclusion: On healthy men, hyperinsulinemia, with hyperglycemia, increased the gene expression of C3 protein and leptin and increased the plasma level of ASP. Isolated hyperglycemia reduced the plasma level of leptin.

Keywords: leptin, adiponectin, ASP, hyperinsulinemia, hyperglycemia, gene, plasma level, regulation, clamp.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES	viii
REMERCIEMENTS	ix
INTRODUCTION ET THÉMATIQUE DU PROJET.....	1
CHAPITRE 1 LE TISSU ADIPEUX : UNE GLANDE ENDOCRINE	3
1.1 Leptine.....	3
1.2 Adiponectine	7
1.3 Protéine de stimulation de l'acylation	9
CHAPITRE 2 INSULINORÉSISTANCE	12
2.1 Implication de la leptine dans l'obésité, l'insulinorésistance et le diabète de type 2	13
2.2 Implication de l'adiponectine dans l'obésité, l'insulinorésistance et le diabète de type 2	15
2.3 Implication de l'ASP dans l'obésité, l'insulinorésistance et le diabète de type 2	19
CHAPITRE 3 RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES PAR LE GLUCOSE ET L'INSULINE	21
3.1 Régulation de l'expression génique et de la concentration plasmatique de la leptine par l'insuline et/ou le glucose.....	23

3.2	Régulation de l'expression génique et de la concentration plasmatique de l'adiponectine par l'insuline et/ou le glucose.....	30
3.3	Régulation de l'expression génique et de la concentration plasmatique de l'ASP par l'insuline et/ou le glucose.....	33
CHAPITRE 4 OBJECTIF DE L'ÉTUDE		36
CHAPITRE 5 HYPOTHÈSES.....		37
CHAPITRE 6 MÉTHODOLOGIE		38
6.1	Sujets	38
6.2	Procédures expérimentales	39
6.3	Analyses de laboratoire	42
6.4	Analyse statistique.....	45
CHAPITRE 7 RÉSULTATS.....		46
7.1	Réalisation des expérimentations	46
7.2	Expression génique et concentration plasmatique.....	48
7.2.1	Leptine.....	48
7.2.2	Adiponectine	50
7.2.3	ASP.....	50
7.2.4	Sommaire.....	53
CHAPITRE 8 DISCUSSION		55
8.1	Forces de l'étude	55
8.2	Limites de l'étude.....	56
8.3	Analyse des résultats	58
8.3.1	Leptine.....	58
8.3.2	Adiponectine	59
8.3.3	ASP.....	61
CONCLUSION		65
BIBLIOGRAPHIE		67

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1	Anastomose vasculaire entre des souris homozygotes ob/ob ou db/db et des souris sauvages4
Figure 2	Mécanismes physiologiques de la leptine en ce qui a trait à la satiété6
Figure 3	Étapes principales de la production d'ASP à partir des 3 précurseurs : C3 ; le facteur B et l'adipsine..... 10
Figure 4	Les effets de l'ASP sur l'augmentation de la synthèse de triglycérides11
Figure 5	Corrélation entre le pourcentage de gras corporel et la concentration plasmatique de leptine..... 13
Figure 6	Relation entre la perte de poids et la concentration sérique de la leptine et de l'expression du gène ob..... 15
Figure 7	Corrélation négative entre le pourcentage de gras corporel et la concentration plasmatique d'adiponectine 16
Figure 8	Corrélation entre la réduction de l'IMC et la concentration plasmatique de l'adiponectine 17
Figure 9	Concentration plasmatique d'adiponectine chez les normotolérants au glucose, les intolérants au glucose et les diabétiques 17
Figure 10	Corrélation négative entre l'insulinémie à jeun et la concentration plasmatique d'adiponectine 18
Figure 11	Corrélation entre l'ARNm de C3 dans le tissu adipeux sous-cutané et l'IMC chez des hommes non diabétiques..... 19
Figure 12	Effet dose-dépendant de l'insuline sur la production d'ASP par des adipocytes humains différenciés34
Figure 13	Déroulement de l'expérimentation42
Figure 14	Glycémie et insulinémie obtenues au cours du clamp normoinsulinémique hyperglycémique47
Figure 15	Glycémie et insulinémie obtenues au cours du clamp hyperinsulinémique hyperglycémique.....48
Figure 16	Concentration plasmatique de la leptine avant et après le clamp normoinsulinémique hyperglycémique49
Figure 17	Expression relative du gène de la leptine par rapport au gène de référence (HPRT) avant et après le clamp hyperinsulinémique hyperglycémique.....50

Figure 18	Expression relative du gène de la protéine C3 par rapport au gène de référence (HPRT) avant et après le clamp hyperinsulinémique hyperglycémique.....	51
Figure 19	Concentration plasmatique de l'ASP avant et après le clamp hyperinsulinémique hyperglycémique.....	52

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I	État des connaissances sur la régulation de l'expression génique et de la concentration plasmatique de la leptine, de l'adiponectine et de l'ASP35
Tableau II	Caractéristiques des sujets39
Tableau III	Amorces utilisées pour la quantification de l'expression génétique.....44
Tableau IV	Sommaire de la régulation de l'expression génique et de la concentration plasmatique de la leptine, de l'adiponectine et de l'ASP en situation de normoinsulinémie-hyperglycémie et d'hyperinsulinémie-hyperglycémie53
Tableau V	Comparaison des résultats obtenus avec les données de la littérature quant à l'expression génique et à la concentration plasmatique de la leptine62
Tableau VI	Comparaison des résultats obtenus avec les données de la littérature quant à l'expression génique et à la concentration plasmatique de l'adiponectine63
Tableau VII	Comparaison des résultats obtenus avec les données de la littérature quant à l'expression génique et à la concentration plasmatique de l'ASP64

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

- A1c : hémoglobine glyquée
- ADNc : ADN complémentaire
- AGRP : *agouti-related peptide*
- AMPK : *5'-AMP-activated protein kinase*
- ARNm : acide ribonucléique messenger
- ASP : *acylation stimulating protein*
- α -MSH : *α -melanocyte-stimulating hormone*
- CART : *cocaine et amphetamine-regulated transcript*
- CRH : *corticotropin-releasing hormone*
- ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*
- Glut-4 : *glucose transporter 4*
- HDL : *high density lipoprotein* (lipoprotéine de haute densité)
- HSL : lipase hormono-sensible
- HPRT : hypoxanthine phosphoribosyltransférase
- IMC : indice de masse corporelle (kg/m^2)
- IRS-1 : *insulin receptor substrate 1*
- MC4R : récepteur à la mélanocortine de type 4
- MSH : *melanocyte-stimulating hormone*
- ND : non disponible
- NPY : neuropeptide Y
- obR : récepteur de la leptine
- POMC : proopiomélanocortine

REMERCIEMENTS

Je tiens, d'abord et avant tout, à vous remercier chaleureusement, D^r Rémi Rabasa-Lhoret, pour votre appui, vos conseils et la confiance que vous m'avez accordée tout au long de mes études de maîtrise. Je vous remercie également pour les expériences enrichissantes que vous m'avez permis de vivre : les congrès, le cours spécialisé sur le diabète et, surtout, le séjour dans le laboratoire du D^r Hubert Vidal en France, qui fut particulièrement profitable. Votre rigueur scientifique tout comme votre bonne humeur contagieuse font de vous une personne très agréable avec qui travailler et discuter. Faire mes études de maîtrise avec vous fut un grand plaisir!

Je tiens également à remercier le D^r Jean-Louis Chiasson pour ses judicieux conseils ainsi que ses encouragements. Merci aussi à May Faraj qui m'a offert si généreusement son aide, ses conseils et ses encouragements lors de la rédaction de mon mémoire et à Myriam Costa, pour son soutien. Je désire également exprimer mes remerciements au D^r Hubert Vidal et à son équipe pour m'avoir si bien accueillie lors de mon séjour dans leur laboratoire.

Merci à ceux qui m'ont offert leur support financier : le D^r Jean-Louis Chiasson, le D^r Rémi Rabasa-Lhoret, le département de nutrition de l'université de Montréal, la Faculté de médecine de l'université de Montréal, la RBC Banque Royale et le comité d'organisation du programme des stagiaires de l'université de Montréal (COPSE).

Merci aussi à tous ceux qui m'ont accordé leur appui au cours de mes études : mes parents, Claude Beaugard et Francine Paradis, ma sœur, Raphaëlle Beaugard ainsi que mes grandes amies, Kim Robitaille, Amélie Racine et Janique Vachon.

Finalement, un merci tout spécial Philippe Thériault pour son appui quotidien, son aide, sa patience et son amour.

INTRODUCTION ET THÉMATIQUE DU PROJET

Le tissu adipeux, traditionnellement considéré comme un simple organe de stockage énergétique, est maintenant vu comme un véritable organe de régulation. En effet, par les nombreuses substances qu'il sécrète, le tissu adipeux régule le métabolisme énergétique et lipidique. Parmi ces substances, on retrouve trois adipokines : la leptine, l'adiponectine et la protéine de stimulation de l'acylation (ASP). La leptine reflète les réserves adipeuses et permet la régulation de l'apport alimentaire, de l'utilisation des substrats et de la dépense énergétique (1-3). L'adiponectine, pour sa part, favorise le catabolisme des lipides, un meilleur contrôle glycémique et pourrait jouer un rôle protecteur dans le développement des maladies cardiovasculaires (4-8). Finalement, l'ASP favorise le stockage des triglycérides en augmentant leur synthèse et la réestérification des acides gras ainsi qu'en diminuant la lipolyse (9-13). Elle pourrait également augmenter la première phase de sécrétion de l'insuline (14).

Chez l'humain, comme chez l'animal (9;10;15-22), la régulation de ces trois adipokines est altérée dans l'obésité, l'insulinorésistance et le diabète de type 2. L'obésité, androïde surtout, est un facteur de risque dans le développement de l'insulinorésistance, qui elle-même est un facteur de risque majeur de développement du diabète de type 2. La concentration plasmatique de leptine est augmentée en présence d'obésité, celle de l'adiponectine est réduite en présence d'obésité, d'insulinorésistance et de diabète de type 2, alors que l'ASP est augmentée en présence d'obésité et de diabète de type 2 (3;9;23-40).

La régulation du métabolisme de ces trois adipokines est non seulement perturbée en présence d'obésité, d'insulinorésistance et de diabète de type 2, mais plusieurs études suggèrent également qu'elle serait modulée par l'insuline et le glucose (25;27;40-54). L'hyperglycémie et/ou l'hyperinsulinémie, fréquemment associées à ces pathologies, pourraient expliquer, du moins en partie, la perturbation de la régulation de ces adipokines.

Nous avons donc voulu étudier l'effet de l'hyperglycémie seule ou en combinaison avec l'hyperinsulinémie sur l'expression génique et la concentration plasmatique de trois hormones sécrétées par le tissu adipeux : la leptine, l'adiponectine et l'ASP chez des sujets sains. Par la combinaison de l'hyperinsulinémie et de l'hyperglycémie, nous exagérons l'état constaté lors d'une intolérance au glucose et d'un diabète de type 2 récent et mal contrôlé. L'hyperglycémie seule permet d'isoler les effets du glucose des effets de la combinaison hyperinsulinémie-hyperglycémie. En étudiant l'effet de l'hyperglycémie seule ou en combinaison avec l'hyperinsulinémie, chez l'homme sain, sur deux volets du métabolisme hormonal : l'expression génique et la concentration plasmatique, de trois adipokines importantes, cette étude permet de vérifier des données, soit jamais observées ou observées, de façon fragmentaire, *in vitro*, chez l'animal et chez l'humain.

Pour étudier *in vivo* les effets indépendants, additifs et synergiques de l'insuline et du glucose, nous avons doublé de façon transitoire la glycémie, soit en stabilisant l'insulinémie au niveau de la concentration à jeun ou en l'augmentant à une valeur supra physiologique, et ce, chez des hommes en santé.

CHAPITRE 1

LE TISSU ADIPEUX : UNE GLANDE ENDOCRINE

Le tissu adipeux a traditionnellement été considéré comme un simple organe de stockage. Cependant, au cours de la dernière décennie, il a été démontré que la cellule adipeuse joue un rôle important (26). En effet, elle sécrète de nombreuses substances, dont les adipokines, et peut être considérée comme une cellule endocrine et paracrine. Parmi ces adipokines, on retrouve la leptine, l'adiponectine et l'ASP.

1.1 Leptine

La découverte de lignées de souris massivement obèses ob/ob et db/db a permis l'identification ultérieure de la leptine (55;56). Ces souris mangent continuellement, sont massivement obèses et développent fréquemment le diabète de type 2 (29). L'existence d'une déficience en un facteur régulateur de l'apport alimentaire et du métabolisme chez les souris ob/ob a été suspectée à la suite d'une étude comportant une anastomose vasculaire entre des souris homozygotes ob/ob ou db/db et des souris sauvages. L'anastomose entre la souris ob/ob et la souris sauvage s'est traduite par une réduction de la prise alimentaire et une perte de poids chez les souris ob/ob (figure 1, situation de gauche) (57). Par contre, l'anastomose vasculaire entre la souris db/db et la souris sauvage a engendré une perte de poids, non pas chez la souris db/db, mais chez la souris sauvage (figure 1, situation du centre). Enfin, l'anastomose entre une souris ob/ob et une souris db/db s'est traduite par une perte de poids uniquement chez la souris ob/ob (figure 1, situation de droite). Ces résultats ont confirmé que la souris ob/ob est déficiente en un facteur régulateur de l'appétit, alors que la souris db/db possède ce facteur, mais qu'il ne peut pas exercer son action (57).

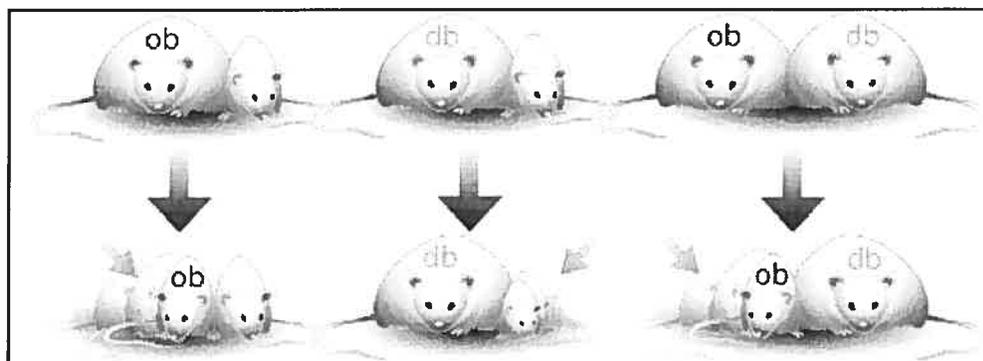


Figure 1 Anastomose vasculaire entre des souris homozygotes ob/ob ou db/db et des souris sauvages
(source ; <http://www.bioteach.ubc.ca/Biomedicine/leptins/parabiosis.gif>)

Le produit du gène ob a été identifié et nommé leptine, du mot grec *leptos* signifiant mince (2). Les souris ob/ob sont donc déficientes en leptine, alors que les souris db/db présentent une mutation dans les gènes codant le récepteur de la leptine (obR). Ces dernières sont donc résistantes à la leptine. La structure du gène de la leptine et de son homologue humain, localisé sur le chromosome 7, ont été décrits en 1994 par Zhang et coll. (55).

La leptine est produite et sécrétée principalement par le tissu adipeux (26;55). C'est une protéine de 16 kDa qui comporte 167 acides aminés (55). La concentration plasmatique de la leptine est plus élevée chez les femmes que chez les hommes, et ce, même après correction pour l'adiposité (58). Ainsi, la concentration plasmatique moyenne de leptine est de 9 ng/mL chez la femme (59) et de 5 ng/mL chez l'homme (60). Le récepteur (Ob-R) fait partie de la famille des récepteurs transmembranaires des cytokines (26;61). Il a une distribution ubiquitaire et est exprimé abondamment dans l'hypothalamus (29;33;62;63). Il existe plusieurs isoformes de Ob-R, dont une forme soluble qui est probablement le transporteur de la leptine (63).

En état énergétique stable, la sécrétion et la concentration plasmatique de la leptine sont proportionnelles au degré d'adiposité (1;3). Ce n'est toutefois pas un reflet statique de l'état des réserves adipeuses puisque la régulation de la leptine varie en

fonction de la prise alimentaire; elle augmente suite à l'ingestion d'aliments et diminue en période de jeûne (3;45;64).

La leptine agit comme indicateur nutritionnel aux centres régulateurs de l'hypothalamus. Après avoir traversé la barrière hémato-encéphalique, la leptine se lie à son récepteur dans l'hypothalamus où elle active des voies entraînant l'inhibition de l'apport alimentaire et l'augmentation de la dépense énergétique (2). Elle affecte l'expression génique et les voies métaboliques de substances anorexigènes (qui réduisent l'appétit) et de substances orexigènes (qui augmentent l'appétit). Le NPY (neuropeptide Y) est un peptide orexigène produit dans le noyau arqué de l'hypothalamus qui agit dans les noyaux paraventriculaires en augmentant la prise alimentaire et en diminuant la dépense énergétique (65). La leptine inhibe l'expression génique du NPY, ce qui a pour effet de diminuer la prise alimentaire et d'augmenter la dépense énergétique (2;65;66). Une autre cible de la leptine est la POMC (proopiomélanocortine), dont le dérivé est l' α -MSH (*α -melanocyte-stimulating hormone*), un peptide anorexigène. La leptine stimule la production de la POMC et donc de l' α -MSH. En se liant à son récepteur, le récepteur à la mélanocortine de type 4 (MC4R), l' α -MSH entraîne une diminution de l'apport alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique (2). L'effet anorexigénique de la leptine est renforcé par son action inhibitrice sur la voie de l'*agouti-related peptide* (AGRP), un peptide orexigène. L'AGRP agit en inhibant la liaison de l' α -MSH à son récepteur MC4R, ce qui contrecarre l'effet anorexigénique de l' α -MSH. La leptine supprime l'expression génique de l'AGRP (2). En plus de ces voies de régulation bien caractérisées, la leptine agit aussi sur d'autres neuropeptides qui régulent l'appétit, soit la MSH (*melanocyte-stimulating hormone*), l'orexine, le CRH (*corticotropin-releasing hormone*) et les CART (*cocaïne et amphétamine-regulated transcript*) (2). La leptine assure donc un contrôle de la masse adipeuse en augmentant la satiété et, conséquemment, en réduisant l'apport alimentaire et en augmentant la dépense énergétique (figure 2).

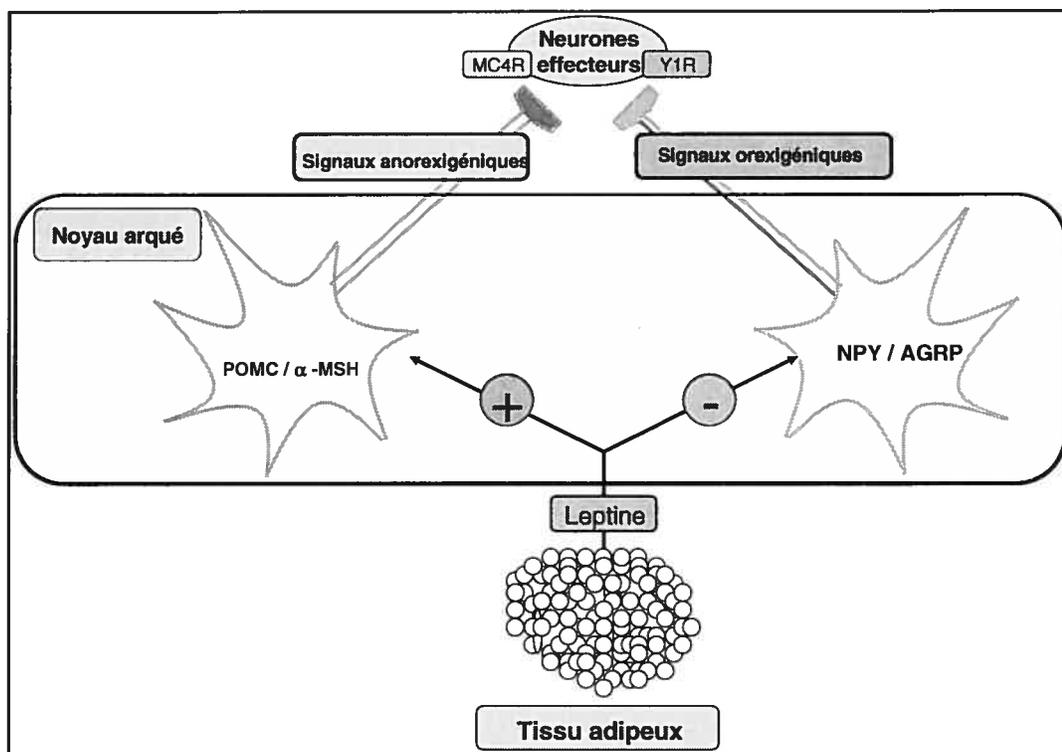


Figure 2 Mécanismes physiologiques de la leptine en ce qui a trait à la satiété

Une autre fonction physiologique de la leptine est de réguler l'homéostasie des acides gras et des triglycérides dans les cellules non adipeuses (muscles squelettiques, muscle cardiaque, pancréas, foie) de manière à leur assurer un apport adéquat tout en évitant une surcharge et une éventuelle lipotoxicité. La leptine prévient l'accumulation de triglycérides dans ces tissus en favorisant l'oxydation des acides gras au moyen d'une stimulation d'une enzyme clef : l'AMPK (*5'-AMP-activated protein kinase*) (33;67). Dans le muscle, l'activation précoce de l'AMPK est induite directement par l'action de la leptine, alors que l'activation tardive provient de l'action de la leptine sur l'hypothalamus (33;68). Elle bloque donc l'accumulation des triglycérides dans les tissus non adipeux pour les confiner dans les tissus d'entreposage (67).

Il a également été suggéré que la leptine améliorerait la sensibilité à l'insuline, soit par un mécanisme impliquant l'hypothalamus, soit par une action directe sur les tissus périphériques, mais les résultats des études demeurent contradictoires (69).

Enfin, la leptine est aussi impliquée dans la régulation de l'axe gonadotrope et de l'axe thyroïdienne (29). La distribution ubiquitaire du récepteur de la leptine est compatible avec les multiples rôles de la leptine et suggère qu'elle a d'autres fonctions encore inconnues (63).

En somme, la leptine reflète donc les réserves adipeuses et permet la régulation de l'apport alimentaire, de l'utilisation des substrats et de la dépense énergétique. Elle a tout d'abord été considérée exclusivement comme un moyen, pour l'organisme, de prévenir l'obésité. Aujourd'hui, on la considère plutôt comme un mécanisme d'adaptation au jeûne; sa diminution lors de la perte de poids et/ou de la restriction alimentaire entraîne une réduction de la dépense énergétique se traduisant par une économie d'énergie et ainsi, une survie prolongée (70).

1.2 Adiponectine

L'adiponectine a été identifiée et caractérisée de manière indépendante et simultanée par quatre groupes de recherche, chez l'homme comme chez la souris, au milieu des années 90 (62;71). L'adiponectine est la protéine la plus abondamment sécrétée par le tissu adipeux, d'où son autre appellation : « adipose most abundant gene transcript 1 » ou apM1.

Chez l'humain, elle représente 0,01 % (72) de toutes les protéines plasmatiques et sa concentration varie de 5 à 25 $\mu\text{g/mL}$ (73). Sa concentration plasmatique surpasse de 1 000 fois celle de la leptine. Il s'agit d'une protéine de 28 kDa comportant 247 acides aminés qui est porteuse d'un domaine globulaire et d'un domaine de type collagène (74). Elle est codée par le gène apM1 qui est exclusivement exprimé dans le tissu adipeux (74). Ce gène, composé de trois exons dont le premier est non codant, est situé sur le chromosome 3 en 3q27 (72). Deux récepteurs possibles de l'adiponectine ont récemment été identifiés; l'un principalement exprimé dans le muscle squelettique et l'autre, dans le foie (75). Cela expliquerait que les effets métaboliques de cette hormone ont été décrits principalement pour ces deux organes.

Jusqu'à présent, toutes les études sur les effets métaboliques de l'adiponectine ont été réalisées chez l'animal. L'adiponectine favorise le catabolisme des acides gras dans les muscles squelettiques et sensibilise le foie à l'action de l'insuline. Dans les muscles squelettiques, l'adiponectine augmente l'expression de molécules impliquées dans le transport, la combustion et la dissipation de l'énergie des acides gras libres, ce qui favorise l'utilisation des triglycérides intramusculaires et circulants. Au contraire, dans le foie, l'adiponectine entraîne une diminution de l'expression de molécules de transport des acides gras libres, réduisant ainsi leur entrée, ce qui améliore la sensibilité à l'insuline. Donc, par des mécanismes distincts, l'adiponectine entraîne une diminution des contenus hépatique et musculaire en triglycérides (4).

D'autres travaux ont démontré l'effet hypoglycémiant de l'adiponectine. En effet, elle diminuerait la production endogène de glucose en inhibant la glucose-6-phosphatase hépatique, une enzyme clef de la production hépatique de glucose (5;6). Une partie des effets pourrait être indirecte et secondaire aux effets de l'adiponectine sur le métabolisme lipidique au foie.

L'adiponectine semble également avoir un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires par son potentiel anti-inflammatoire et son action favorable sur le profil lipidique. Elle réduit l'adhésion des monocytes, inhibe la transformation des macrophages en cellules spumeuses et module la cascade inflammatoire, un événement précoce dans la genèse de l'athérosclérose (7). Chez les diabétiques de type 2, un taux bas d'adiponectine est associé à une concentration plasmatique faible de cholestérol HDL et représente donc un risque cardiovasculaire indépendant (8). Il a même été démontré que le niveau plasmatique d'adiponectine prédit des années à l'avance des événements cardiovasculaires chez des hommes sans maladie cardiovasculaire diagnostiquée (76). Cette association est indépendante de l'âge, de l'IMC, du contrôle glycémique (A1c), de la consommation d'alcool et de l'usage du tabac. Comme précédemment mentionné, l'association semble surtout dépendre des effets de l'adiponectine sur le cholestérol HDL (7). Un taux plasmatique réduit

d'adiponectine est donc un marqueur du risque cardiovasculaire et pourrait même avoir un rôle causal dans le développement de l'athérosclérose.

Globalement, l'adiponectine entraîne une réduction du contenu lipidique intramusculaire et intra-hépatique, favorise un meilleur contrôle glycémique et pourrait jouer un rôle protecteur dans le développement des maladies cardiovasculaires.

1.3 Protéine de stimulation de l'acylation

L'ASP ou C3a des-Arg est une adipokine impliquée dans la régulation du stockage des acides gras dans le tissu adipeux (9). C'est une protéine de 8,9 kDa composée de 76 acides aminés (10). La concentration plasmatique moyenne chez l'adulte en santé est de 28,3 nmol/L. Chez les individus de poids normal, il n'y a pas de différence entre les concentrations plasmatiques d'ASP chez l'homme et chez la femme (37). L'ASP et un de ses précurseurs, le C3a, exercent leurs actions par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire commun, le C5L2 de la famille des récepteurs couplés à la protéine G, qui est exprimé dans le tissu adipeux et les fibroblastes (11).

L'ASP est produite et libérée dans la circulation sanguine par les adipocytes (77). La principale voie de synthèse de l'ASP comprend deux étapes et implique trois protéines : le troisième composé du complément (C3), le facteur B et l'enzyme adipsine (9). Le tissu adipeux est le seul site qui produit les trois précurseurs. D'autres tissus tels que le foie et les macrophages synthétisent certains, mais non l'ensemble de ces composés (9). L'interaction entre le complément C3, le facteur B et l'adipsine entraîne la scission du complément C3 et ainsi, la formation de C3a. Cette étape est suivie de la perte de l'arginine à la terminaison carboxyle, ce qui permet la production de l'ASP (C3a des-Arg) (figure 3) (9).

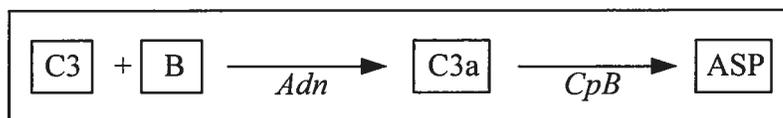


Figure 3 Étapes principales de la production d'ASP à partir des 3 précurseurs : C3 ; le facteur B et l'adipsine
Adn : adipsine; CpB : carboxypeptidase B

(9)

La production locale d'ASP par le tissu adipeux sous-cutané abdominal est stable en période de jeûne et augmente en période post-prandiale. Elle est maximale 3 à 5 heures après l'ingestion d'un repas mixte, période au cours de laquelle la clairance des triglycérides et l'entrée d'acides gras dans le tissu adipeux sont maximales. Le principal stimulateur de la production d'ASP et de la protéine C3 est la protéine transthyréline (TTR) contenue dans les chylomicrons (52;77;78). En effet, la production d'ASP par les adipocytes humains est augmentée de 150 fois par les chylomicrons. Elle est augmentée également par l'insuline, mais de façon moindre (2 fois) (52). Cette augmentation de production locale en période post-prandiale, dans le tissu adipeux, ne se traduit toutefois pas par une variation de la concentration plasmatique. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la production locale soit diluée dans la circulation générale (79).

Le C3a et l'ASP augmentent la synthèse de triglycérides dans les adipocytes par deux mécanismes principaux : 1) la stimulation de l'incorporation des acides gras aux glycérol, 2) l'augmentation du transport du glucose à partir duquel est formé le glycérol (10;11). Le premier mécanisme découle de l'augmentation de l'activité de la diacylglycérol acyltransférase, l'enzyme qui régule la dernière étape de la synthèse des triglycérides (13). Le second est engendré par l'augmentation de la translocation des transporteurs de glucose (Glut 1, Glut 3 et surtout Glut 4) à la surface de la membrane plasmique (9). Il a également été démontré que l'ASP augmente la réestérification des acides gras et qu'elle diminue la lipolyse en inhibant la HSL (lipase hormono-sensible) (9;10;12;13). Les effets de l'ASP sur la synthèse de triglycérides et le transport de glucose s'additionnent à ceux de l'insuline, dont l'activité adipogène est bien reconnue (figure 4) (9).

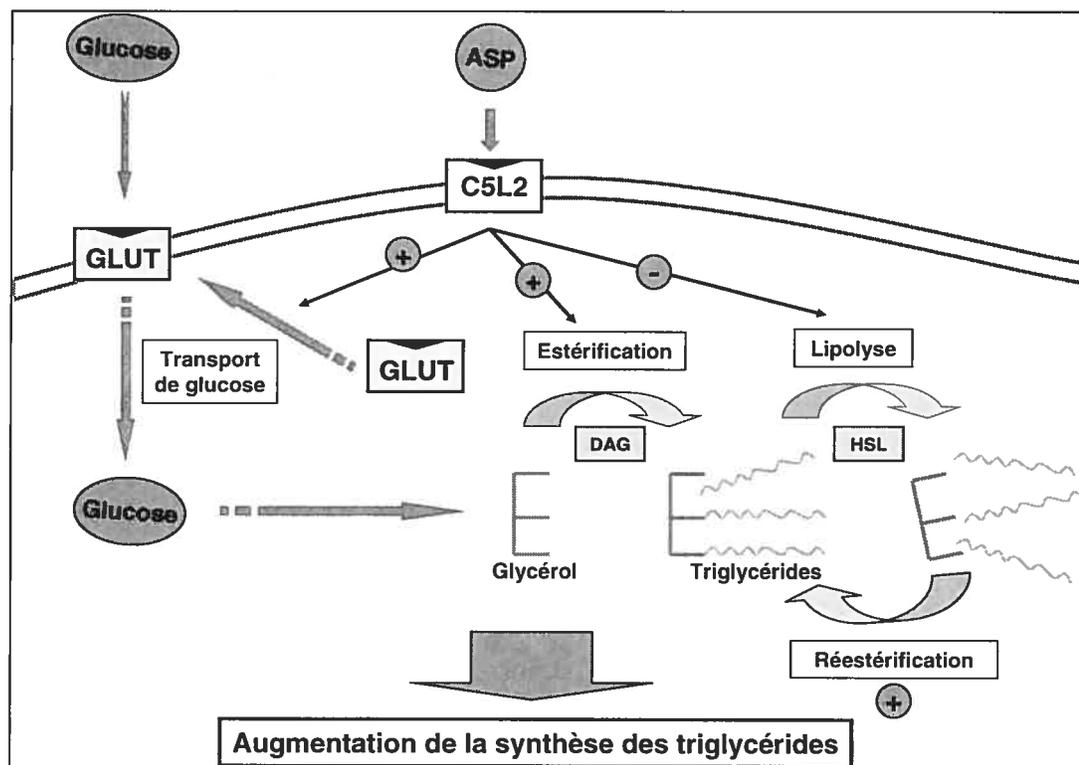


Figure 4 Les effets de l'ASP sur l'augmentation de la synthèse de triglycérides

GLUT : transporteur de glucose ; DAG : diacylglycérol ; HSL : lipase hormono-sensible ; C5L2 : récepteur de l'ASP

En plus de ses fonctions anaboliques, des expérimentations *in vitro* et *in vivo* chez la souris suggèrent que l'ASP, par un effet direct sur les cellules β du pancréas, augmenterait, de manière glucose-dépendante, la première phase de sécrétion d'insuline (14).

L'ASP est donc une adipokine importante pour le stockage des acides gras dans le tissu adipeux. Les chylomicrons sont à la fois le principal véhicule des acides gras en phase post-prandiale et le principal stimulateur de la synthèse d'ASP qui elle-même favorise leur stockage sous forme de triglycérides.

CHAPITRE 2

INSULINORÉSISTANCE

L'insulinorésistance, ou résistance à l'insuline, est un facteur de risque majeur dans le développement du diabète de type 2 et en est une des caractéristiques principales. Elle est la composante centrale du syndrome d'insulinorésistance (syndrome métabolique), qui est lui-même un facteur de risque de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires. Ce syndrome associe une obésité androïde, une dyslipidémie (hypertriglycémie, baisse du cholestérol HDL), une hypertension artérielle et une anomalie de la tolérance au glucose (80-83). Le profil génétique, en interaction avec de mauvaises habitudes de vie, prédispose au développement de l'insulinorésistance. L'obésité, surtout abdominale, et l'inactivité physique sont les deux habitudes de vie qui influencent le plus l'action de l'insuline.

L'insulinorésistance se définit comme la réduction de la capacité de l'insuline à stimuler le transport et l'utilisation du glucose dans les tissus cibles : les muscles squelettiques, le foie et le tissu adipeux (84). Plusieurs études indiquent que la résistance à l'insuline précède l'apparition du diabète de type 2 (85;86). Au début du développement de l'insulinorésistance, le pancréas compense la résistance à l'insuline en augmentant la sécrétion de l'hormone. Cette première phase est donc caractérisée par une hyperinsulinémie et une glycémie normale. Les anomalies de la tolérance au glucose, soit l'intolérance au glucose ou le diabète de type 2, n'apparaissent que lorsque le pancréas n'est plus capable de compenser l'insulinorésistance par une sécrétion accrue d'insuline (87). L'insulinorésistance est présente chez la majorité (~ 85 %) des patients diabétiques de type 2 (87;88). L'insulinorésistance touche non seulement le métabolisme des glucides, mais également celui des lipides et des protéines, tout comme la croissance et l'activité cellulaire.

Plusieurs études indiquent que la leptine, l'adiponectine et l'ASP seraient liées à l'insulinorésistance, au diabète de type 2 et/ou à l'obésité (3;9;23-40).

2.1 Implication de la leptine dans l'obésité, l'insulinorésistance et le diabète de type 2

Une augmentation de la concentration plasmatique de leptine est observée chez les rats (22) et les souris (20) présentant une obésité induite par la diète ainsi que chez les rats génétiquement obèses (rats Sprague-Dawley) (21). La concentration plasmatique de leptine est également augmentée chez la souris résistante à l'insuline (20).

Chez l'humain, les niveaux sériques de leptine corrént positivement avec l'indice de masse corporelle (IMC), le pourcentage de gras corporel (figure 5), le ratio taille-hanche et l'insulinémie (28;32;33).

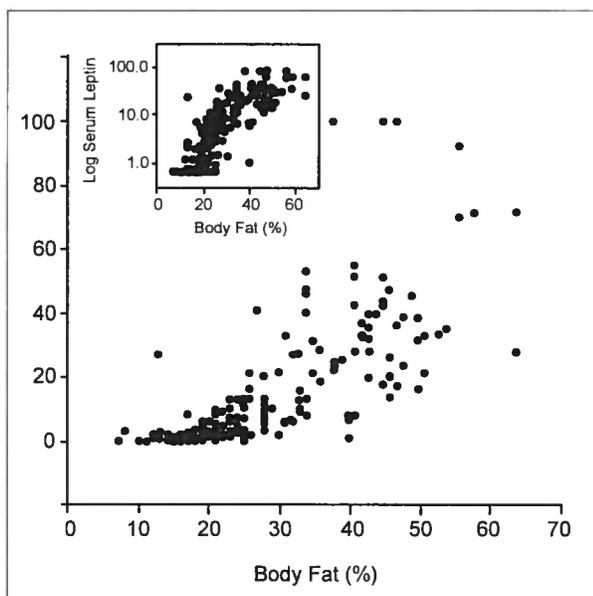


Figure 5 Corrélation entre le pourcentage de gras corporel et la concentration plasmatique de leptine

(32)

L'augmentation du niveau plasmatique de leptine chez les obèses s'explique par une sécrétion adipocytaire accrue (3;32). L'expression du gène ob est deux fois plus élevée que chez les personnes de poids normal. L'hypertrophie des adipocytes retrouvée chez les obèses, lesquels sont en moyenne 2 à 4 fois plus volumineux que

chez les sujets minces, est associée à une augmentation de la production unitaire de leptine (3;32). En situation d'obésité extrême, l'augmentation du nombre d'adipocytes contribue également à la concentration de leptine sérique (3).

Les déficiences en leptine et les défauts du récepteur Ob-R sont très rares chez l'humain (26). Seules quelques rares mutations homozygotes de la leptine ou de son récepteur ont été décrites. Ces mutations entraînent une hyperphagie majeure survenant dès les premières semaines de vie (26;62). Les cas de déficit en leptine répondent très bien à un traitement substitutif (89).

L'obésité est associée à une élévation des niveaux circulants de leptine, ce qui suggère non pas une déficience, mais plutôt une résistance à la leptine. L'hyperleptinémie est considérée comme le reflet d'une résistance à la leptine. Les mécanismes expliquant cette résistance sont encore obscurs, mais pourraient comporter un problème de transport de la leptine au cerveau, un défaut du récepteur et/ou de la signalisation post-récepteur (26;29).

La perte de poids entraîne une baisse de la concentration de la leptine. Considine et coll. (32) ont en effet observé, chez leurs sujets obèses, une réduction de 53 % de la concentration plasmatique de leptine avec une perte de poids de 10 % (figure 6). La baisse de la concentration de la leptine est secondaire à deux mécanismes : la réduction de la masse grasse et l'amélioration de la sensibilité à la leptine (26;29).

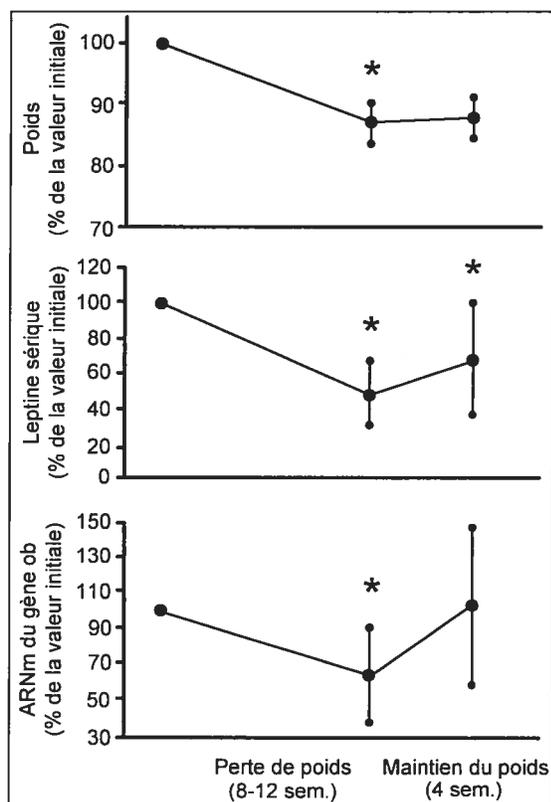


Figure 6 Relation entre la perte de poids et la concentration sérique de la leptine et de l'expression du gène ob

(32)

Moyennes \pm ET

* $p = 0,05$

Tout comme chez la souris, on observe chez l'humain une augmentation de la concentration plasmatique de leptine chez les sujets diabétiques de type 2. Néanmoins, lorsqu'ils sont appariés pour le poids à des sujets non diabétiques, il n'y a pas de différence dans la concentration plasmatique de leptine, ce qui suggère que l'augmentation de la leptine est associée au surpoids et non au fait d'être diabétique (28).

2.2 Implication de l'adiponectine dans l'obésité, l'insulinorésistance et le diabète de type 2

La majorité des adipokines sont sécrétées par l'adipocyte de façon proportionnelle à la masse adipeuse dans la circulation plasmatique. À l'opposé, la concentration

plasmatique d'adiponectine est réduite, tant chez l'animal que chez l'humain, qui présentent une surcharge pondérale (23;25;30). En effet, la concentration plasmatique d'adiponectine est réduite chez la souris ob/ob, qui est massivement obèses et qui développent fréquemment un diabète de type 2 (15). On observe également cette réduction chez les singes rhésus obèses et diabétiques de type 2 (16).

Chez l'humain, une corrélation négative a été démontrée entre la concentration plasmatique d'adiponectine et le pourcentage de gras corporel (voir figure 7) (23), l'IMC (figure 8) (23;30;31;39) et le ratio taille/hanche (23), chez l'homme et chez la femme. De plus, une perte de poids correspondant à 10 % de l'IMC se traduit par une élévation significative de la concentration plasmatique d'adiponectine chez les individus obèses (31;39;90).

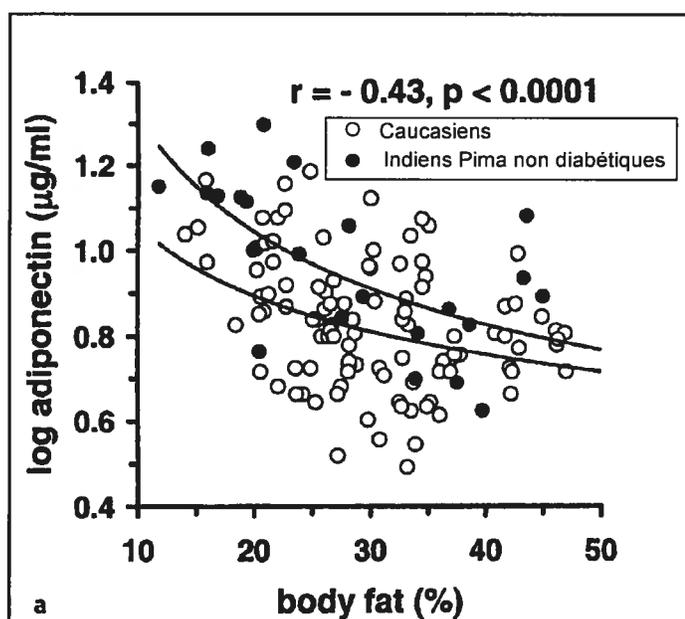


Figure 7 Corrélation négative entre le pourcentage de gras corporel et la concentration plasmatique d'adiponectine

(23)

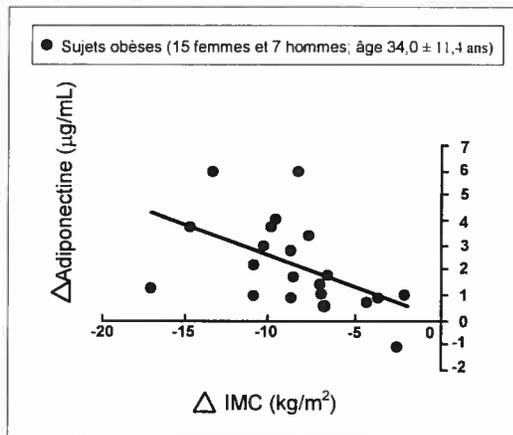


Figure 8 Corrélation entre la réduction de l'IMC et la concentration plasmatique de l'adiponectine

(39)

La concentration plasmatique d'adiponectine est également réduite en présence d'insulinorésistance et de diabète de type 2 chez les hommes et les femmes (figure 9) (23). Elle a été corrélée négativement avec la glycémie deux heures post-charge de glucose (23;31), l'hémoglobine glyquée (A1c) (31) et l'insulinémie à jeun (figure 10) (23), et positivement avec l'utilisation du glucose stimulée par l'insuline (23). La relation entre l'insulinorésistance et la concentration plasmatique d'adiponectine est indépendante de l'IMC (23).

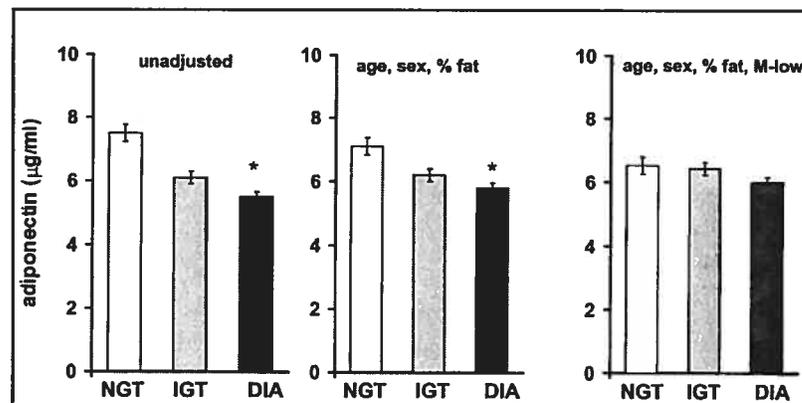


Figure 9 Concentration plasmatique d'adiponectine chez les normotolérants au glucose, les intolérants au glucose et les diabétiques

(23)

NGT : normotolérants au glucose; IGT : intolérants au glucose; DIA : diabétiques

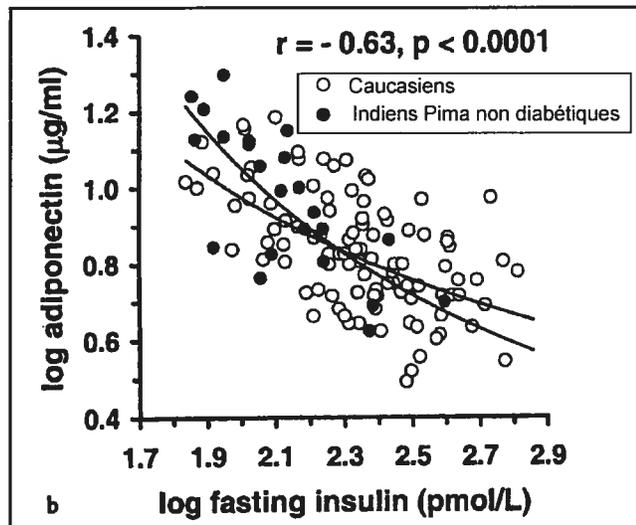


Figure 10 Corrélation négative entre l'insulinémie à jeun et la concentration plasmatique d'adiponectine

(23)

Chez l'humain, les polymorphismes associés à une concentration moindre d'adiponectine exposent les patients intolérants au glucose à un risque important d'évolution vers le diabète de type 2 (40). De plus, l'administration de thiazolidinediones, un médicament qui augmente la sensibilité à l'insuline au moyen d'une action agoniste sur le récepteur nucléaire PPAR- γ abondamment exprimé dans le tissu adipeux, augmente la concentration plasmatique d'adiponectine. Cet effet a été observé tant chez les sujets diabétiques de type 2 que chez les sujets obèses et chez les sujets témoins minces (25). Ces résultats suggèrent que la baisse d'adiponectine observée chez les obèses s'expliquerait, du moins en partie, par leur résistance à l'insuline.

Ainsi, le métabolisme de l'adiponectine semble être perturbé, chez l'animal et chez l'humain, en présence d'obésité, d'intolérance au glucose et de diabète de type 2, conditions habituellement associées à une insulino-résistance. Il est donc possible que l'adiponectine ait un rôle dans la survenue du diabète de type 2. L'adiponectine possède aussi un potentiel thérapeutique important.

2.3 Implication de l'ASP dans l'obésité, l'insulinorésistance et le diabète de type 2

Peu d'études faites chez l'animal se sont penchées sur les concentrations plasmatiques d'ASP et de ses précurseurs en situation pathologique. On sait, néanmoins, que le complément C3 est augmenté chez les rats génétiquement obèses (rats Zucker) (10;17) et les souris dont l'obésité est induite par la diète (10;91).

Chez l'humain, la plupart des études démontrent une corrélation positive entre la concentration plasmatique et l'expression génique de l'ASP, de ses précurseurs et différents indices de surplus de poids, tel que l'IMC (figure 11), la masse adipeuse totale, le pourcentage de gras corporel et le ratio taille-hanche (9;27). Selon certaines études, la concentration plasmatique d'ASP chez les patients obèses est de 1,5 à 4 fois plus élevée que celle des individus de poids normal (9). Les femmes obèses ont un niveau plasmatique d'ASP 2 fois plus élevé que les hommes obèses (37). La perte de poids et le jeûne prolongé se traduisent par une baisse des concentrations plasmatiques d'ASP et de ses précurseurs, le C3, l'adipsine et le facteur B (38;92).

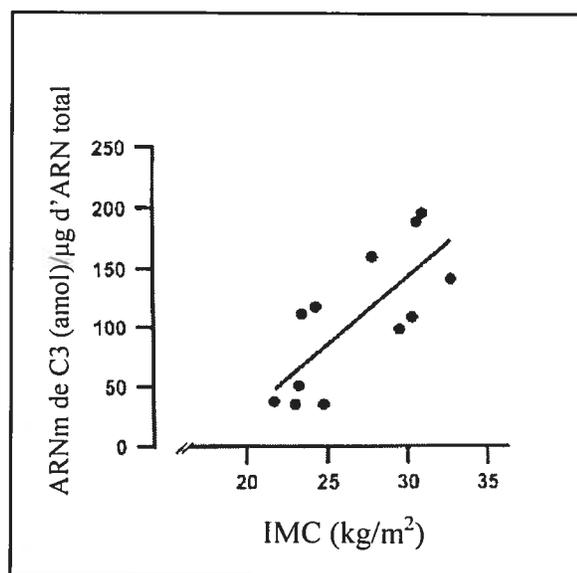


Figure 11 Corrélation entre l'ARNm de C3 dans le tissu adipeux sous-cutané et l'IMC chez des hommes non diabétiques

(27)

Les concentrations plasmatiques de l'ASP, du complément C3, du facteur B et de l'adipsine sont également significativement augmentées chez les diabétiques de type 2 (9). Certaines études ont également associé ces paramètres aux indices de contrôle glycémique suivant un traitement pharmacologique, mais les résultats sont discordants (36;93). La régulation de l'ASP et de ses précurseurs par différents hypoglycémifiants oraux a été étudiée par plusieurs équipes de recherche, mais les résultats demeurent contradictoires (36;93;94). Lorsque les diabétiques de type 2 sont appariés pour le poids avec des sujets témoins, les niveaux plasmatiques de l'ASP et de ses précurseurs sont similaires (93;95). Ceci suggère que l'augmentation des niveaux plasmatiques observée chez les patients diabétiques de type 2 s'expliquerait par le surplus de poids qui y est fréquemment associé (9).

CHAPITRE 3

RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES PAR LE GLUCOSE ET L'INSULINE

L'insuline est une hormone anabolique sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Elle joue un rôle dans de nombreuses voies métaboliques. Ses principaux tissus cibles sont les muscles squelettiques, le tissu adipeux et le foie. Elle régule le métabolisme du glucose et des acides gras, la synthèse et la dégradation des protéines, la croissance, la différenciation cellulaire et la synthèse de l'ADN. Pour remplir ces fonctions, l'insuline modifie l'activité d'enzymes et de protéines de régulation en affectant, le plus souvent, leur état de phosphorylation. De plus, l'insuline contrôle la quantité de nombreuses protéines en régulant leur transcription et leur traduction. Seulement dans le muscle squelettique, l'insuline régule les niveaux d'ARNm d'environ 800 gènes. La majorité, dont la fonction est connue, est impliquée dans la régulation de la transcription et de la traduction, dans le métabolisme énergétique ou dans la signalisation intracellulaire (84). Ainsi, l'insuline est un puissant stimulus qui, par son impact sur la régulation génique, entre autres, joue un rôle important dans l'activité cellulaire.

Le glucose est présent dans certains aliments, mais il provient surtout de l'hydrolyse du saccharose, un disaccharide, et de l'amidon, un polysaccharide. En fait, une fois entrés dans l'organisme, presque tous les glucides alimentaires digestibles sont transformés en glucose, le principal glucide utilisé par l'organisme (96). Chez une personne saine, la glycémie est maintenue dans une zone étroite de concentration s'échelonnant de 4 à 6 mmol/L. Quatre processus métaboliques permettent l'homéostasie glucidique : d'une part, la glycogénogenèse et la glycolyse, et d'autre part, la glycogénolyse et la néoglucogenèse, qui permettent, respectivement, l'utilisation et la production de glucose. La régulation de ces processus est exercée principalement par deux hormones pancréatiques antagonistes, l'insuline et le

glucagon (97). En plus d'être des substrats essentiels au métabolisme énergétique, le glucose et les autres nutriments ont une influence importante sur la régulation de l'expression des gènes. Cette régulation est primordiale puisqu'elle permet d'adapter les processus métaboliques à l'environnement nutritionnel. Différentes études ont mis en évidence le rôle direct du glucose dans le contrôle de l'expression de certains gènes. Par exemple, des expérimentations *in vitro* et *in vivo*, chez les mammifères, ont montré que le glucose augmente la transcription de gènes codant des enzymes glycolytiques et adipogènes dans le foie et le tissu adipeux (98;99).

Chez les individus qui souffrent de diabète de type 2 et d'insulinorésistance, l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le mécanisme de l'insuline et le métabolisme du glucose (IRS-1, hexokinase II, Glut 4 et glycogène synthase) dans les tissus périphériques est altérée (100).

À la lumière des connaissances actuelles, tout porte à croire que les caractéristiques des anomalies de la tolérance au glucose, soit l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie, peuvent réguler un nombre important de gènes dans les organes cibles de l'insuline, dont le tissu adipeux. En effet, des études suggèrent que l'insuline et le glucose jouent un rôle sur la régulation génique de la leptine, de l'adiponectine et de l'ASP sécrétées par le tissu adipeux, ainsi que dans celle de leur concentration plasmatique (25;27;28;40-54). Le dosage de la concentration plasmatique offre un autre angle d'observation sur la régulation de chacune des adipokines. Elle peut refléter, entre autres, le taux d'expression génique de l'hormone et celui de sa dégradation.

En raison du nombre restreint d'études publiées à ce jour sur le sujet et de l'importance du type de méthodologie employée, les études clefs sont présentées en détail. Dans le but de résumer l'état des connaissances actuelles en ce qui concerne chacun des volets de la régulation qui sont étudiés, un sommaire est également présenté à la fin de chaque section.

Malheureusement, il n'est pas possible d'harmoniser les taux d'infusion d'insuline entre les études pour deux raisons principales. D'une part, lorsque le taux est donné en $\text{mU}/(\text{m}^2 \cdot \text{min})$, la taille des sujets n'est pas toujours fournie pour les convertir en $\text{mU}/(\text{kg} \cdot \text{min})$. D'autre part, le dosage de l'insuline n'est pas standardisé, les différentes trousse de dosage radio-immunologique (RIA) peuvent donc donner des résultats significativement différents pour un même échantillon. Ceci explique que le facteur de conversion de $\mu\text{U}/\text{mL}$ en pmol/L varie d'une compagnie à l'autre. À chaque fois que c'était possible nous avons fourni, à titre indicatif, la concentration d'insuline en pmol/L à la suite de celle exprimée $\mu\text{U}/\text{ml}$.

3.1 Régulation de l'expression génique et de la concentration plasmatique de la leptine par l'insuline et/ou le glucose

Les niveaux plasmatiques de leptine corrént positivement avec la masse adipeuse et l'insulinorésistance, deux conditions difficilement dissociables. Cette corrélation suggère que l'hyperinsulinémie pourrait influencer la régulation du métabolisme de la leptine. De plus, le fait qu'un jeûne sans perte de poids se traduise par une importante diminution de la concentration sérique de leptine renforce l'hypothèse que des facteurs autres que la masse adipeuse, tels que les variations de glycémie et/ou d'insulinémie, sont impliqués dans la régulation de sa sécrétion (45;46). Conséquemment, plusieurs équipes de recherche ont étudié la régulation de l'expression du gène *ob* et de la concentration plasmatique de leptine par le glucose et l'insuline.

Expression génique

Les études publiées à ce jour suggèrent que l'expression du gène codant la leptine, le gène *ob*, est stimulée par l'insuline ainsi que par la combinaison de l'insuline et du glucose (48;49;51;53;54). Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur l'effet isolé de l'hyperglycémie.

Études *in vitro*

Des expérimentations *in vitro* suggèrent que l'insuline augmente l'expression du gène ob d'adipocytes de souris, de rats et d'humains (49;51;53). Leroy et coll. (51) ont mis en culture des adipocytes de souris de la lignée 3T3-F442A différenciés, soit en présence ou en absence d'insuline. L'expression génique du gène ob était trois fois supérieure lorsque l'insuline était présente, et ce, après 10 heures, alors qu'elle était cinq fois supérieure après 24 heures. Kolaczynski et coll. (49) ont mis des adipocytes de tissu adipeux sous-cutané abdominal humain en culture avec de l'insuline à concentration de 100 nmol/L pendant 96 heures. L'expression du gène ob a augmenté significativement ($p < 0,005$) après 72 heures.

Mueller et coll. (53) ont démontré, pour leur part, que chez des adipocytes de rats, le glucose devait absolument être présent pour que l'insuline puisse stimuler l'expression du gène ob. En effet, des inhibiteurs du transport et du métabolisme du glucose, ajoutés au milieu de culture, ont annulé l'effet de l'insuline sur l'expression génique de la leptine. Les études *in vitro* suggèrent donc que l'insuline augmente l'expression du gène ob.

Aucune étude n'a mesuré l'effet isolé du glucose et de la combinaison hyperinsulinémie-hyperglycémie sur le gène de la leptine.

Études *in vivo*

Les résultats obtenus *in vitro* concordent avec ceux observés chez l'animal (48;64). Cusin et coll. (48) ont maintenu des rats minces en condition d'hyperinsulinémie en leur infusant 2 U/jour d'insuline humaine pendant 48 heures. L'insulinémie était de 904 ± 131 pmol/L chez ces rats, alors qu'elle était de 351 ± 26 pmol/L chez les rats contrôles. L'euglycémie a été maintenue ($\sim 7,00$ mmol/L). Cette expérimentation s'est traduite par une augmentation d'expression du gène ob dans le tissu adipeux blanc de 88 % par rapport aux valeurs contrôles. De plus, lorsque leur insulinémie a

été diminuée par un jeûne de 3 jours (insulinémie : 96 pmol/L vs 146 pmol/L), l'expression génique a diminué considérablement par rapport aux valeurs contrôles, chez ces mêmes rats. Mizuno et coll. (54) ont déterminé que, chez la souris, l'expression du gène *ob* corrèle avec l'insuline et, plus fortement, avec le glucose. Néanmoins, cette association entre l'hyperglycémie et l'expression du gène *ob* n'a été confirmée par aucune étude d'intervention. Les résultats obtenus chez l'animal suggèrent donc que le gène *ob* est stimulé par l'insuline et, de façon plus importante, par le glucose.

À ce jour, aucune étude n'a évalué la régulation du gène *ob* par l'insuline et le glucose chez l'humain.

Concentration plasmatique

La combinaison de l'insuline et du glucose semble augmenter la concentration plasmatique de la leptine. Toutefois, l'effet de l'insuline isolé demeure obscur puisque les études portant sur ce sujet rapportent des résultats discordants. L'effet de l'hyperglycémie isolé est inconnu.

Études in vitro

Les études *in vitro* sur les adipocytes de rats démontrent que l'insuline stimule la libération de leptine dans le milieu de manière concentration-dépendante. Elles indiquent, tout comme pour l'expression génique, que le glucose doit être présent pour que l'insuline exerce son effet (53). Kolaczynski et coll. (49), pour leur part, ont mis en culture des adipocytes humains avec de l'insuline. La mise en culture d'adipocytes de tissu adipeux abdominal sous-cutané humain avec de l'insuline (100 nmol/L) a entraîné la libération de leptine après 96 heures, et ce, sans glucose. Ainsi, selon ces études, non seulement l'insuline et le glucose stimulent le gène *ob*, mais ils entraînent également la sécrétion de leptine par les adipocytes en culture.

Études *in vivo*

En raison du nombre plus important d'études recensées dans cette section, celles-ci sont présentées en fonction des stimuli employés. Ceci a pour objectif de faciliter la compréhension.

Effet de l'insuline seule

Malmström et coll. (28) ont effectué des clamps hyperinsulinémiques euglycémiques (insulinémie : 486 ± 30 pmol/L) d'une durée de 8,5 heures chez des sujets présentant un léger surpoids (IMC $26,3 \pm 0,6$ kg/m², âge 51 ± 3 ans). Lorsque les taux plasmatiques de leptine étaient comparés aux valeurs basales, ils étaient significativement ($p < 0,05$) augmentés après 6 heures de clamp. Par contre, lorsqu'ils étaient comparés au clamp témoin (infusion de salin), ils étaient significativement ($p < 0,05$) augmentés après 2 heures de clamp. Les résultats de cette étude suggèrent que l'insuline augmente la concentration de leptine.

Utrianen et coll. (50) confirment ces résultats par leur étude réalisée chez 16 hommes (IMC de $23,1 \pm 0,5$ kg/m², âge 24 ± 1 ans) et 11 femmes (IMC de $22,0 \pm 1,0$ kg/m², âge 24 ± 1 ans) chez qui des clamps hyperinsulinémiques euglycémiques, d'une durée de 6 heures, avec trois niveaux d'infusion d'insuline ont été réalisés. Ainsi, pendant les deux premières heures, ils ont infusé aux sujets 1 mU/(kg · min) d'insuline (insulinémie : 379 pmol/L), 2 mU/(kg · min) (insulinémie : 823 pmol/L) pendant les deux heures suivantes et finalement, 5 mU/(kg · min) (insulinémie : 2 843 pmol/L) pendant les deux dernières heures. Ils ont vu la concentration plasmatique de leptine augmenter ($p < 0,05$), par rapport aux valeurs de base, et ce à partir de la quatrième heure, soit au moment du changement de taux d'infusion de 2 à 5 mU/(kg · min). À la quatrième heure, la concentration plasmatique de leptine était 17 ± 4 % plus élevée que la concentration de base, alors qu'à la sixième heure, elle était 50 ± 6 % plus élevée.

Boden et coll. (46) ont réalisé un clamp hyperinsulinémique euglycémique de 72 heures chez 28 hommes de poids normal (IMC de $28,5 \pm 2,0 \text{ kg/m}^2$, âge $31,7 \pm 7,2$ ans). Cette hyperinsulinémie (insulinémie : $878 \pm 27 \text{ pmol/L}$) a entraîné une élévation de la concentration plasmatique de leptine de l'ordre de 30 % à la 24^e heure et de près de 80 % à la 72^e heure. Le rythme circadien de la leptine (maximal en fin de nuit et minimal en fin d'après-midi) est conservé en situation d'hyperinsulinémie. Ces trois études (28;46;50) suggèrent un effet stimulant de l'insuline sur la concentration plasmatique de leptine; toutefois, certaines études (47;49) ne confirment pas ces observations.

En effet, Kolaczynski et coll. (49) ont pour leur part obtenu des résultats différents. Ils ont réalisé des clamps hyperinsulinémiques euglycémiques avec différents taux d'infusion d'insuline chez 16 sujets de poids normal (IMC de $23,8 \pm 0,6 \text{ kg/m}^2$, âge $38,7 \pm 1,8$ ans). Les taux d'infusion d'insuline étaient de 40, 60, 120, 300 et 1 200 mU/(m² · min) (insulinémie : 75 à > 10 000 µU/mL (538 à > 71 750 pmol/L)). Chaque clamp durait de 2 à 5 heures. L'hyperinsulinémie n'a engendré aucune modification significative du taux de leptine plasmatique, même aux concentrations supra-physiologiques.

Dagogo-Jack et coll. (47) ont obtenu des résultats similaires. Ils ont réalisé des clamps hyperinsulinémiques euglycémiques de 5 heures chez dix hommes et femmes, normaux (IMC $23,6 \pm 2 \text{ kg/m}^2$, âge 33 ± 8 ans). L'insuline, qui a été infusée à un taux constant de 2 mU/(kg · min) (insulinémie : 120 µU/mL (861 pmol/L)) pendant 5 heures, n'a entraîné aucune élévation de la concentration plasmatique de leptine. Ces deux études (47;49) n'ont donc pas observé d'effet de l'hyperinsulinémie sur la concentration plasmatique de leptine et ce, malgré des taux largement supra-physiologiques. En effet, un taux d'infusion de 2 mU/(kg · min) équivaut au maximum atteint après un repas copieux, ce qui correspond environ à 10 fois le taux basal.

Ainsi, chez l'humain, l'effet isolé de l'insuline sur la concentration plasmatique de leptine demeure controversé. Les résultats divergents entre les études ne peuvent pas être expliqués par les doses d'insuline infusées. En effet, la concentration de la leptine a augmenté avec une insulinémie de 486 pmol/L (28) dans une étude, alors qu'elle n'a pas bougé avec une insulinémie supérieure à 71 750 pmol/L dans une autre (49). Les résultats ne sont pas non plus explicables par la durée d'expérimentation : la concentration plasmatique de leptine a augmenté après deux heures d'expérimentation au cours d'une étude (28), alors qu'elle n'a pas bougé au bout de cinq heures dans une autre (47).

Combinaison hyperinsulinémie-hyperglycémie

Boden et coll. (46) ont réalisé deux clamps hyperglycémiques avec deux plateaux glycémiques différents ($\sim 8,5$ mmol/L et $\sim 12,5$ mmol/L) de 72 heures chez 28 hommes présentant un léger surpoids (IMC de $28,5 \pm 2,0$ kg/m², âge $31,7 \pm 7,2$ ans). Comme aucune substance inhibitrice de la sécrétion d'insuline n'a été administrée au cours de ces clamps, l'insulinémie a augmenté. La combinaison de l'hyperinsulinémie et de l'hyperglycémie n'a pas eu d'effet additif sur le niveau plasmatique de leptine par rapport au clamp hyperinsulinémique euglycémique (cf. p.28). Cette étude permet de dissocier l'effet de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie sur la concentration plasmatique de leptine. Elle suggère donc que l'hyperinsulinémie prolongée augmente la concentration plasmatique de leptine chez des sujets normaux, sans effet additif de l'hyperglycémie.

Sonnenberg et coll. (45) ont réalisé des clamps hyperinsulinémiques hyperglycémiques chez neuf sujets de poids normal (6 femmes et 3 hommes, IMC de $23,1 \pm 0,7$ kg/m², âge de $29,2 \pm 2,8$ ans). Ils ont infusé du dextrose 20 % à trois taux différents de manière à créer trois plateaux glycémiques différents : 5,8 - 6,5 mmol/L (2,5 mg/(kg · min)), 7,0 - 7,4 mmol/L (5,0 mg/(kg · min)) et 7,9 - 8,7 mmol/L (7,5 mg/(kg · min)). Chaque clamp a duré 16 heures. L'élévation de la glycémie a évidemment entraîné une augmentation de l'insulinémie. L'infusion de 2,5 mg/(kg · min) n'a entraîné aucune modification de la concentration plasmatique

de leptine. L'infusion de 5,0 mg/(kg · min) l'a augmentée significativement au cours des huit dernières heures du clamp ($9,8 \pm 1,3$ ng/mL ($p < 0,001$)). L'infusion de 7,5 mg/(kg · min), pour sa part, l'a augmenté significativement ($p < 0,05$) à partir de la quatrième heure. Cette augmentation a été suivie d'une élévation subséquente de 58 % par rapport au niveau de base (jusqu'à $12,8 \pm 2,5$ ng/mL). Cette combinaison hyperinsulinémie-hyperglycémie s'est donc traduite par un effet dose-réponse sur la concentration plasmatique de leptine.

Kolaczynski et coll. (49) ont réalisé des clamps hyperinsulinémiques hyperglycémiques d'une durée de 72 heures chez cinq sujets (quatre hommes, une femme, IMC de $24,9 \pm 0,9$ kg/m², âge de $34,0 \pm 2,0$ ans). Pour l'analyse des données, la durée totale a été divisée en trois périodes de 24 heures chacune. Du dextrose 20 % a été infusé de façon à maintenir la glycémie à 12,6 mmol/L. La concentration plasmatique d'insuline ne différait pas entre chaque période de 24 heures ($172,0$ ($1\ 234,1$ pmol/L) $\pm 19,1$ μ U/mL versus $169,0$ ($1\ 212,6$ pmol/L) $\pm 15,0$ μ U/mL versus $137,3$ ($985,1$ pmol/L) $\pm 9,2$ μ U/mL, respectivement). La concentration plasmatique de leptine était significativement ($p < 0,001$) plus élevée au cours des 24 dernières heures qu'au cours des 48 premières. Ceci suggère que l'infusion doit être prolongée pour modifier la concentration plasmatique.

Ainsi, la combinaison hyperinsulinémie-hyperglycémie augmente la concentration plasmatique de leptine. Aucune étude n'est publiée à ce jour sur l'effet isolé de l'hyperglycémie sur la concentration plasmatique de leptine chez l'humain.

Sommaire

De manière générale, les études *in vitro* démontrent que l'expression du gène ob est stimulée par l'insuline. L'effet isolé du glucose n'est pas connu. Par contre, une étude suggère que ce dernier devrait être présent pour que l'insuline exerce son effet. Les études *in vivo* chez l'animal vont dans le même sens que les études *in vitro*. Administrée isolément, l'insuline stimule le gène ob, tout comme la combinaison de

l'insuline et du glucose. À nouveau, l'effet isolé du glucose demeure inconnu à ce jour. Aucune étude chez l'humain, n'a évalué ni l'effet du glucose, ni l'effet de l'insuline sur l'expression du gène de la leptine.

In vitro, la concentration plasmatique de leptine est également augmentée, de manière proportionnelle, par l'insuline. Aucune étude ne permet de connaître l'effet de l'hyperglycémie isolée. Par contre, il semble devoir être présent pour que l'insuline ait son effet. *In vivo*, l'effet de l'insuline est beaucoup moins clair. En effet, certaines études (28;46;50) démontrent qu'elle a un effet stimulateur sur la concentration plasmatique de leptine, alors que d'autres (47;49), pas. Toutefois, toutes les études (45;46;49) recensées dans la littérature sur l'effet de la combinaison hyperinsulinémie-hyperglycémie indiquent qu'elle augmente la concentration plasmatique de leptine. Comme aucune étude publiée à ce jour ne s'est penchée sur l'effet isolé de l'hyperglycémie sur la concentration plasmatique de leptine, il est impossible de savoir si l'effet stimulant est attribuable à la combinaison de l'insuline et du glucose ou à un l'un et/ou l'autre des stimuli.

3.2 Régulation de l'expression génique et de la concentration plasmatique de l'adiponectine par l'insuline et/ou le glucose

La majorité des études ont mis en évidence une association entre une faible concentration d'adiponectine et le développement de l'insulinorésistance et du diabète (40). Toutefois, la relation causale entre ces deux paramètres reste à démontrer. Peu d'études se sont penchées sur l'impact des caractéristiques de l'insulinorésistance et du diabète de type 2, soit l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie et la combinaison des deux sur la concentration plasmatique et l'expression du gène de l'adiponectine.

Expression génique

Le rôle de l'insuline dans la régulation de la production de l'adiponectine n'est pas clairement défini. Les recherches *in vitro* qui ont étudié l'effet de l'insuline sur

l'expression du gène apM1 rapportent des résultats discordants. Halleux et coll. (43) ont incubé des adipocytes isolés de tissu adipeux viscéral humain en présence de 100 nmol d'insuline. L'insuline a entraîné une augmentation de 179 % de l'expression du gène apM1 par rapport aux valeurs contrôles. À l'opposé, Fasshauer et coll. (44) ont observé une réduction de 85 % de l'expression du gène apM1 lorsqu'ils ont mis en culture des adipocytes 3T3-L1 dans un milieu enrichi de 100 nmol d'insuline pendant 16 heures. L'insuline a diminué l'expression du gène apM1 de manière dose-dépendante, une inhibition significative étant obtenue à partir d'une concentration d'insuline aussi faible que 10 nmol/L.

À ce jour, les études sur la régulation du gène apM1 par l'insuline rapportent des résultats contradictoires. Aucune étude n'a évalué l'effet de l'insuline sur l'expression du gène de l'adiponectine *in vivo* chez l'animal et chez l'homme. Il n'y a pas non plus d'étude *in vitro* et *in vivo*, sur la régulation de l'expression du gène apM1 par le glucose, ni par la combinaison hyperinsulinémie-hyperglycémie.

Concentration plasmatique

Aucune étude *in vitro* et *in vivo*, chez l'animal, n'a évalué l'effet de l'insuline et/ou du glucose sur la concentration d'adiponectine du milieu. Quelques études *in vivo*, chez l'homme, ont été menées sur la régulation de la concentration plasmatique de l'adiponectine par ces stimuli. Yu et coll. (25) ont réalisé des clamps hyperinsulinémiques euglycémiques (infusion d'insuline de 80 mU/(m² · min)) de 5 heures chez huit sujets normaux (IMC de 24,3 ± 3 kg/m², âge de 50 ± 2 ans). Ils ont observé une baisse significative, quoique modeste, de la concentration d'adiponectine, d'environ 20 % par rapport aux valeurs de base (16,6 ± 2,3 µg/mL versus 13,3 ± 2,0 µg/mL ; p = 0,027). Dans une autre étude, l'adiponectinémie, dosée chez cinq hommes en santé (IMC de 24,7 ± 3,7 kg/m², âge 34,8 ± 8,6 ans) au cours d'un clamp du même type (infusion d'insuline de 40 mU/(m² · min)) d'une durée minimale de 2 heures, a diminué d'environ 10 % par rapport aux valeurs de base (30,4 ± 5 µg/mL versus 26,7 ± 3,5 µg/mL ; p < 0,005) (41). La réduction de

l'adiponectinémie plus modeste dans cette dernière étude pourrait s'expliquer par le taux d'infusion plus faible d'insuline chez les sujets.

La seule étude portant sur l'impact de l'hyperglycémie sur la régulation du métabolisme de l'adiponectine a été réalisée par Mannucci et coll. (42). Ceux-ci ont étudié la relation entre l'hyperglycémie chronique et la concentration plasmatique d'adiponectine chez seize patients diabétiques de type 2. Ils n'ont pas observé de relation significative entre l'hyperglycémie chronique, évaluée par le dosage de l'hémoglobine glyquée (A1c), et la concentration plasmatique d'adiponectine. On ne peut toutefois pas parler d'une étude sur l'effet isolé de l'hyperglycémie puisqu'il est possible qu'une fraction significative des patients ait été aussi hyperinsulinémique. Aucune étude faite jusqu'à maintenant n'a approfondi l'effet aigu de l'hyperglycémie ainsi que l'effet simultané de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie sur la concentration plasmatique de l'adiponectine.

Donc, à ce jour, aucune étude *in vivo*, ni chez l'animal, ni chez l'homme, n'a évalué l'effet de l'hyperinsulinémie et de l'hyperglycémie sur l'expression du gène de l'adiponectine, le gène apM1. Pour ce qui est de la concentration plasmatique, aucune étude ne s'est penchée sur l'effet de ces stimuli *in vivo* chez l'animal. Toutefois, chez l'homme, quelques études démontrent que l'hyperinsulinémie diminue la concentration plasmatique d'adiponectine. L'hyperglycémie chronique, pour sa part, est sans effet chez le sujet diabétique. Aucune étude ne s'est penchée sur l'effet de l'hyperglycémie isolée chez le sujet sain.

Sommaire

Les seules données disponibles sur la régulation de l'expression du gène apM1 par l'hyperinsulinémie proviennent d'études réalisées *in vitro* et rapportent des résultats discordants. À ce jour, aucune étude ne s'est penchée sur la régulation de ce gène par l'hyperglycémie.

La concentration plasmatique de l'adiponectine, selon les études réalisées jusqu'à maintenant, semble être abaissée par l'hyperinsulinémie et ne pas être influencée par l'hyperglycémie.

3.3 Régulation de l'expression génique et de la concentration plasmatique de l'ASP par l'insuline et/ou le glucose

La concentration plasmatique d'ASP est augmentée en présence d'obésité et de diabète de type 2, deux conditions fréquemment associées à l'insulinorésistance. Cette association suggère que l'insuline et le glucose pourraient jouer un rôle dans la régulation du métabolisme de l'ASP. Toutefois, à ce jour, très peu d'études ont approfondi les paramètres de régulation pour cette hormone.

Expression génique

Koistinen et coll. (27) ont réalisé des clamps hyperinsulinémiques euglycémiques de quatre heures chez neuf hommes normaux (IMC de 23,2 kg/m², âge de 59 ± 2 ans). Aucune stimulation de l'expression génique de la protéine C3, le précurseur de l'ASP, dans le tissu adipeux n'a été observée.

Concentration plasmatique

Maslowska et coll. (52) ont mis des adipocytes différenciés humains en présence de différents composés plasmatiques, dont le glucose et l'insuline, afin d'étudier leurs effets sur la production d'ASP. Les adipocytes ont été exposés à des concentrations de glucose variant de 5 mmol/L à 55 mmol/L ainsi qu'à des concentrations d'insuline s'échelonnant de 0 à 100 mU/mL. La quantité d'ASP produite sous les différentes concentrations de glucose n'a pas varié. Toutefois la production d'ASP a augmenté proportionnellement à la concentration d'insuline jusqu'à atteindre le double de la production basale avec une concentration de 50 mU/mL ($p < 0,01$) (figure 12).

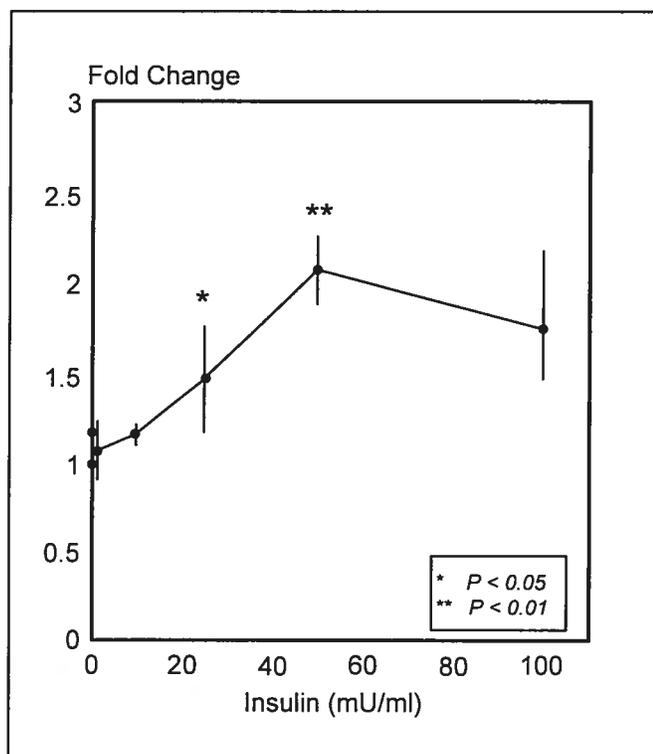


Figure 12 Effet dose-dépendant de l'insuline sur la production d'ASP par des adipocytes humains différenciés

(52)

Sommaire

La seule étude réalisée jusqu'à maintenant sur la régulation de l'expression génique des précurseurs de l'ASP par l'insuline indique que celle-ci n'a pas d'effet. Aucune étude n'a été faite sur la régulation par le glucose. La concentration d'ASP, dosée *in vitro*, semble augmenter sous l'effet de l'insuline et ne pas être influencée par le glucose. Aucune étude sur la régulation de la concentration plasmatique *in vivo* n'est disponible. Il est évident que, pour l'instant, les études sont nettement insuffisantes pour qu'il soit possible de formuler une conclusion.

Tableau I État des connaissances sur la régulation de l'expression génique et de la concentration plasmatique de la leptine, de l'adiponectine et de l'ASP

	Hyperinsulinémie			Hyperglycémie			Combinaison		
	Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>
Leptine									
Expression génique	?	↑ (48;54;64)	↑ (49;102) (51)	?	↑ (54)	?	?	?	↑ (53;54)
Concentration	↑ (46;50) ≠ (49;101) (47;103)	?	↑ (49;51)	?	?	?	↑ (45;46;49) ≠ (101)	?	↑ (53)
Adiponectine									
Expression génique	?	?	↓ (44) ↑ (43)	?	?	?	?	?	?
Concentration	↓ (25;41)	?	?	≠ (42)	?	?	?	?	?
ASP									
Expression génique	≠ (27)	?	?	?	?	?	?	?	?
Concentration	?	?	↑ (52)	?	?	≠ (52)	?	?	?

? : Non étudié ↑ : Augmentation

≠ : Pas d'effet ↓ : Diminution

CHAPITRE 4

OBJECTIF DE L'ÉTUDE

Dans les situations physiologiques et pathologiques, les niveaux de glucose et d'insuline sont interreliés, de telle sorte qu'il est difficile d'étudier leurs effets indépendants *in vivo*.

Cette étude a donc pour objectif d'étudier, chez des sujets sains, les effets d'une hyperglycémie isolée et d'une hyperglycémie en combinaison avec une hyperinsulinémie sur l'expression de gènes dans le tissu adipeux, et sur la concentration plasmatique de trois hormones du tissu adipeux (adipokines) ayant des rôles importants à jouer dans le métabolisme glucido-lipidique et énergétique : la leptine, l'adiponectine et l'ASP. Cette étude permet de vérifier des données, soit jamais observées ou observées, de façon fragmentaire, *in vitro*, chez l'animal et chez l'humain.

Cette étude s'intègre dans un projet plus large visant à étudier la régulation de l'ensemble du génome (28 000 gènes) dans les tissus musculaires et adipeux par l'insuline et le glucose.

CHAPITRE 5

HYPOTHÈSES

En nous basant sur les recherches publiées concernant la régulation de l'expression génique et de la concentration plasmatique de la leptine, de l'adiponectine et de l'ASP par le glucose, nous émettons les hypothèses suivantes :

1. Une hyperglycémie isolée de trois heures, chez des hommes sains, augmentera l'expression génique et la concentration plasmatique de la leptine et n'aura aucune influence ni sur l'expression génique ni sur la concentration plasmatique de l'adiponectine et de l'ASP.
2. La combinaison d'une hyperglycémie et d'une hyperinsulinémie de trois heures, chez des hommes sains, augmentera l'expression du gène et la concentration plasmatique de la leptine, diminuera l'expression génique et la concentration plasmatique de l'adiponectine et n'aura aucune influence sur l'expression génique des précurseurs de l'ASP, mais augmentera la concentration plasmatique d'ASP.

CHAPITRE 6

MÉTHODOLOGIE

6.1 Sujets

Seize hommes caucasiens en santé ont participé à l'étude, soit au clamp normoinsulinémique hyperglycémique, soit au clamp hyperinsulinémique hyperglycémique ou aux deux. Un sujet du groupe normoinsulinémique hyperglycémique n'a pu être exploité pour les analyses en raison d'un volume insuffisant de tissu adipeux recueilli lors du clamp. Les sept sujets du groupe normoinsulinémique hyperglycémique avaient un âge moyen de 22 ± 1 ans et un IMC de 22 ± 1 kg/m². Les huit sujets du groupe hyperinsulinémique hyperglycémique avaient pour leur part un âge moyen de 23 ± 1 ans et un IMC de 23 ± 1 kg/m² (tableau II). Aucun sujet ne présentait d'histoire familiale ou personnelle de diabète, d'obésité, de dyslipidémie ou d'hypertension, au premier ou au deuxième degré. Aucun sujet ne prenait de médicament, ni ne pratiquait d'activité physique régulière (plus de trois heures par semaine). Tous les sujets ont passé un examen médical et des tests biologiques de routine avant d'être inclus dans l'étude. Cinq des seize sujets ont participé aux deux types de clamp; une période d'au moins deux mois s'est écoulée entre les deux. La veille de l'étude, tous les sujets ont mangé un repas standardisé contenant un minimum de 60 grammes de glucides. Aucun sujet n'a effectué d'activité physique intense au cours des 48 heures précédant l'étude et tous sont venus, le matin du test, en déployant un minimum d'effort physique. Tous les sujets ont rempli un formulaire de consentement après avoir été avisés de la nature, de l'objectif et des risques possibles liés à la participation à l'étude. Le protocole expérimental a été approuvé par le comité d'éthique de l'Université de Montréal.

Tableau II Caractéristiques des sujets

Caractéristiques	Clamp normoinsulinémique hyperglycémique	Clamp hyperinsulinémique hyperglycémique	Valeur p
Nombre de sujets	7	8	-
Âge (années)	22 ± 1	23 ± 3	NS
Poids (kg)	65,9 ± 5,2	70,4 ± 6,9	NS
Taille (m)	1,73 ± 0,03	1,74 ± 0,07	NS
IMC (kg/m ²)	22 ± 1	23 ± 1	NS

6.2 Procédures expérimentales

Technique du clamp

Tous les sujets étaient à jeun depuis 22 heures, la veille du test. Les volontaires ont été soumis, dans un ordre aléatoire, soit au clamp normoinsulinémique hyperglycémique, soit au clamp hyperinsulinémique hyperglycémique. Le technique de clamp hyperglycémique décrite par DeFronzo et coll. (104) a été modifiée pour réaliser les clamps normoinsulinémiques hyperglycémiques et hyperinsulinémiques hyperglycémiques. Les clamps duraient trois heures. Toutes les substances subséquemment décrites ont été infusées dans les veines de l'avant-bras droit des sujets à l'aide de pompes Harvard pour seringues (Harvard Apparatus, Ville Saint-Laurent, Québec, Canada).

Le but des clamps était d'élever la glycémie de 5,4 mmol/L au-dessus de la glycémie à jeun (la moyenne de trois glycémies obtenues sur une période de 15 minutes) (105). Cette procédure permet, chez le sujet sain, de ne pas dépasser une glycémie de 12 mmol/L, qui est habituellement le seuil d'élimination rénale du glucose. Pour élever la glycémie, du dextrose 20 % a été infusé en deux phases : 1) un bolus pour

atteindre la valeur de glycémie cible et 2) une dose de maintien ajustée en fonction de la glycémie mesurée toutes les 5 ou 10 minutes. La glycémie a été mesurée à l'aide de l'analyseur de glucose Beckman Coulter (Beckman Coulter Inc., Ville Saint-Laurent, Québec, Canada).

Dans le but de créer des conditions soit de normoinsulinémie (clamp normoinsulinémique hyperglycémique) ou d'hyperinsulinémie (clamp hyperinsulinémique hyperglycémique), la sécrétion endogène d'insuline a été inhibée par un analogue de la somatostatine (Sandostatin^{MD}, Novartis Pharma inc., Dorval, Québec, Canada). Le Sandostatin^{MD} a été infusé en deux phases : 1) un bolus de 25 µg (dose fixe) sur une période de 1 minute, 5 minutes avant le bolus de glucose et 2) une dose de maintien de 1,0 µg/min pendant toute la durée du clamp. Le bolus d'infusion de Sandostatin^{MD} vingt-cinq fois plus élevé que la dose de maintien assurait, de façon plus certaine, l'inhibition de la sécrétion endogène d'insuline, en particulier dans un contexte d'hyperglycémie. Ce protocole d'infusion pour le Sandostatin^{MD} a déjà été décrit par Giugliano et coll. (94).

L'insulinémie était ajustée, par une infusion d'insuline exogène, débutée en même temps que l'infusion de glucose. L'insuline infusée était de l'insuline humaine régulière (Novo-Nordisk) à laquelle a été ajoutée de l'albumine du sujet de façon à limiter l'adhésion aux parois. Cette infusion a été maintenue, soit à une valeur de base pour le clamp normoinsulinémique hyperglycémique (infusion constante d'insuline exogène à un taux de 3,45 mU/(m² · min)), soit à une valeur supra-physiologique pour le clamp hyperinsulinémique hyperglycémique (infusion constante d'insuline exogène à un taux de 75 mU/(m² · min)). La dose de 75 mU/(m² · min) est une dose fréquemment administrée dans les clamps hyperinsulinémiques euglycémiques servant à mesurer la sensibilité à l'insuline. Dans les deux types de clamps, du phosphate de potassium a été ajouté au dextrose 20 % de manière à contrecarrer l'effet hypokaliémiant de l'insuline. Cette infusion de phosphate de potassium est essentielle, chez l'humain, pour prévenir l'hypokaliémie associée à des troubles du rythme cardiaque.

Les échantillons de sang nécessaires pour le dosage de la glycémie et les dosages hormonaux ont été prélevés tout au long du clamp. Les échantillons nécessaires aux dosages de la glycémie ont été prélevés à chaque 10 minutes. Ceux nécessaires aux dosages hormonaux ont été prélevés aux temps suivants : - 60, - 55, - 50, + 30, + 60, + 120, + 150, + 160, + 170, + 180 minutes. La quantité de sang totale prélevée à chaque sujet était de 85 mL. Un repas riche en glucides était servi au sujet à la fin de l'expérimentation.

Biopsie de tissu adipeux

Trente minutes avant de commencer le clamp, puis à la fin, un échantillon de tissu adipeux sous-cutané a été prélevé au niveau péri-ombilical à l'aide d'une seringue, tel que décrit antérieurement (106). La quantité prélevée a varié de 500 mg à 700 mg selon le sujet (données non présentées). Les deux échantillons ont été prélevés aux régions opposées de l'ombilic. Après avoir désinfecté la peau, une anesthésie locale par Xylocaïne (20 mg/ml, 2 %, Astra-Zeneca Mississauga, Ontario) a été réalisée. Cinq minutes après l'anesthésie, un échantillon de tissu adipeux a été prélevé à l'aide d'une aiguille de large diamètre (2,1 x 38 mm, Kendall Monoject Tyco Healthcare, Mansfield, MA, EU) reliée à une seringue (20 mL) dans laquelle une dépression a été faite manuellement. Le prélèvement était ensuite filtré et lavé, en moins d'une minute, avec du sérum physiologique préalablement chauffé à 37°C, puis immédiatement congelé dans de l'azote liquide à -180°C. Les infusions d'insuline et de Sandostatin^{MD} ont été maintenues constantes pendant la biopsie finale. L'infusion de glucose a été adaptée pour maintenir la glycémie constante. Enfin, les tissus ont été entreposés à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ARN messager (ARNm). La séquence des événements de l'expérimentation est illustrée à la figure 13.

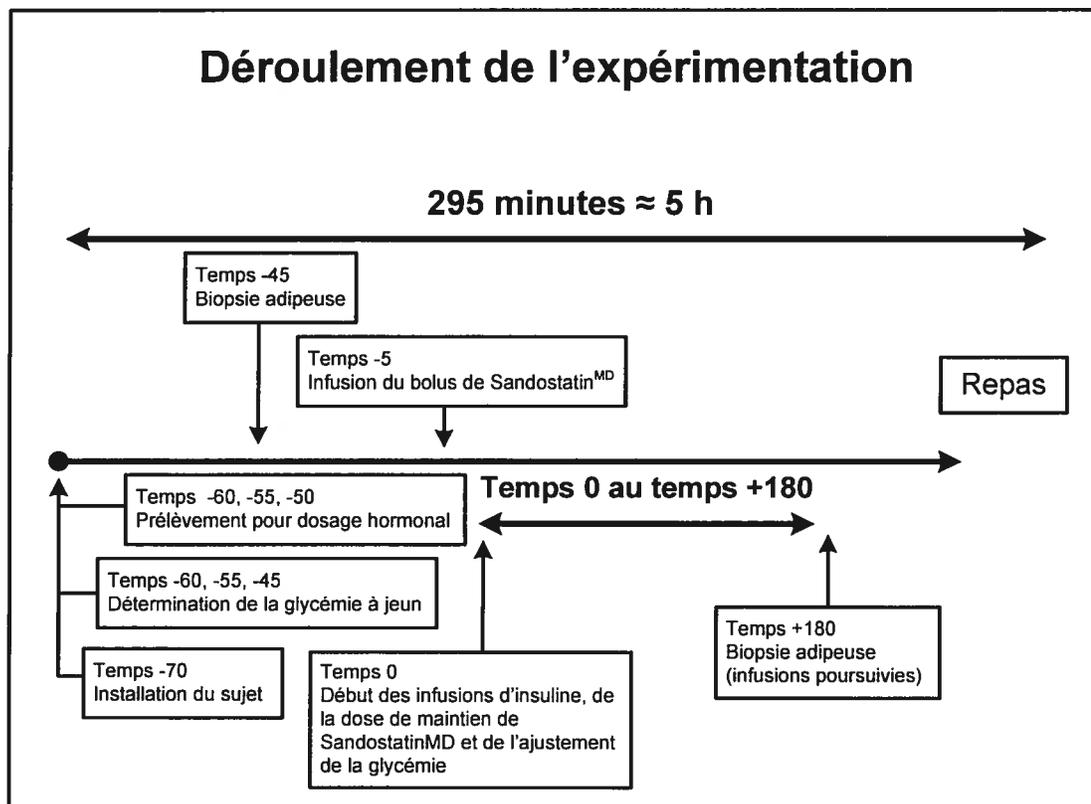


Figure 13 Déroulement de l'expérimentation

6.3 Analyses de laboratoire

Préparation de l'ARN et de l'ADNc

Le tissu adipeux congelé a été homogénéisé dans 2 mL d'ARN STAT-60 (Tel-Test, Friendswood, TX) et l'ARN total a été isolé selon les instructions du fabricant. Après le traitement à l'ADNase (ensemble d'ADNase, sans ARNase, Qiagen, Hilden, Allemagne), l'ARN a été purifié à l'aide de l'ensemble Mini Kit RNeasy (Qiagen). Les concentrations d'ARN ont été mesurées par la coloration à l'acides nucléiques fluorescente RiboGreen (ensemble à quantification d'ARN; Molecular Probes, Eugene, OR). La qualité de l'ARN a été évaluée par un gel d'électrophorèse d'agarose. La quantité d'ARN utilisée pour l'analyse était de 250 ng par échantillon. L'ARN isolé a été entreposé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à la quantification des ARNm cibles. La

transcriptase inverse (Life Technologies, Paisley, UK) et l'amorce oligo (dT)₁₂₋₁₈ étaient utilisées pour transcrire 0,1 µg d'ARN en ADNc (ADN complémentaire).

Quantification de l'expression des gènes de l'HPRT, de l'adiponectine, de la leptine et de l'ASP

La PCR (polymerase chain reaction) en temps réel (technologie LightCycler, Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) a été utilisée pour quantifier les ARNm. À 2 µL d'ADNc dilué 1 : 60, 3 mmol/L MgCl₂ (concentration finale), 2 µL de LightCycler-FastStart DNA SYBR Green I Mix (Roche Diagnostics) et 10 pmol d'amorces étaient ajoutés pour atteindre un volume final de 20 µL. Après l'activation initiale de l'ADN polymérase à 95 °C pour 10 minutes, les conditions d'amplification étaient les suivantes : 40 cycles incluant 10 secondes de dénaturation à 95°C, 5 secondes d'hybridation à 58°C (HPRT, adiponectine et ASP) ou 60°C (leptine) et 15 secondes d'extension à 72°C. Les valeurs de fluorescence ont été obtenues à la suite de chaque phase d'extension. Après l'amplification, l'analyse de la courbe de fusion (passage de 65 à 95°C avec une vitesse de 0,1°C/sec) permet de vérifier la spécificité de la réaction. Les amorces utilisées pour la leptine, l'adiponectine et l'ASP sont décrites au tableau III. Une courbe standard a été faite pour chaque dosage (150 à 15 000 molécules d'ADNc dans le capillaire de PCR) en réalisant une dilution en série d'un plasmide dans lequel a été cloné un fragment d'ADNc du gène d'intérêt. Tous les échantillons ont été testés en duplicata. La valeur moyenne a été retenue, sauf lorsque la différence entre les deux valeurs présentaient plus de 50 % d'écart. Dans ce dernier cas, les analyses étaient refaites. Pour normaliser les données, les concentrations d'ARNm de leptine, d'adiponectine et d'ASP ont été exprimées relativement à la concentration d'ARNm du gène humain HPRT (Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase) dont l'expression est stable. La concentration d'ARNm d'HPRT n'était pas différente d'un groupe à l'autre (données non présentées).

Tableau III Amorces utilisées pour la quantification de l'expression génétique

<p>Leptine AntiSens : 5' TGC-CAG-TGT-CTG-GTC-CAT-CTT-G 3'</p> <p>Leptine Sens : 5' CAC-CAG-GAT-CAA-TGA-CAT-TTC 3'</p>
<p>Adiponectine AntiSens : 5' CTT-CTC-CAG-GTT-CTC-CTT-TCC-TGC 3'</p> <p>Adiponectine Sens : 5' AGG-CCG-TGA-TGG-CAG-AGA-TG 3'</p>
<p>ASP AntiSens : 5' GGC-TCT-TTC-AAG-TCC-TCA-AC 3'</p> <p>ASP Sens : 5' GGA-TGA-GGA-CAT-CAT-TGC-AG 3'</p>
<p>HPRT AntiSens : 5' AGT-TGA-GAG-ATC-ATC-TCC-AC 3'</p> <p>HPRT Sens: 5' TTG-CTG-ACC-TGC-TGG-ATT-AC 3'</p>

Dosage plasmatique des hormones

Les niveaux sériques d'adiponectine et de leptine (Linco Research, St-Charles, MO, EU) ont été dosés en duplicata à l'aide d'un procédé de dosage radio-immunologique (RIA) commercial. De la leptine et de l'adiponectine humaines marquées à l'iode-125 ont été utilisées comme traceurs. Pour déterminer la quantité d'hormones, un anticorps polyclonal de lapin contre les peptides de pleine longueur a été utilisé. Le dosage plasmatique de l'ASP a été fait à l'aide d'un procédé maison d'ELISA sandwich déjà décrit (77).

6.4 Analyse statistique

Les données présentées sont les moyennes \pm les écart-types. Pour l'analyse des changements de concentrations plasmatiques de leptine, d'adiponectine et d'ASP, avant versus après le clamp, la moyenne des concentrations plasmatiques dosées aux temps - 55 et - 50 minutes, a été comparée à la moyenne des concentrations plasmatiques dosées aux temps + 170 et + 180 minutes. Pour l'analyse des changements de leur expression génique, la concentration d'ARNm avant le clamp, exprimée relativement au gène de référence HPRT, est comparée à celle à la fin du clamp. Le test t de Student pairé, unilatéral a été utilisé pour comparer les données. Le logiciel de statistique utilisé pour l'analyse des données est SigmaStat (Jandel, San Rafael, CA) avec un seuil de signification de $p < 0,05$.

CHAPITRE 7

RÉSULTATS

L'objectif de cette étude était de comprendre l'effet de l'hyperglycémie et de la combinaison de l'hyperinsulinémie et de l'hyperglycémie sur l'expression génique et la concentration plasmatique de trois hormones du tissu adipeux : la leptine, l'adiponectine et l'ASP. Pour ce faire, nous avons réalisé un clamp normoinsulinémique hyperglycémique et un clamp hyperinsulinémique hyperglycémique, de trois heures chacun, chez des hommes minces en santé.

7.1 Réalisation des expérimentations

Clamp normoinsulinémique hyperglycémique

Lors du clamp normoinsulinémique hyperglycémique, la glycémie moyenne à la fin des trois heures de clamp était de $9,8 \pm 1,2$ mmol/L, soit 4,7 mmol/L au-dessus de la glycémie à jeun (5,1 mmol/L). Le taux d'infusion de glucose nécessaire pour maintenir l'hyperglycémie, au cours des 30 dernières minutes, était de 4,96 mg/(kg · min). L'insulinémie à jeun était à $9,36 \pm 0,90$ μ U/ml. L'insulinémie moyenne, à la fin des trois heures de test, était de $15,52 \pm 4,02$ μ U/mL, soit significativement plus élevée que l'insulinémie à jeun ($p = 0,04$), quoique largement inférieure à la valeur obtenue lors du clamp hyperinsulinémique hyperglycémique (figure 14).

Clamp hyperinsulinémique hyperglycémique

Lors du clamp hyperinsulinémique hyperglycémique, la glycémie moyenne à la fin des trois heures de clamp était de $10,0 \pm 1,2$ mmol/L (différence non significative par rapport au clamp normoinsulinémique hyperglycémique), soit 4,8 mmol/L au-dessus de la glycémie à jeun (5,3 mmol/L; $p = ns$ vs clamp normoinsulinémique

hyperglycémique). L'insulinémie à jeun était à $9,04 \pm 2,91 \mu\text{U}/\text{mL}$ (différence non significative par rapport au clamp normoinsulinémique hyperglycémique). Le taux d'infusion de glucose pour maintenir l'hyperglycémie était de $20,31 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ au cours des 30 dernières minutes. L'insulinémie moyenne, à la fin des trois heures de test, était de $154,35 \pm 25,55 \mu\text{U}/\text{mL}$, soit 17 fois plus élevée que l'insulinémie basale ($p < 0,001$ par rapport au clamp normoinsulinémique hyperglycémique) (figure 15).

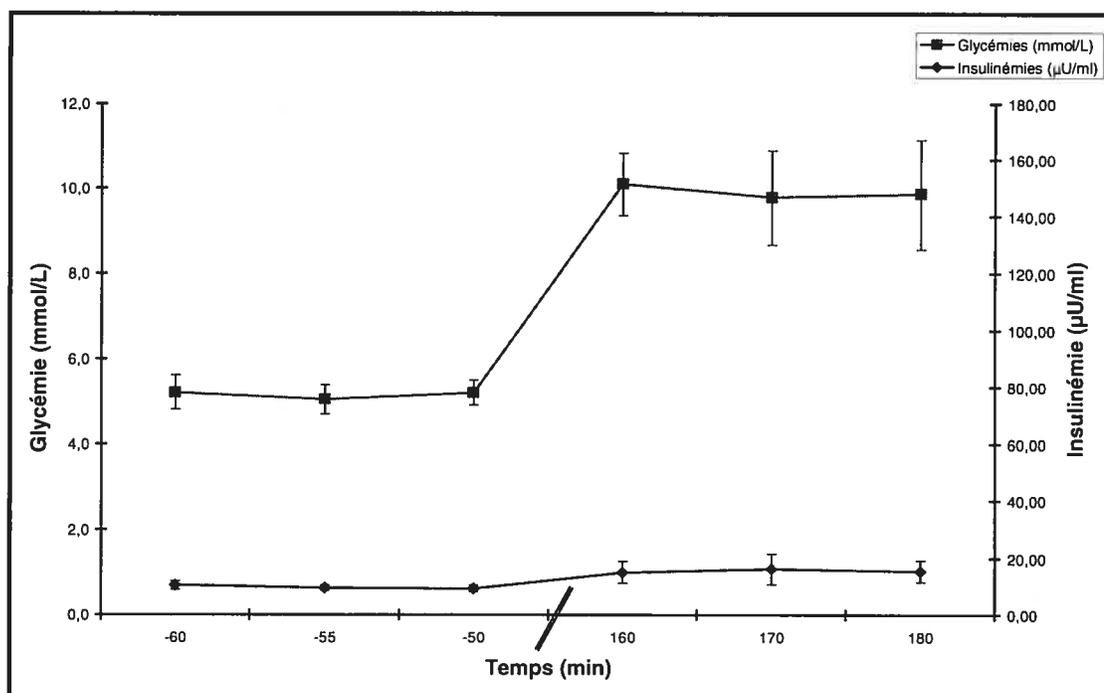


Figure 14 Glycémie et insulinémie obtenues au cours du clamp normoinsulinémique hyperglycémique

Moyennes \pm ET

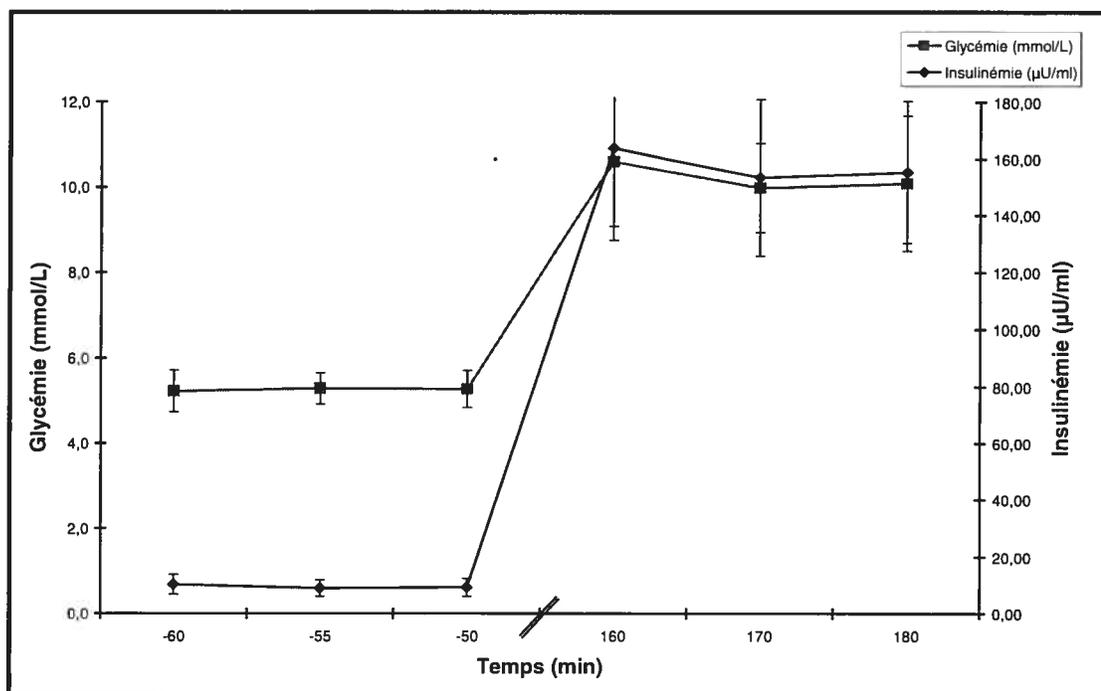


Figure 15 Glycémie et insulinémie obtenues au cours du clamp hyperinsulinémique hyperglycémique

Moyennes \pm ET

7.2 Expression génique et concentration plasmatique

Les valeurs d'expression génique sont présentées en unités arbitraires obtenues après normalisation de la concentration en fonction du niveau d'expression d'un gène de référence, le gène HPRT dont l'expression n'est pas influencée par les stimuli employés.

7.2.1 Leptine

Le clamp hyperglycémique seul n'a eu aucun effet sur la quantité d'ARNm du gène ob ($12,40 \pm 9,82$ versus $10,56 \pm 5,23$) du tissu adipeux sous-cutané des hommes sains qui ont participé à l'étude (tableau IV). Par contre, la concentration plasmatique de leptine a diminué significativement ($1,81 \pm 1,19$ ng/mL versus $1,52 \pm 1,28$ ng/mL; $p = 0,002$), soit de 20 %, au cours des trois heures de l'expérimentation (tableau IV et figure 16).

Lors du clamp hyperinsulinémique hyperglycémique, la quantité d'ARNm du gène ob a augmenté significativement de 130 % ($8,92 \pm 5,47$ versus $14,02 \pm 6,47$; $p = 0,004$) (tableau IV et figure 17), alors que la concentration plasmatique de leptine n'a pas changé ($2,44 \pm 0,78$ versus $2,52 \pm 0,73$ ng/mL) (tableau IV).

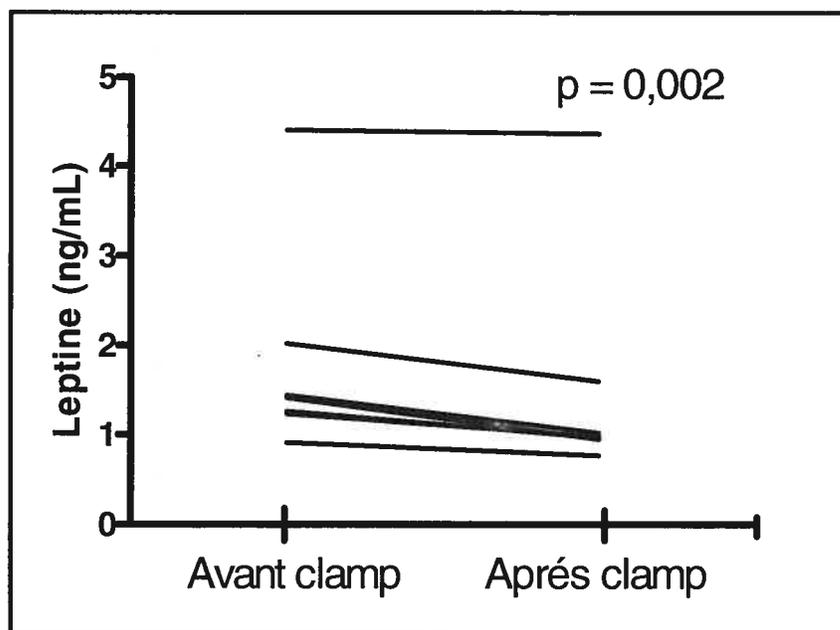


Figure 16 Concentration plasmatique de la leptine avant et après le clamp normoinsulinémique hyperglycémique

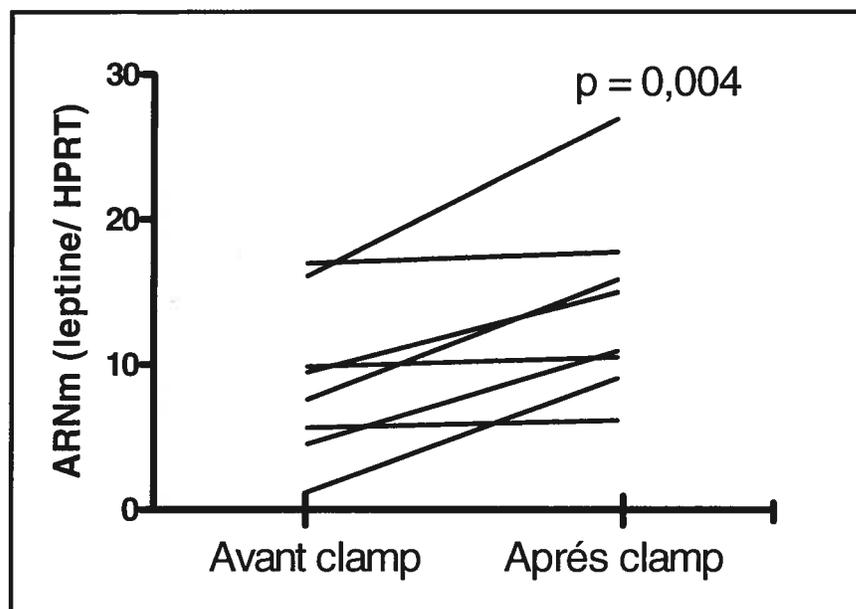


Figure 17 Expression relative du gène de la leptine par rapport au gène de référence (HPRT) avant et après le clamp hyperinsulinémique hyperglycémique

7.2.2 Adiponectine

Le clamp hyperglycémique seul n'a modifié ni l'expression du gène de l'adiponectine ($77,31 \pm 37,08$ versus $71,13 \pm 23,62$) dans le tissu adipeux sous-cutané (tableau IV) ni sa concentration plasmatique ($8,61 \mu\text{g/mL} \pm 2,18$ versus $8,46 \mu\text{g/mL} \pm 2,44$) (tableau IV).

Le clamp hyperinsulinémique hyperglycémique n'a eu aucun effet non plus sur l'expression du gène ($55,66 \pm 14,76$ versus $62,18 \pm 13,31$) (tableau IV), ni sur la concentration plasmatique de l'adiponectine ($8,52 \mu\text{g/mL} \pm 1,87$ versus $7,95 \mu\text{g/mL} \pm 2,06$) (tableau IV).

7.2.3 ASP

L'hyperglycémie seule n'a pas modifié l'expression du gène de la protéine C3 ($16,51 \pm 5,47$ versus $16,27 \pm 5,21$) (tableau IV), qui est un des précurseurs de l'ASP. Elle n'a

pas modifié non plus la concentration plasmatique de l'ASP elle-même ($29,58 \text{ ng/mL} \pm 6,96$ versus $29,18 \text{ ng/mL} \pm 6,48$) (tableau IV).

Par contre, la combinaison de l'hyperinsulinémie et de l'hyperglycémie a augmenté de 27 % l'expression du gène de la protéine C3 ($10,21 \pm 1,91$ versus $12,84 \pm 2,63$; $p = 0,006$) (tableau IV et figure 18) et de 21 % la concentration plasmatique de l'ASP ($29,98 \text{ ng/mL} \pm 5,71$ versus $35,56 \text{ ng/mL} \pm 7,08$; $p = 0,023$) (tableau IV et figure 19).

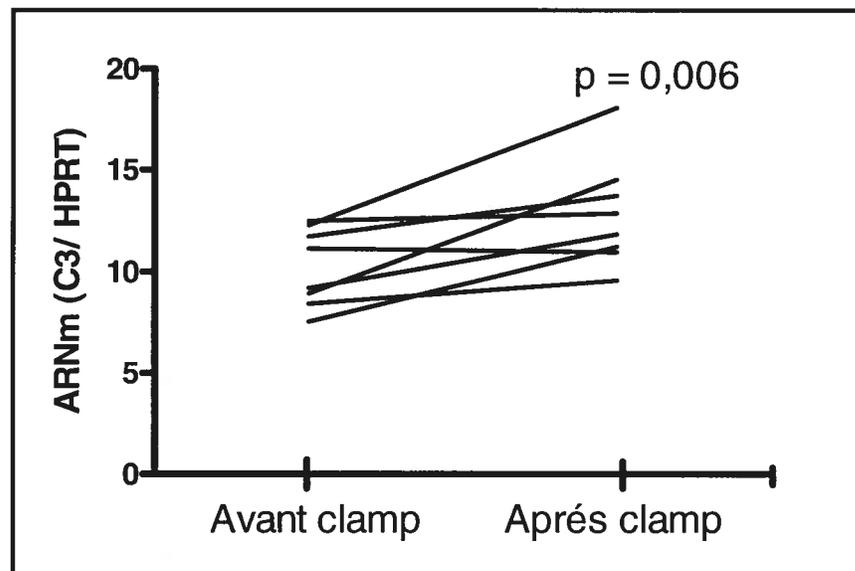


Figure 18 Expression relative du gène de la protéine C3 par rapport au gène de référence (HPRT) avant et après le clamp hyperinsulinémique hyperglycémique

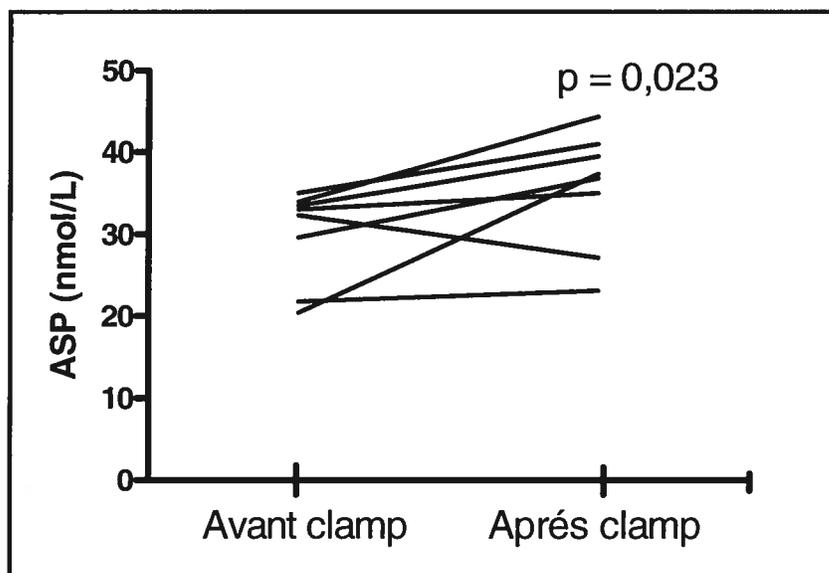


Figure 19 Concentration plasmatique de l'ASP avant et après le clamp hyperinsulinémique hyperglycémique

Tableau IV Sommaire de la régulation de l'expression génique et de la concentration plasmatique de la leptine, de l'adiponectine et de l'ASP en situation de normoinsulinémie-hyperglycémie et d'hyperinsulinémie-hyperglycémie

	Normoinsulinémie-hyperglycémie			Hyperinsulinémie-hyperglycémie		
	Basal	3 heures	Valeur p	Basal	3 heures	Valeur p
ARNm						
Leptine	12,40 ± 9,82	10,56 ± 5,23	0,183	8,92 ± 5,47	14,03 ± 6,47	0,004
Adiponectine	77,31 ± 37,08	71,13 ± 23,68	0,248	55,66 ± 14,76	62,18 ± 13,31	0,142
ASP	16,51 ± 5,47	16,27 ± 5,21	0,422	10,21 ± 1,91	12,84 ± 2,63	0,006
Concentration plasmatique						
Leptine (ng/mL)	1,81 ± 1,19	1,52 ± 1,28	0,002	2,44 ± 0,78	2,52 ± 0,73	0,248
Adiponectine (ug/mL)	8,61 ± 2,18	8,46 ± 2,44	0,318	8,52 ± 1,86	7,95 ± 2,06	0,072
ASP (nmol/L)	29,58 ± 6,96	29,18 ± 6,48	0,396	29,98 ± 5,71	35,56 ± 7,08	0,024

Moyennes ± ET

7.2.4 Sommaire

En somme, les résultats obtenus au cours de cette étude démontrent qu'une stimulation hyperglycémique isolée de trois heures chez des hommes sains ne modifie pas l'expression du gène, dans le tissu adipeux, de la leptine, de l'adiponectine, ni de la protéine C3 (précurseur de l'ASP). Les concentrations plasmatiques de l'adiponectine et de l'ASP n'ont pas non plus été modifiées au cours

de la stimulation. Par contre, la concentration plasmatique de leptine a diminué significativement.

La stimulation hyperinsulinémique hyperglycémique, pour sa part, a stimulé l'expression du gène de la leptine et de la protéine C3, mais n'a pas stimulé celle de l'adiponectine. L'augmentation de l'expression du gène de la leptine ne s'est pas traduite par une modification de sa concentration plasmatique. La concentration plasmatique de l'ASP a, pour sa part, augmenté alors que celle de l'adiponectine n'a pas bougé.

CHAPITRE 8

DISCUSSION

Compte tenu des implications de la leptine, de l'adiponectine et de l'ASP dans le métabolisme énergétique et lipidique, la compréhension de leur régulation génique et de leur concentration plasmatique, par l'insuline et le glucose, est d'un grand intérêt. En effet, la leptine est impliquée dans le contrôle de l'appétit et l'utilisation des substrats. L'adiponectine, pour sa part, favorise le catabolisme des lipides ainsi qu'un meilleur contrôle glycémique et pourrait jouer un rôle protecteur contre le développement des maladies cardiovasculaires. L'ASP, finalement, stimule la synthèse des triglycérides dans les adipocytes et, possiblement, la première phase de sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas. De plus des altérations de leur métabolisme ont été observés en présence d'obésité, d'insulinorésistance et de diabète de type 2, conditions fréquemment associées à de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie. Ces observations suggèrent que l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie pourraient altérer leur régulation. Il est donc important, en raison des implications métaboliques importantes de ces adipokines, de comprendre les effets de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie sur leur expression génique et sur leur concentration plasmatique.

8.1 Forces de l'étude

Cette étude est la première à se pencher sur la régulation des gènes de la leptine et de l'adiponectine par l'insuline et le glucose, *in vivo*, chez l'humain. Quant à l'ASP, la seule étude disponible, à ce jour, a approfondi la régulation du gène par l'insuline, mais pas par le glucose. Pour ce qui est de la régulation des concentrations plasmatiques de la leptine et de l'adiponectine, le nombre d'études réalisées est nettement insuffisant. En effet, les données sur la leptine sont contradictoires. En ce qui concerne l'adiponectine, seul l'effet de l'hyperglycémie chronique a été étudié chez le sujet diabétique. Finalement, en ce qui a trait à l'ASP, aucune étude de la

régulation de la concentration plasmatique par l'insuline et le glucose n'avait été menée chez l'humain. De plus, la réalisation des clamps chez des sujets normaux, comme il a été fait dans cette étude, élimine plusieurs caractéristiques métaboliques retrouvées chez des sujets malades qui peuvent être des facteurs confondants dans l'analyse des résultats (dyslipidémies, hyperglycémie chronique, etc.).

Cette étude est la première à analyser l'effet à la fois sur l'expression génique et sur la concentration plasmatique de ces stimuli. En effet, que ce soit pour l'une ou l'autre des trois hormones, aucune étude ne s'était penchée sur la régulation de ces deux paramètres en même temps. La méthodologie que nous avons utilisée pour étudier l'effet de l'hyperglycémie en combinaison ou pas avec l'hyperinsulinémie a permis de reproduire des conditions standardisées.

8.2 Limites de l'étude

Tous les objectifs de la méthodologie ont été atteints à l'exception de la concentration d'insuline au plateau du clamp normoinsulinémique hyperglycémique qui était légèrement mais significativement plus élevée que la valeur à jeun tout en restant dans des valeurs physiologiques. Deux scénarios peuvent expliquer cette élévation de la concentration d'insuline. Il est possible, tout d'abord, que la dose d'insuline à infuser pour maintenir l'insulinémie à un niveau basal ait été surestimée, ou alors, qu'il y ait eu un échappement de la sécrétion endogène d'insuline engendré par l'hyperglycémie importante que nous avons provoquée, et ce malgré la dose de Sandostatin^{MD} utilisée. Le dosage du peptide C, qui sera fait sous peu, permettra de savoir si cette élévation est effectivement due à l'échappement de la sécrétion endogène. Il est toutefois important de préciser qu'en aucun cas, le clamp normoinsulinémique hyperglycémique et le clamp hyperinsulinémique hyperglycémique n'ont eu le même effet, ni sur l'expression génique, ni sur la concentration plasmatique de l'une ou l'autre des hormones. Si tel avait été le cas, on aurait pu supposer que l'effet observé dans le cadre du clamp normoinsulinémique hyperglycémique avait été engendré par l'augmentation de l'insulinémie. Comme ce n'est pas le cas, on peut dire que la faible augmentation de l'insulinémie au cours du

clamp normoinsulinémique hyperglycémique ne constitue pas un biais dans l'analyse des résultats.

Pour standardiser l'insulinémie au cours des clamps normoinsulinémiques hyperglycémiques et hyperinsulinémiques hyperglycémiques, nous avons inhibé la sécrétion endogène d'insuline avec du Sandostatin^{MD} et nous l'avons remplacée par une infusion d'insuline. L'effet du Sandostatin^{MD} sur l'expression des gènes de l'adiponectine, de la protéine C3 et de la leptine ainsi que sur la concentration plasmatique de l'adiponectine et de l'ASP n'est pas connu. Or, un effet du Sandostatin^{MD} sur la concentration plasmatique de leptine a été constaté (107) (cf. infra). Il est donc possible qu'il ait eu un impact sur la nature de nos résultats. C'est pourquoi des clamps où du Sandostatin^{MD} uniquement est infusé aux sujets sont en cours de réalisation. Un effet confondant pourrait être relié soit à une action directe du Sandostatin^{MD}, soit à une action indirecte impliquant son effet inhibiteur sur la sécrétion du glucagon et de l'hormone de croissance (108). Pour des raisons de faisabilité et de coûts, nous n'avons pas procédé au remplacement de ces deux hormones dans les clamps normoinsulinémiques hyperglycémiques et hyperinsulinémiques hyperglycémiques. Les résultats obtenus permettront de dissocier les effets des stimuli des effets du Sandostatin^{MD} sur l'expression génique des trois hormones et sur les concentrations plasmatiques d'adiponectine et d'ASP.

Pour parfaire la compréhension du rôle du glucose et de l'insuline sur la régulation du métabolisme des trois hormones, un volet de clamps hyperinsulinémiques euglycémiques est en cours. Les résultats de ces clamps permettront de dissocier complètement les effets isolés de l'hyperglycémie, de l'hyperinsulinémie et de la combinaison des deux. Comme les résultats des clamps hyperinsulinémiques euglycémiques, de même que ceux avec infusion de Sandostatin^{MD} seul ne sont pas encore disponibles, l'analyse des résultats doit rester prudente et permet surtout de connaître l'effet additif de l'hyperinsulinémie en situation d'hyperglycémie.

En raison des procédures invasives et de l'inconfort associés à l'expérimentation, le nombre de sujets inclus dans l'étude ainsi que la durée de l'expérimentation furent restreints. Il est possible qu'avec un nombre de sujets plus important ou une période de stimulation plus longue, nous ayons obtenu des résultats différents. Il faut toutefois préciser que la durée et l'intensité des stimulations choisies correspondent déjà aux conditions extrêmes rencontrées dans des situations physiologiques ou pathologiques. Même si des clamps hyperglycémiques ou hyperinsulinémiques prolongés ont déjà été réalisés, la combinaison des deux sur plus de trois heures ou chez des patients cardiaques pourrait s'avérer dangereuse en raison du volume de liquide infusé.

8.3 Analyse des résultats

8.3.1 Leptine

Expression génique

Les résultats de cette étude indiquent que l'hyperglycémie seule ne modifie pas l'expression du gène de la leptine, le gène *ob*, alors que la combinaison de l'hyperglycémie avec l'hyperinsulinémie l'augmente (tableau V). Les résultats obtenus avec la combinaison concordent avec ceux retrouvés chez l'animal et *in vitro*. L'effet du glucose seul était, jusqu'alors, inconnu. Nos résultats suggèrent donc que l'hyperinsulinémie stimule l'expression du gène de la leptine.

Concentration plasmatique

La concentration plasmatique de leptine a diminué au cours du clamp normoinsulinémique hyperglycémique (tableau V). Aucune autre étude ne permet d'approfondir l'effet du glucose. Il est possible que cette diminution soit attribuable à l'infusion de Sandostatin^{MD}, qui a déjà été associé à une baisse de la concentration de leptine. Donahoo et coll. ont infusé de la somatostatine (120 ng/(kg · min)), de l'insuline (0,07 mU/(kg · min)) et de l'hormone de croissance (3 ng/(kg · min)) à cinq sujets normaux (IMC de $24 \pm 0,8$ kg/m², âge de 32 ± 2 ans) et ce, pendant quatre heures. Cette infusion s'est traduite par une diminution de la concentration plasmatique de leptine de 23 % ($p = 0,05$) (107). Les clamps où du Sandostatin^{MD}

uniquement est infusé aux sujets, qui sont en cours de réalisation, nous permettront de savoir si, oui ou non, il est responsable de la diminution de la concentration plasmatique de leptine observée dans nos expérimentations.

Au cours du clamp hyperinsulinémique hyperglycémique, la concentration plasmatique de leptine est restée inchangée (tableau V). La majorité des autres études réalisées sur le sujet démontrent que la combinaison hyperinsulinémie-hyperglycémie augmente la concentration plasmatique de leptine (46;49). Il est possible que la combinaison glucose et insuline augmente la concentration plasmatique de leptine, comme le mentionnent Sonnenberg et coll. (45) et Kolaczynski et coll. (49), mais que l'effet ait été contrecarré par le Sandostatine^{MD} infusé pour inhiber la production endogène d'insuline. Comme la concentration plasmatique de leptine n'a pas changé, le Sandostatine^{MD} pourrait avoir annulé l'effet des stimuli. De plus, les clamps réalisés par Sonnenberg et coll. (45) et Kolaczynski et coll. (49) avaient une durée respective de 16 heures et de 72 heures. Il est donc possible que la durée de nos clamps (trois heures) ait été insuffisante pour engendrer une modification de la concentration plasmatique de leptine.

8.3.2 Adiponectine

Expression génique

Les résultats de notre étude indiquent que l'hyperglycémie isolée ainsi que la combinaison de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie n'ont eu aucun effet sur l'expression du gène de l'adiponectine dans le tissu adipeux sous-cutané (tableau VI). Aucune étude *in vivo* n'avait été réalisée jusqu'à maintenant sur la régulation du gène apM1 par ces stimuli. Les résultats obtenus lors d'études *in vitro* sur l'effet de l'insuline seule étaient contradictoires. En effet, Halleux et coll. (43) ont observé un effet stimulant de l'insuline sur l'expression du gène apM1, alors que Fasshauer et coll. (44), ont noté un effet inhibiteur dose-dépendant.

Il est intéressant de préciser que, chez des sujets non diabétiques présentant un surpoids, le gène de l'adiponectine est hautement exprimé dans le tissu sous-cutané abdominal et glutéo-fémoral, alors qu'il l'est peu dans le tissu adipeux viscéral. Ces résultats illustrent les distinctions importantes entre les différents dépôts adipeux quant à l'expression du gène de l'adiponectine (109).

Concentration plasmatique

Les clamps normoinsulinémiques hyperglycémiques et hyperinsulinémiques hyperglycémiques n'ont pas non plus affecté la concentration plasmatique de l'adiponectine (tableau VI). Notre étude est la première étude d'intervention qui approfondit l'effet de l'hyperglycémie et de la combinaison de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie. La seule autre étude disponible a analysé l'effet de l'hyperglycémie chronique et n'a rapporté aucun effet, ce qui concorde avec nos résultats (42). Deux études (25;41) ont démontré, chez des sujets sains, que l'hyperinsulinémie isolée diminuait la concentration plasmatique d'adiponectine. Ces données ne concordent pas avec nos résultats. En effet, l'hyperinsulinémie n'a engendré aucun effet lorsqu'elle a été combinée avec l'hyperglycémie. Ces résultats discordants pourraient s'expliquer par la durée de la stimulation qui était plus longue dans ces deux études que dans la nôtre. De plus, il a récemment été rapporté dans la littérature que l'adiponectine existe sous plusieurs formes : monomères, trimères, hexamères et agrégats de hauts poids moléculaires. Une concentration élevée d'hexamères serait associée à un profil métabolique favorable alors qu'une concentration élevée de trimères serait associée à un profil métabolique défavorable (109). Le dosage radio-immunologique (RIA) utilisé dans notre étude reconnaît à la fois les trimères et les hexamères. Il n'est pas précisé, dans aucune des deux études précédemment mentionnées, quelles isoformes de l'adiponectine ont été dosées. L'obtention de résultats différents pourrait donc possiblement s'expliquer par le dosage de différentes isoformes.

Selon nos résultats, la diminution de l'adiponectinémie observée chez les obèses, les insulinorésistants et les patients diabétiques de type 2 ne serait donc pas secondaire aux perturbations de la glycémie et de l'insulinémie associées à ces pathologies.

8.3.3 ASP

Expression génique

Nos résultats n'ont pas révélé d'effet de l'hyperglycémie sur l'expression du gène de la protéine C3, mais ont indiqué une augmentation significative de 27 % avec la combinaison de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie (tableau VII). La seule autre étude réalisée sur le sujet, s'était penchée sur l'effet isolé de l'insuline et n'avait pas observé d'effet (27). Ces résultats suggèrent que la combinaison des deux stimuli est nécessaire pour augmenter l'expression génique de la protéine C3.

Concentration plasmatique

Pour la concentration plasmatique, les résultats sont similaires à ceux observés en ce qui concerne l'expression génique. En effet, l'hyperglycémie seule n'a pas eu d'effet sur la concentration sérique d'ASP, alors que la combinaison de l'hyperglycémie avec l'hyperinsulinémie s'est traduite par une augmentation significative de 21 % (tableau VII).

L'absence d'effet de l'hyperglycémie observé dans notre étude concorde avec les données *in vitro* retrouvées dans la littérature (52). L'effet de la combinaison pourrait en fait être lié à l'hyperinsulinémie. En effet, il a été observé, *in vitro*, que l'insuline augmente la concentration d'ASP dans le milieu (52). Néanmoins, la dose d'insuline utilisée dans cette expérience est largement supra-physiologique, de l'ordre de dix fois supérieure à celle utilisée dans notre étude. Il est donc impossible de conclure avant d'obtenir les résultats portant sur l'effet isolé d'une hyperinsulinémie *in vivo* (tableau VII).

Tableau V Comparaison des résultats obtenus avec les données de la littérature quant à l'expression génique et à la concentration plasmatique de la leptine

		Leptine											
		Hyperinsulinémie			Hyperglycémie			Combinaison					
Revue de la littérature		Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>
			Expression génique	?	↑	↑	?	↑	?	?	?	?	?
	Concentration	↑	?	↑	?	?	?	↑	?	?	↑	?	↑
Résultats obtenus		Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>
		ND			≠			↑ 130 %					
	Concentration	ND			↓ 20 %			≠			≠		

↑ : Augmentation ≠ : Pas d'effet ND : Données pas encore disponibles

↓ : Diminution ? : Non étudié

Tableau VI Comparaison des résultats obtenus avec les données de la littérature quant à l'expression génique et à la concentration plasmatique de l'adiponectine

Adiponectine											
		Hyperinsulinémie			Hyperglycémie			Combinaison			
		Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>	
Revue de la littérature	Expression génique	?	?	↑ ↓	?	?	?	?	?	?	?
	Concentration	↓	?	?	≠	?	?	?	?	?	?
Résultats obtenus	Expression génique	ND						≠			
	Concentration	ND						≠			

↑ : Augmentation ≠ : Pas d'effet ND : Données pas encore disponibles

↓ : Diminution ? : Non étudié

Tableau VII Comparaison des résultats obtenus avec les données de la littérature quant à l'expression génique et à la concentration plasmatique de l'ASP

		ASP											
		Hyperinsulinémie			Hyperglycémie			Combinaison					
Revue de la Littérature		Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>
			Expression génique	≠	?	?	?	?	?	?	?	?	?
	Concentration	?	?	↑	?	?	≠	?	?	?	?	?	?
Résultats obtenus		Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>	Humain	Animal	<i>In vitro</i>
		Expression génique	ND			≠						↑ 27 %	
	Concentration	ND			≠						↑ 21 %		

↑ : Augmentation ≠ : Pas d'effet ND : Données pas encore disponibles

↓ : Diminution ? : Non étudié

CONCLUSION

Plusieurs études ont suggéré que le métabolisme de trois hormones du tissu adipeux : la leptine, l'adiponectine et l'ASP, était altéré en présence d'obésité, d'insulinorésistance et de diabète de type 2. La présente étude avait donc pour objectif d'explorer le rôle de caractéristiques métaboliques fréquemment rencontrées dans ces situations pathologiques, l'hyperglycémie et la combinaison hyperinsulinémie-hyperglycémie, sur la régulation de ces trois hormones chez des hommes sains. Ce sujet était, jusqu'alors, peu documenté *in vivo*.

L'hyperglycémie isolée n'a pas modifié l'expression du gène de la leptine, de l'adiponectine, ni de la protéine C3 (précurseur de l'ASP). Les concentrations plasmatiques d'adiponectine et d'ASP n'ont pas non plus varié au cours de la stimulation. Par contre, celle de la leptine a diminué significativement. La combinaison de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie a stimulé l'expression du gène de la leptine et de la protéine C3, mais n'a pas stimulé celle de l'adiponectine. Les concentrations plasmatiques de leptine et d'adiponectine n'ont pas changé, celle de l'ASP a augmenté.

Ces résultats suggèrent que l'augmentation de concentration de la leptine observée en présence d'obésité, d'insulinorésistance et de diabète de type 2 pourrait s'expliquer, de moins en partie, par une stimulation de l'expression du gène ob par l'hyperinsulinémie fréquente dans ces situations. Cette stimulation du gène ob ne se répercute pas sur la concentration plasmatique. Cela pourrait être secondaire à l'effet répresseur du Sandostatin^{MD}. Les résultats obtenus suggèrent de plus que la diminution de l'adiponectinémie observée dans ces situations pathologiques ne serait pas secondaire aux perturbations de la glycémie et de l'insulinémie qui leur sont associées. Finalement, l'augmentation de l'expression génique et de la concentration de l'ASP dans ces mêmes situations s'expliquerait, du moins en partie, par la combinaison hyperinsulinémie et hyperglycémie ou par l'hyperinsulinémie isolée. Lorsque les résultats du volet de l'étude comprenant les clamps hyperinsulinémiques

isolés seront disponibles, il sera possible de distinguer les effets de la combinaison hyperinsulinémie et hyperglycémie de l'effet de l'hyperinsulinémie à cet égard. Quoique cette étude génère quelques hypothèses quant à la régulation de ces hormones en situation pathologique, elle nous permet surtout de préciser leur régulation chez le sujet sain. Il serait toutefois, intéressant de vérifier nos observations chez des sujets souffrant de diabète de type 2 et d'obésité.

La présente étude n'est qu'un volet d'un projet plus large qui permettra de connaître l'effet de l'hyperinsulinémie, de l'hyperglycémie et de la combinaison de ces deux stimuli sur 28 000 gènes exprimés à la fois dans le tissu adipeux et dans les muscles squelettiques.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K et al. Globular Adiponectin Protected ob/ob Mice from Diabetes and ApoE-deficient Mice from Atherosclerosis. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 278:2461-2468.
- (2) Korner J, Aronne LJ. The emerging science of body weight regulation and its impact on obesity treatment. *J Clin Invest* 2003; 111:565-570.
- (3) Lonnqvist F, Nordfors L, Jansson M, Thorne A, Schalling M, Arner P. Leptin secretion from adipose tissue in women. Relationship to plasma levels and gene expression. *J Clin Invest* 1997; 99:2398-2404.
- (4) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7:941-946.
- (5) Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001; 7:947-953.
- (6) Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001; 108:1875-1881.
- (7) Schulze MB, Shai I, Rimm EB, Li T, Rifai N, Hu FB. Adiponectin and future coronary heart disease events among men with type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54:534-539.
- (8) Zietz B, Herfarth H, Paul G, Ehling A, Muller-Ladner U, Scholmerich J et al. Adiponectin represents an independent cardiovascular risk factor predicting serum HDL-cholesterol levels in type 2 diabetes. *FEBS Lett* 2003; 545:103-104.
- (9) Cianflone K, Xia Z, Chen LY. Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1609:127-143.
- (10) Cianflone K, Maslowska M, Sniderman AD. Acylation stimulating protein (ASP), an adipocyte autocrine: new directions. *Semin Cell Dev Biol* 1999; 10:31-41.
- (11) Kalant D, Cain SA, Maslowska M, Sniderman AD, Cianflone K, Monk PN. The chemoattractant receptor-like protein C5L2 binds the C3a des-Arg77/acylation-stimulating protein. *J Biol Chem* 2003; 278:11123-11129.

- (12) Van H, V, Reynisdottir S, Cianflone K, Degerman E, Hoffstedt J, Nilsell K et al. Mechanisms involved in the regulation of free fatty acid release from isolated human fat cells by acylation-stimulating protein and insulin. *J Biol Chem* 1999; 274:18243-18251.
- (13) Faraj M, Cianflone K. Differential regulation of fatty acid trapping in mouse adipose tissue and muscle by ASP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287:E150-E159.
- (14) Ahren B, Havel PJ, Pacini G, Cianflone K. Acylation stimulating protein stimulates insulin secretion. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27:1037-1043.
- (15) Faraj M, Lu HL, Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol* 2004; 82:170-190.
- (16) Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC et al. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 2001; 50:1126-1133.
- (17) Boggs RD, McCumbee WD, Cobbs SL, Todd DG, Kahle EB, Stewart NL et al. Increased expression of complement component C3 in the plasma of obese Zucker fa and LA/N fa(f) rats compared with their lean counterparts. *Obes Res* 1998; 6:361-367.
- (18) Beltowski J. Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* 2003; 9:RA55-RA61.
- (19) Oana F, Takeda H, Hayakawa K, Matsuzawa A, Akahane S, Isaji M et al. Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism* 2005; 54:995-1001.
- (20) Moraes RC, Blondet A, Birkenkamp-Demtroeder K, Tirard J, Orntoft TF, Gertler A et al. Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology* 2003; 144:4773-4782.
- (21) Singh KA, Boozer CN, Vasselli JR. Acute insulin-induced elevations of circulating leptin and feeding inhibition in lean but not obese rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289:R373-R379.
- (22) Levin BE, Dunn-Meynell AA, Ricci MR, Cummings DE. Abnormalities of leptin and ghrelin regulation in obesity-prone juvenile rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:E949-E957.
- (23) Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with

insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1930-1935.

- (24) Faraj M, Havel PJ, Phelis S, Blank D, Sniderman AD, Cianflone K. Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:1594-1602.
- (25) Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M et al. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2002; 51:2968-2974.
- (26) Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS. Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:447-452.
- (27) Koistinen HA, Vidal H, Karonen SL, Dusserre E, Vallier P, Koivisto VA et al. Plasma acylation stimulating protein concentration and subcutaneous adipose tissue C3 mRNA expression in nondiabetic and type 2 diabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1034-1039.
- (28) Malmstrom R, Taskinen MR, Karonen SL, Yki-Jarvinen H. Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia* 1996; 39:993-996.
- (29) Janeckova R. The role of leptin in human physiology and pathophysiology. *Physiol Res* 2001; 50:443-459.
- (30) Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257:79-83.
- (31) Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1595-1599.
- (32) Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334:292-295.
- (33) Minokoshi Y, Kahn BB. Role of AMP-activated protein kinase in leptin-induced fatty acid oxidation in muscle. *Biochem Soc Trans* 2003; 31:196-201.
- (34) Ozata M, Gungor D, Turan M, Ozisik G, Bingol N, Ozgurtas T et al. Improved glycemic control increases fasting plasma acylation-stimulating protein and decreases leptin concentrations in type II diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3659-3664.

- (35) Ebeling P, Teppo AM, Koistinen HA, Viikari J, Ronnema T, Nissen M et al. Troglitazone reduces hyperglycaemia and selectively acute-phase serum proteins in patients with Type II diabetes. *Diabetologia* 1999; 42:1433-1438.
- (36) Ebeling P, Teppo AM, Koistinen HA, Koivisto VA. Concentration of the complement activation product, acylation-stimulating protein, is related to C-reactive protein in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2001; 50:283-287.
- (37) Maslowska M, Vu H, Phelis S, Sniderman AD, Rhode BM, Blank D et al. Plasma acylation stimulating protein, adiponin and lipids in non-obese and obese populations. *Eur J Clin Invest* 1999; 29:679-686.
- (38) Pomeroy C, Mitchell J, Eckert E, Raymond N, Crosby R, Dalmaso AP. Effect of body weight and caloric restriction on serum complement proteins, including Factor D/adiponin: studies in anorexia nervosa and obesity. *Clin Exp Immunol* 1997; 108:507-515.
- (39) Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL et al. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3815-3819.
- (40) Zacharova J, Chiasson JL, Laakso M. The common polymorphisms (single nucleotide polymorphism [SNP] +45 and SNP +276) of the adiponectin gene predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the STOP-NIDDM trial. *Diabetes* 2005; 54:893-899.
- (41) Mohlig M, Wegewitz U, Osterhoff M, Isken F, Ristow M, Pfeiffer AF et al. Insulin decreases human adiponectin plasma levels. *Horm Metab Res* 2002; 34:655-658.
- (42) Mannucci E, Ognibene A, Cremasco F, Dicembrini I, Bardini G, Brogi M et al. Plasma adiponectin and hyperglycaemia in diabetic patients. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:1131-1135.
- (43) Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML, Detry R, Funahashi T, Matsuzawa Y et al. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:1102-1107.
- (44) Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290:1084-1089.
- (45) Sonnenberg GE, Krakower GR, Hoffmann RG, Maas DL, Hennes MM, Kissebah AH. Plasma leptin concentrations during extended fasting and

graded glucose infusions: relationships with changes in glucose, insulin, and FFA. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4895-4900.

- (46) Boden G, Chen X, Kolaczynski JW, Polansky M. Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Invest* 1997; 100:1107-1113.
- (47) Dagogo-Jack S, Fanelli C, Paramore D, Brothers J, Landt M. Plasma leptin and insulin relationships in obese and nonobese humans. *Diabetes* 1996; 45:695-698.
- (48) Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes* 1995; 44:1467-1470.
- (49) Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, Boden G, Nolan JJ, Henry R et al. Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Diabetes* 1996; 45:699-701.
- (50) Utriainen T, Malmstrom R, Makimattila S, Yki-Jarvinen H. Supraphysiological hyperinsulinemia increases plasma leptin concentrations after 4 h in normal subjects. *Diabetes* 1996; 45:1364-1366.
- (51) Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Friedman JM, Ailhaud G et al. Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin. *J Biol Chem* 1996; 271:2365-2368.
- (52) Maslowska M, Scantlebury T, Germinario R, Cianflone K. Acute in vitro production of acylation stimulating protein in differentiated human adipocytes. *J Lipid Res* 1997; 38:1-11.
- (53) Mueller WM, Gregoire FM, Stanhope KL, Mobbs CV, Mizuno TM, Warden CH et al. Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology* 1998; 139:551-558.
- (54) Mizuno T, Bergen H, Kleopoulos S, Bauman WA, Mobbs CV. Effects of nutritional status and aging on leptin gene expression in mice: importance of glucose. *Horm Metab Res* 1996; 28:679-684.
- (55) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425-432.
- (56) Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* 1950; 41:317-318.
- (57) Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 1978; 14:141-148.

- (58) Licinio J, Negrao AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB et al. Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:4140-4147.
- (59) Letiexhe MR, Scheen AJ, Lefebvre PJ. Plasma leptin levels, insulin secretion, clearance and action on glucose metabolism in anorexia nervosa. *Eat Weight Disord* 1997; 2:79-86.
- (60) Doehner W, Pflaum CD, Rauchhaus M, Godsland IF, Egerer K, Cicoira M et al. Leptin, insulin sensitivity and growth hormone binding protein in chronic heart failure with and without cardiac cachexia. *Eur J Endocrinol* 2001; 145:727-735.
- (61) Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996; 379:632-635.
- (62) Lacquemant C, Vasseur F, Lepretre F, Froguel P. [Adipocytokins, obesity and development of type 2 diabetes]. *Med Sci (Paris)* 2003; 19:809-817.
- (63) Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004; 50:1511-1525.
- (64) Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B et al. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 1995; 377:527-529.
- (65) Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L et al. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 1995; 377:530-532.
- (66) Smith FJ, Campfield LA, Moschera JA, Bailon PS, Burn P. Feeding inhibition by neuropeptide Y. *Nature* 1996; 382:307.
- (67) Unger RH, Zhou YT, Orci L. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:2327-2332.
- (68) Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 2002; 415:339-343.
- (69) Ceddia RB, Koistinen HA, Zierath JR, Sweeney G. Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J* 2002; 16:1163-1176.
- (70) Fried KS, Ricci MR, Ryan AS, Laferrère B. Regulation of Leptin Production in Humans. *The Journal of Nutrition* 2000;3127S-3131S.

- (71) Stefan N, Stumvoll M. Adiponectin--its role in metabolism and beyond. *Horm Metab Res* 2002; 34:469-474.
- (72) Matsubara M, Maruoka S, Katayose S. Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2764-2769.
- (73) Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999; 100:2473-2476.
- (74) Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995; 270:26746-26749.
- (75) Hoffstedt J, Arvidsson E, Sjolín E, Wahlen K, Arner P. Adipose tissue adiponectin production and adiponectin serum concentration in human obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1391-1396.
- (76) Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004; 291:1730-1737.
- (77) Saleh J, Summers LK, Cianflone K, Fielding BA, Sniderman AD, Frayn KN. Coordinated release of acylation stimulating protein (ASP) and triacylglycerol clearance by human adipose tissue in vivo in the postprandial period. *J Lipid Res* 1998; 39:884-891.
- (78) Scantlebury T, Maslowska M, Cianflone K. Chylomicron-specific enhancement of acylation stimulating protein and precursor protein C3 production in differentiated human adipocytes. *J Biol Chem* 1998; 273:20903-20909.
- (79) Faraj M, Jones P, Sniderman AD, Cianflone K. Enhanced dietary fat clearance in postobese women. *J Lipid Res* 2001; 42:571-580.
- (80) Yeni-Komshian H, Carantoni M, Abbasi F, Reaven GM. Relationship between several surrogate estimates of insulin resistance and quantification of insulin-mediated glucose disposal in 490 healthy nondiabetic volunteers. *Diabetes Care* 2000; 23:171-175.
- (81) Stern MP. Do non-insulin-dependent diabetes mellitus and cardiovascular disease share common antecedents? *Ann Intern Med* 1996; 124:110-116.
- (82) Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and

Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109:433-438.

- (83) Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109:433-438.
- (84) Rome S, Clement K, Rabasa-Lhoret R, Loizon E, Poitou C, Barsh GS et al. Microarray profiling of human skeletal muscle reveals that insulin regulates approximately 800 genes during a hyperinsulinemic clamp. *J Biol Chem* 2003; 278:18063-18068.
- (85) Yki-Jarvinen H. Role of insulin resistance in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetologia* 1995; 38:1378-1388.
- (86) Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 1992; 340:925-929.
- (87) Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1999; 104:787-794.
- (88) Rabasa-Lhoret R, Laville M. Physiopathologies des obésités et du diabète de type 2. *Encyclopédie Médico Chirurgicale Glandes, endocrinologie et nutrition* 2003;1-11.
- (89) Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 1999; 341:879-884.
- (90) Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL et al. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3815-3819.
- (91) Cianflone K, Maslowska M, Sniderman AD. Acylation stimulating protein (ASP), an adipocyte autocrine: new directions. *Semin Cell Dev Biol* 1999; 10:31-41.
- (92) Faraj M, Havel PJ, Phelis S, Blank D, Sniderman AD, Cianflone K. Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:1594-1602.

- (93) Ozata M, Gungor D, Turan M, Ozisik G, Bingol N, Ozgurtas T et al. Improved glycemic control increases fasting plasma acylation-stimulating protein and decreases leptin concentrations in type II diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3659-3664.
- (94) Ebeling P, Teppo AM, Koistinen HA, Viikari J, Ronnema T, Nissen M et al. Troglitazone reduces hyperglycaemia and selectively acute-phase serum proteins in patients with Type II diabetes. *Diabetologia* 1999; 42:1433-1438.
- (95) Koistinen HA, Vidal H, Karonen SL, Dusserre E, Vallier P, Koivisto VA et al. Plasma acylation stimulating protein concentration and subcutaneous adipose tissue C3 mRNA expression in nondiabetic and type 2 diabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1034-1039.
- (96) Bresson J-L, Corcos M, Hankard R, Jeammet P, Peres G. *Abrégés connaissances et pratique, nutrition humaine*. Paris: 2003.
- (97) Capeau J, Hermelin B. *Métabolisme des glucides et ses méthodes d'exploration chez l'homme*. *Encycl Méd Chir* 1994; 10-361-A-10:1-20.
- (98) Fougelle F, Girard J, Ferre P. Glucose regulation of gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998; 1:323-328.
- (99) Girard J, Perdereau D, Fougelle F, Prip-Buus C, Ferre P. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J* 1994; 8:36-42.
- (100) Vidal H. Regulation of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. *Ann Endocrinol (Paris)* 2002; 63:114-116.
- (101) Ryan AS, Elahi D. The effects of acute hyperglycemia and hyperinsulinemia on plasma leptin levels: its relationships with body fat, visceral adiposity, and age in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:4433-4438.
- (102) Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, Christoffersen CT, Englaro P, Heinze E et al. Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 1996; 45:1435-1438.
- (103) Pratley RE, Nicolson M, Bogardus C, Ravussin E. Effects of acute hyperinsulinemia on plasma leptin concentrations in insulin-sensitive and insulin-resistant Pima Indians. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:4418-4421.
- (104) DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979; 237:E214-E223.

- (105) Meneilly GS, Ryan EA, Radziuk J, Lau DC, Yale JF, Morais J et al. Effect of acarbose on insulin sensitivity in elderly patients with diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23:1162-1167.
- (106) Vidal H. Quantification of lipid-related mRNAs by reverse transcription-competitive polymerase chain reaction in human white adipose tissue biopsies. *Methods Mol Biol* 2001; 155:83-88.
- (107) Donahoo WT, Jensen DR, Yost TJ, Eckel RH. Isoproterenol and somatostatin decrease plasma leptin in humans: a novel mechanism regulating leptin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:4139-4143.
- (108) Pereira AM, Biermasz NR, Roelfsema F, Romijn JA. Pharmacologic therapies for acromegaly: a review of their effects on glucose metabolism and insulin resistance. *Treat Endocrinol* 2005; 4:43-53.
- (109) Fisher FM, McTernan PG, Valsamakis G, Chetty R, Harte AL, Anwar AJ et al. Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type 2 diabetic status. *Horm Metab Res* 2002; 34:650-654.

