

Université de Montréal

**ÉTUDE DES RELATIONS ENTRE LES TAUX DE
GHRÉLINE CIRCULANTE ET LE PROFIL
MÉTABOLIQUE CHEZ LA FEMME**

par

DAVID H. ST-PIERRE

Département de nutrition

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en Nutrition

Juillet 2006

© David H. St-Pierre, 2006



QU
145
U58
2006
v.016

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

Cette thèse intitulée

**ÉTUDE DES RELATIONS ENTRE LES TAUX DE
GHRÉLINE CIRCULANTE ET LE PROFIL
MÉTABOLIQUE CHEZ LA FEMME**

Présentée par :

DAVID H. ST-PIERRE

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Réjean Couture

président-rapporteur

Dr Rémi Rabasa-Lhoret

Directeur de recherche

Dr Katherine Cianflone

Co-directrice de recherche

Dr François Marceau

Membre externe

Dr Pierrette Gaudreau

Membre du jury

Dr Jean Davignon

Représentant de la Faculté des Études Supérieures (FÉS)

Thèse acceptée le

SOMMAIRE

La ghréline est un peptide de 28 acides aminés récemment isolé et caractérisé à partir de tissus d'estomac de rat. La ghréline, que l'on retrouve chez les mammifères sous les formes acylée (groupe octanoyl sur la sérine en position 3) et non-acylée, provoque différents effets biologiques aigus ou chroniques. La ghréline acylée stimule la sécrétion d'hormone de croissance des cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure et possède d'importantes propriétés orexigéniques. Bien que ses effets sur l'initiation de la prise alimentaire soient reconnus, certaines études semblent indiquer que la ghréline soit aussi associée à la régulation du métabolisme, en favorisant l'augmentation des réserves énergétiques. En ce sens, on soupçonne que la ghréline puisse être associée au développement de certaines dysfonctions métaboliques chroniques, telles l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Toutefois, plusieurs indices laissent croire que les effets physiologiques (aigus et chroniques) des formes acylée et non-acylée de la ghréline n'ont été jusqu'à maintenant que partiellement élucidés. Ce projet de recherche avait pour but de vérifier si les taux physiologiques de ghréline sont aussi associés aux composantes de la balance énergétique, à la sensibilité à l'insuline observée chez des groupes ciblés d'individus obèses, et à la concentration plus ou moins élevée de certains marqueurs chroniques de l'inflammation. De plus, nous avons évalué les effets de l'hyperinsulinémie sur les profils de ghréline acylée, non-acylée et totale en utilisant la technique du clamp euglycémique/hyperinsulinémique (CEH). Les premiers résultats obtenus chez un groupe de femmes jeunes, sensibles à l'insuline et non-obèses ($IMC < 30 \text{ kg/m}^2$) indiquent que, dans ce groupe de sujets, les taux de ghréline à jeun sont négativement corrélés au métabolisme basal (MB). Chez ces mêmes sujets, nous avons observé aussi que les paramètres de MB peuvent être utilisés comme prédicteurs indépendants de la variation des taux de ghréline. Ainsi, dans un groupe de femmes post-ménopausées, obèses ou en surpoids, nous avons pu observer des profils différents de ghréline acylée et non-acylée chez deux sous-groupes de ces sujets, les insulino-sensibles (ISOS) et les insulino-résistants (IROS), au cours du CEH. Comparativement aux IROS, les profils des ISOS montrent des valeurs faibles de ghréline acylée et une capacité accrue de réduction des taux de ghréline acylée et totale pendant l'hyperinsulinémie. Nous avons pu confirmer également que les profils de ghréline acylée pendant le CEH sont corrélés positivement avec le $TNF-\alpha$ (*Tumor Necrosis Factor alpha*) et négativement avec le récepteur soluble $TNF-R1$ (sTNF-R1). Les résultats des quatre études décrites dans cette thèse indiquent que la ghréline est étroitement reliée à la dépense énergétique, à la résistance à l'insuline et aux marqueurs inflammatoires

chroniques. Nous pouvons ainsi postuler que la modification des taux physiologiques de ghréline acylée et non-acylée puisse être associée au développement de troubles métaboliques chez la femme.

Mots-clé: Ghréline acylée; ghréline non-acylée; métabolisme énergétique; clamp euglycémiques/hyperinsulinémique; résistance à l'insuline; CRP; TNF- α ; sTNF-R1.

ABSTRACT

Ghrelin, a 28 amino acid peptide, was isolated recently from rat gastric tissues. In the circulation, ghrelin can be found as either acylated or non-acylated forms that both give rise to acute and chronic biological activities. Acylated ghrelin stimulates the release of growth hormone from the somatotroph cells of the anterior pituitary and acts as a potent orexigenic factor. Even though it potently increases food intake, several studies suggest that ghrelin could be involved in the regulation of metabolism by stimulating energy storage. Accordingly, physiological levels of ghrelin could be associated with the development of several metabolic disturbances such as obesity, insulin resistance and type 2 diabetes. However, evidence suggests that the physiological relevance (acute and chronic) of both acylated and non-acylated forms of ghrelin remains poorly understood. This research project aims at exploring whether physiological ghrelin levels could be associated with components of the energy balance, insulin sensitivity observed in a sub-group of obese individuals and levels of chronic inflammatory markers. As a complement to these studies, we have evaluated the effects of hyperinsulinemia on acylated and non-acylated ghrelin profiles during a euglycemic/hyperinsulinemic clamp (EHC). In a cohort of insulin sensitive, non-obese ($BMI < 30 \text{ kg/m}^2$) young women, ghrelin levels were negatively correlated with basal metabolism (BM). Moreover, in the same population, we observed that BM values can independently predict variations in circulating ghrelin concentrations. In post-menopausal overweight and obese women, we observed that insulin-sensitive and insulin-resistant overweight and obese subjects (ISOS or IROS) displayed different acylated and non-acylated ghrelin profiles during the EHC. Compared to IROS, ISOS profiles are characterized by decreased acylated ghrelin and increased reduction capacity of acylated and total ghrelin during hyperinsulinemia. Finally, we observed that acylated ghrelin profiles during the EHC are correlated positively with TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*) and negatively with TNF-R1 receptor. Overall, our results indicate that ghrelin is closely associated to energy metabolism, insulin resistance and chronic inflammatory markers. Overall, our data suggest that dysregulations of acylated and non-acylated ghrelin levels may be closely involved in the development of metabolic disturbances in women.

Keywords : Acylated ghrelin; non-acylated ghrelin; energy metabolism; euglycemic/hyperinsulinemic clamp; insulin resistance; CRP; TNF- α ; sTNF-R1.

DÉDICACE

À mes parents

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
SOMMAIRE	iii
SOMMAIRE ANGLAIS (<i>ABSTRACT</i>)	vi
DÉDICACE	viii
TABLE DES MATIÈRES	x
LISTE DES FIGURES	xiv
LISTE DES TABLEAUX	xv
ABRÉVIATIONS	xvii
REMERCIEMENTS	xx
1 INTRODUCTION	1
2 RECENSION DE LA LITTÉRATURE	4
2.1 OBÉSITÉ ET TROUBLES MÉTABOLIQUES.....	5
2.1.1 Appétit et prise alimentaire	6
2.1.2 Dépense énergétique	7
2.1.3 Syndrome métabolique	8
2.1.4 Répartition des tissus adipeux	14
2.1.5 Résistance à l'insuline et intolérance au glucose.....	15
2.1.6 Dyslipidémie	17
2.1.6.1 <i>TG et AGL</i>	17
2.1.6.2 <i>LDL</i>	17
2.1.6.3 <i>HDL</i>	18
2.1.6.4 <i>Apolipoprotéines</i>	18
2.1.7 Adipocytokines.....	19
2.1.8 Marqueurs de l'inflammation.....	20
2.1.8.1 <i>CRP</i>	20
2.1.8.2 <i>Systèmes TNF-α et IL-6</i>	20
2.1.9 Autres facteurs de risques cardiovasculaires.....	21
2.1.9.1 <i>Acide urique</i>	21
2.1.9.2 <i>Facteurs de coagulation et de fibrinolyse</i>	21
2.1.9.3 <i>Facteurs de stimulation de l'hypertension</i>	21
2.1.10 Synthèse de la section sur le syndrome métabolique.....	22
2.2 GHRÉLINE: ISOLATION, CARACTÉRISATION ET PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.....	23
2.2.1 GHS-R.....	23
2.2.1.1 <i>Mécanismes de signalisation du GHS-R1a</i>	25
2.2.2 Isolation et caractérisation de la ghréline.....	26
2.2.2.1 <i>Phylogénie de la ghréline</i>	27
2.2.2.2 <i>Études de structure-activité de la ghréline</i>	29
2.2.2.3 <i>Niveau d'expression et distribution de la ghréline</i>	30
2.2.3 Effets biologiques de la ghréline.....	33
2.2.3.1 <i>Effets de la ghréline sur la prise alimentaire</i>	33
2.2.3.2 <i>Ghréline et obésité</i>	37
2.2.3.3 <i>Ghréline et insuline</i>	39
2.2.3.4 <i>Ghréline et dépense énergétique</i>	41
2.2.3.5 <i>Ghréline et adipogénèse</i>	41
2.2.3.6 <i>Ghréline et inflammation</i>	43
2.2.3.7 <i>Effets de la ghréline sur la libération de GH</i>	44

2.2.3.8	<i>Effets synergiques de la ghréline et du GHRH</i>	46
2.2.3.9	<i>Effets de désensibilisation de l'activité de la ghréline</i>	46
2.2.3.10	<i>Effets de la ghréline sur la motilité intestinale et les sécrétions gastriques</i>	46
2.2.3.11	<i>Autres effets biologiques de la ghréline</i>	47
3	PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	48
3.1	PROBLÉMATIQUE.....	49
3.2	HYPOTHÈSES.....	51
3.3	OBJECTIFS.....	52
4	MÉTHODOLOGIE	53
4.1	PROTOCOLE I.....	55
4.1.1	Évaluation du profil métabolique chez des femmes jeunes, non-obèses et en santé.....	55
4.1.1.1	<i>Étude 1</i>	55
4.1.1.2	<i>Étude 2</i>	56
4.1.2	Déroulement de l'Étude 1 et de l'Étude 2.....	56
4.2	PROTOCOLE 2.....	57
4.2.1	Évaluation de profil métabolique de femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids.....	57
4.2.1.1	<i>Étude 3</i>	57
4.2.1.2	<i>Étude 4</i>	58
4.2.2	Déroulement de l'Étude 3 et de l'Étude 4.....	58
4.2.2.1	<i>Recrutement</i>	58
4.2.2.2	<i>Stabilisation du poids corporel</i>	59
4.2.2.3	<i>Investigations</i>	59
4.3	MÉTHODES.....	60
4.3.1	Clamp euglycémique/hyperinsulinémique.....	60
4.3.2	Échantillons sanguins.....	60
4.3.3	Analyses sanguines.....	61
4.3.3.1	<i>Dosage de la ghréline totale</i>	61
4.3.3.2	<i>Dosage de la ghréline acylée</i>	62
4.3.3.3	<i>Dosage de la leptine</i>	62
4.3.3.4	<i>Dosage de l'adiponectine</i>	63
4.3.3.5	<i>Dosage de l'insuline</i>	63
4.3.3.6	<i>Dosage combiné du bilan lipidique et du glucose</i>	64
4.3.3.7	<i>Dosage de hsCRP</i>	64
4.3.3.8	<i>Dosage de hsTNF-α et sTNF-RI</i>	64
4.3.3.9	<i>Activité physique pendant les temps libres (APTL)</i>	65
4.3.3.10	<i>Dépense énergétique reliée à l'activité physique (DEAP)</i>	65
4.3.3.11	<i>Apport énergétique</i>	66
4.3.3.12	<i>Habitudes alimentaires</i>	66
4.3.3.13	<i>Métabolisme de base (MB)</i>	66
4.3.3.14	<i>Mesures de la composition corporelle et anthropométriques</i>	67
4.3.3.15	<i>Capacité aérobie à effort maximal (VO_{2peak})</i>	68
4.3.3.16	<i>Statistiques</i>	68
5	RÉSULTATS	70

5.1	ASSOCIATION ENTRE LES TAUX CIRCULANTS DE GHRÉLINE ET LE MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE (ÉTUDE 1).....	71
5.2	HABITUDES DE VIE ET COMPOSANTES DE LA BALANCE ÉNERGÉTIQUE COMME PRÉDICTEURS DE LA VARIATION DES TAUX SÉRIQUES DE GHRÉLINE TOTALE, D'ADIPONECTINE ET DE LEPTINE (ÉTUDE 2).....	77
5.3	ÉTUDE DES PROFILS PLASMATIQUES DE GHRÉLINE ACYLÉE ET NON-ACYLÉE CHEZ DES FEMMES POST-MÉNOPAUSÉES INSULINO-SENSIBLES OU INSULINO-RÉSISTANTES, OBÈSES OU EN SURPOIDS (ÉTUDE 3).....	89
5.4	ÉTUDE DE LA RELATION POSSIBLE ENTRE LES TAUX PLASMATIQUES DE GHRÉLINE ACYLÉE ET LES MARQUEURS CHRONIQUES DE L'INFLAMMATION CHEZ DES FEMMES POST-MÉNOPAUSÉES OBÈSES OU EN SURPOIDS (ÉTUDE 4).....	99
6	DISCUSSION.....	112
6.1	ASSOCIATIONS DES TAUX DE GHRÉLINE SÉRIQUE ET DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE (ÉTUDE 1).....	114
6.2	HABITUDES DE VIE ET COMPOSANTES DE LA BALANCE ÉNERGÉTIQUE COMME PRÉDICTEURS DE LA VARIATION DES TAUX SÉRIQUES DE GHRÉLINE TOTALE, D'ADIPONECTINE ET DE LEPTINE (ÉTUDE 2).....	117
6.3	ÉTUDE DES PROFILS PLASMATIQUES DE GHRÉLINE ACYLÉE ET NON-ACYLÉE CHEZ DES FEMMES POST-MÉNOPAUSÉES INSULINO-SENSIBLES OU INSULINO-RÉSISTANTES, OBÈSES OU EN SURPOIDS (ÉTUDE 3).....	122
6.4	ÉTUDE DE LA RELATION POSSIBLE ENTRE LES TAUX PLASMATIQUES DE GHRÉLINE ACYLÉE ET LES MARQUEURS CHRONIQUES DE L'INFLAMMATION CHEZ DES FEMMES POST-MÉNOPAUSÉES OBÈSES OU EN SURPOIDS (ÉTUDE 4).....	127
7	CONCLUSIONS.....	131
7.1	LA GHRÉLINE: ÉTUDES CHEZ DES POPULATIONS HUMAINES.....	132
7.2	LA GHRÉLINE: RELATIONS AVEC LE PROFIL MÉTABOLIQUE.....	133
7.3	LA GHRÉLINE ET LE MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE.....	134
7.4	LE MODÈLE DU CLAMP EUGLYCÉMIQUE / HYPERINSULINÉMIQUE.....	135
7.5	GHRÉLINE ACYLÉE vs. GHRÉLINE NON-ACYLÉE.....	136
7.6	PROFILS PLASMATIQUES DE SÉCRÉTION DE GHRÉLINE CHEZ DES FEMMES POST-MÉNOPAUSÉES INSULINO-SENSIBLES OU INSULINO-RÉSISTANTES, OBÈSES OU EN SURPOIDS.....	137
7.7	PROFILS PLASMATIQUES DE GHRÉLINE ET MARQUEURS INFLAMMATOIRES CHRONIQUES.....	138
7.8	ÉTUDES FUTURES.....	139
8	SOURCES DOCUMENTAIRES.....	141
	ANNEXE.....	191

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Corrélation entre les taux sériques de ghréline totale présents et le métabolisme de base.....	76
Figure 2	Association des taux sériques d'adiponectine à ceux de la dépense énergétique reliée à l'activité physique (A) et à l'apport énergétique quotidien (B) chez les sujets ayant participé à l'Étude 2.....	88
Figure 3	Taux plasmatiques de ghréline acylée (A), non-acylée (B) et totale (C) de base et pendant le CEH chez les sujets ISOS et les IROS ayant participé à l'Étude 3.....	93
Figure 4	Valeurs de base, au temps 180 min et abaissement maximal des taux plasmatiques de ghréline acylée, non-acylée et totale chez les sujets ISOS et IROS de l'Étude 3.....	97
Figure 5	Profil de plasmatique de secretion de la ghréline acylée et totale pendant le CEH chez les sujets ayant participé à l'Étude 4.....	106
Figure 6	Corrélations entre les taux plasmatiques basaux de ghréline acylée et de sTNF-R1.....	109

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Définition du syndrome métabolique selon le <i>National Cholesterol Education Program</i> ou NCEP dérivé de l' <i>Adult Treatment Program III</i> ou ATPIII	10
Tableau 2	Définition du syndrome métabolique selon l'Organisation Mondiale de la Santé ou OMS	11
Tableau 3	Définition du syndrome métabolique selon l' <i>American Association of Clinical Endocrinologists</i> ou AACE.....	12
Tableau 4	Définition du syndrome métabolique selon l' <i>International Diabetes Federation</i>	13
Tableau 5	Caractéristiques physiques observées chez les sujets ayant participé à l'Étude 1.....	72
Tableau 6	Caractéristiques du bilan énergétique des sujets ayant participé à l'Étude 1.....	74
Tableau 7	Caractéristiques physiques et habitudes de vie des sujets ayant participé à l'Étude 2.....	79
Tableau 8	Caractéristiques du profil sanguin des sujets ayant participé à l'Étude 2.....	81
Tableau 9	Différences des taux d'IMC, d'insuline à jeun, de résistance à l'insuline, de pourcentage de masse adipeuse, d'oxydation des taux sériques de ghréline totale, d'adiponectine et de leptine chez les sujets ayant participé à l'Étude 2, faisant usage ou non de contraceptifs oraux.....	83
Tableau 10	Corrélation de Pearson entre les taux sériques de ghréline totale, d'adiponectine, de leptine et des variables métaboliques de sujets ayant participé à l'Étude 2.....	85
Tableau 11	Analyse de régression par étape évaluant l'effet de prédicteurs indépendants reliés au développement de troubles métaboliques sur la variation des concentrations sériques de ghréline totale, d'adiponectine et de leptine chez les sujets ayant participé à l'Étude 2	87
Tableau 12	Caractéristiques générales des femmes obèses ou en surpoids post-ménopausées ayant participé à l'Étude 3.....	91

Tableau 13	Différences entre les valeurs d'AUC de ghréline acylée, non-acylée et totale chez les sujets ISOS et IROS ayant participé à l'Étude 3 pendant le CEH...95
Tableau 14	Corrélation de Pearson entre la sensibilité à l'insuline et les valeurs d'AUC et d'abaissement maximal de ghréline acylée, non-acylée et totale chez la cohorte de femmes ayant participé à l'Étude 3, comprenant à la fois les femmes post-ménopausées ISOS et IROS.....98
Tableau 15	Caractéristiques physiques des femmes post-ménopausées ayant participé à l'Étude 4.....101
Tableau 16	Caractéristiques du profil métabolique et inflammatoire des sujets ayant participé à l'Étude 4.....102
Tableau 17	Corrélations de Pearson entre les taux plasmatiques basaux de ghréline totale, de ghréline acylée, de hsCRP, de hsTNF- α et de sTNF-R1 chez les femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids ayant participé à l'Étude 4.....103
Tableau 18	Profils plasmatiques de ghréline acylée, totale et du rapport ghréline acylée / ghréline totale chez les sujets ayant participé à l'Étude 4.....105
Tableau 19	Associations entre les taux plasmatiques de ghréline acylée, totale et le rapport ghréline acylée/totale et hsCRP, hsTNF- α et sTNF-R1 chez les sujets ayant participé à l'Étude 4.....108
Tableau 20	Modèle d'analyse de régression par étape visant à examiner les prédicteurs indépendants de la variation des taux plasmatiques de sTNF-R1 chez les sujets ayant participé à l'Étude 4.....111

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AACE	<i>American Association of Clinical Endocrinologists</i>
ACTH	<i>Adrenocorticotrop hormone</i> (hormone adrénocorticotropique)
ADD1	<i>Adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1</i> (facteur dépendant de la détermination et de la différenciation adipocytaire 1)
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AGL	Acides gras libres
AGRP	<i>Agouti-related protein</i> (protéine associée Agouti)
AMPK	Adénosine monophosphate kinase
Ang II	Angiotensine II
aP2	<i>Adipose protein 2</i> (protéine adipocytaire 2)
ApoB	Apolipoprotéine B
ARC	Noyau arqué de l'hypothalamus
ASP	<i>Acylation Stimulating Protein</i> (protéine stimulant l'acylation)
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	<i>Adult treatment program</i>
APTL	Dépense énergétique associée aux activités physiques pendant les loisirs
AUC	<i>Area under the curve</i> (aire sous la courbe)
BMI	<i>Body mass index</i> (indice de masse corporelle)
CART	<i>Cocaine and amphetamine regulated transcript</i> (transcrit sous contrôle de cocaïne et d'amphétamine)
CCK	Cholecystokinine
CEH	Clamp euglycémique/hyperinsulinémique
CI	Calcium intracellulaire
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRP	<i>C-reactive protein</i> (protéine C-réactive)
DAG	Diacylglycérol
DÉAP	Dépense énergétique reliée à l'activité physique
DXA	<i>Dual Energy X Ray absorptiometry</i>
ECG	Électrocardiogramme
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> (kinase sous contrôle du signal extracellulaire 1/ 2)
E-selectin	<i>Endothelial selectin</i> (sélectine endothéliale)
ET-1	Endothéline-1
ET	<i>Standard deviation</i> (Écart-type)
ETR	Effet thermique d'un repas
F	Femmes
FSH	<i>Follicular stimulating hormone</i> (hormone stimuloire de follicule)
GDP	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (déshydrogénase du glycerol-3-phosphate)

GH	<i>Growth hormone</i> (hormone de croissance)
GI	Gastro-intestinal
GHRH	<i>Growth hormone releasing hormone</i> (facteur de libération de la GH)
GHRH-R	Récepteur du GHRH
GHRP	<i>Growth hormone releasing peptides</i> (peptides de libération de l'hormone de croissance)
GHS	Sécrétagogues de la GH
GHS-R1a	<i>Growth hormone secretagogue receptor 1a</i> (récepteur GHS 1a)
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide 1</i> (peptide similaire au glucagon 1)
H	Hommes
HDL	<i>High density lipoproteins</i> (lipoprotéines à densité élevée)
HGPO	Hyperglycémie provoquée oralement
HOMA	<i>Homeostasis model assesment</i> (modèle d'évaluation de l'homéostasie)
hs	<i>High sensitivity</i> (sensibilité élevée)
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule 1</i> (molécule d'adhésion intracellulaire 1)
icv	Intracérébrovasculaire
ID	Numéro d'identification Genbank
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IL	Interleukine
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i> (facteur de croissance similaire à l'insuline 1)
ILDL	<i>Intermediate low density lipoproteins</i> (lipoprotéines à densité intermédiaire)
IMC	Indice de masse corporelle
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> (synthase d'oxyde nitrique inductible)
IP ₃	Inositol triphosphate
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate 1</i> (substrat du récepteur de l'insuline 1)
IRAS	<i>Insulin resistance atherosclerosis study</i>
i.v.	Intraveineux
LDL	<i>Low density lipoproteins</i> (lipoprotéines à faible densité)
LHA	<i>Lateral hypothalamic area</i> (zone hypothalamique latérale)
LPL	<i>Lipoprotein lipase</i> (lipase lipoprotéique)
LTA	<i>Leisure time activity questionnaire</i> (questionnaire d'activité physique associée aux loisirs)
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
NF _κ B	<i>Nuclear factor κB</i> (facteur nucléaire κB)
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NO	<i>Nitric oxide</i> (monoxyde d'azote)
NPY	Neuropeptide Y

MAFbx	<i>Muscle atrophy F-box</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated kinase</i> (protéine kinase activée par des agents mitogènes)
MB	Métabolisme basal
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i> (protéine chemotactique de monocytes 1)
M-CSF	<i>Macrophage-colony stimulating factor</i> (facteur stimulant la colonie de macrophage)
MuRF-1	<i>Muscle ring finger 1</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
OXM	Oxyntomoduline
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i> (inhibiteur de l'activateur de plasminogène)
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3 kinase</i> (kinase de phosphatidylinositol)
Pit-1	<i>Pituitary transcription factor 1</i> (facteur de transcription hypophysaire 1)
PKC	Protéine kinase C
POMC	Proopiomelanocortine
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activating receptor</i> (récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes)
PRL	Prolactine
PVN	Noyau paraventriculaire
PYY	Peptide YY
QR	Quotient respiratoire
QUICKI	<i>Quantitative Insulin Sensitivity Check Index</i> (index quantitatif de sensibilité à l'insuline)
RIA	Radioimmunoétalonnage
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espèces réactives à l'oxygène)
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
SD	<i>Standard deviation</i> (erreur typique empirique)
SNC	Système nerveux central
SRIF	Somatostatine
TFEQ	<i>Three-factor eating questionnaire</i> (questionnaire de comportements alimentaires)
TG	Triglycérides
TH	Hormone thyroïdienne
T/H	Rapport des circonférences de taille/hanches
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> (facteur de nécrose tumorale α)
TNF-R1	<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i> (récepteur TNF 1)
TZD	Thiazolidiones
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule</i> (molécule d'adhésion vasculaire 1)
VLDL	<i>Very low density lipoproteins</i> (lipoprotéines à très faible densité)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes et les institutions qui ont rendu possible la réalisation de ce projet de doctorat. Je suis particulièrement reconnaissant:

Aux Instituts de Recherche en Santé du Canada qui m'ont attribué une bourse doctorale et financé le projet pilote;

Au docteur Rémi Rabasa-Lhoret pour avoir dirigé ce projet;

Au docteur Katherine Cianflone pour ses précieux conseils et sa supervision;

Au docteur Yvette Taché, un modèle en recherche, avec toute mon admiration et ma gratitude;

Au docteur Antony D. Karelis pour son amitié indéfectible et son constant support;

Au docteur Lise Coderre pour sa patience et sa disponibilité;

Au docteur Huy Ong et à son groupe de recherche pour l'accès au laboratoire et l'utilisation des appareils;

À Mme Diane Mignault pour sa précieuse aide technique et sa gentillesse de tous les instants;

Au docteur Miguel Chagnon pour le support statistique;

À Mme Lyne Messier pour son support technique;

Au docteur Olivier Receveur pour son appui réconfortant et ses précieux conseils;

À Mme Monique Wolfe pour sa patience et sa bienveillance et

Aux sujets féminins ayant participé aux études présentées dans ce travail.

1 INTRODUCTION

Le contrôle de la balance énergétique chez les mammifères résulte d'une combinaison d'interactions complexes entre des facteurs génétiques, nutritionnels, comportementaux et hormonaux. Toute altération importante d'un ou de plusieurs de ces facteurs affecte donc l'homéostasie énergétique de façon plus ou moins marquée. Les systèmes endocriniens, par le biais d'hormones peptidiques et non peptidiques sécrétées par le cerveau ou en périphérie régularisent, à la fois, l'apport et le métabolisme énergétique des organismes. Au cours de la dernière décennie, la découverte et l'isolation de deux hormones peptidiques a profondément changé la compréhension de la régulation physiologique de la balance énergétique. Il a été démontré que la leptine et la ghréline, isolées respectivement des tissus adipeux et du tractus gastro-intestinal (GI), agissent sur le contrôle de la prise alimentaire et, par conséquent, sur la masse corporelle des individus. Dès lors, les cellules adipeuses et épithéliales du tractus GI ne furent plus simplement considérées en tant qu'organes isolés, mais plutôt comme des éléments de liaison entre le système nerveux central et les différents effecteurs métaboliques périphériques. Ceci a contribué à la découverte de nombreux facteurs hormonaux ayant également des implications dans la régulation de la balance énergétique. Indirectement, l'engouement créé par la découverte de la ghréline a mené à l'étude plus poussée d'autres facteurs hormonaux GI déjà connus, tels PYY (peptide YY), CCK (cholecystokinine), OXM (oxyntomoduline), GLP-1 (peptide similaire au glucagon 1), glucagon et amyline pouvant aussi influencer la régulation des apports alimentaires. Bien que l'existence de la ghréline était soupçonnée depuis longtemps, l'isolation de ce peptide et de celle de son récepteur spécifique ont permis la description du premier facteur orexigène de nature gastro-intestinale. Subséquemment, un nombre impressionnant d'études ont évalué l'effet de la ghréline sur les paramètres métaboliques.

Ce projet de recherche vise d'abord à démontrer et caractériser le rôle physiologique de la ghréline dans le maintien de la balance énergétique chez l'humain. Le profil métabolique de deux populations de femmes a donc été étudié; cependant, de futures études chez les hommes pourraient être effectuées. La première cohorte comprenait des femmes jeunes non-obèses ($IMC < 30 \text{ kg/m}^2$) entre 18 et 35 ans, provenant du milieu universitaire. La seconde cohorte était composée de femmes avec surpoids ou obèses ($IMC > 27 \text{ kg/m}^2$) post-ménopausées. Nous croyons que l'étude de ces groupes de femmes, représentatifs de deux périodes déterminantes (fin des études universitaires/début de carrière et ménopause) de la vie humaine, devrait nous permettre de tirer des informations de première main sur les

conséquences physiologiques associées à une augmentation de la masse corporelle et à une détérioration du profil métabolique.

Pour chacun des sujets, un phénotypage métabolique comprenant la détermination du profil hormonal et inflammatoire, de la sensibilité à l'insuline, de la composition corporelle, du profil lipidique, ainsi que des facteurs psycho-sociaux reliés à l'alimentation et de la dépense énergétique totale et au repos a été effectué. En plus d'un profil métabolique complet, la qualité des données est supportée par l'utilisation de techniques de pointe, telles le clamp euglycémique/hyperinsulinémique pour l'évaluation de la sensibilité à l'insuline et en tant que modèle d'hyperinsulinémie post-prandiale, l'eau doublement marquée pour la détermination de la dépense énergétique totale moyenne pendant 10 jours, ainsi que le DXA (*Dual Energy X-ray Absorptiometry*) et la tomographie axiale, qui permettent d'obtenir la composition corporelle et la masse adipeuse viscérale.

2 RECENSION DE LA LITTÉRATURE

2.1 OBÉSITÉ ET TROUBLES MÉTABOLIQUES

La hausse de l'incidence de l'obésité et des troubles métaboliques est un problème majeur de santé publique autour du globe (1, 2). Alors que des études récentes prédisent que le nombre de cas de diabète pourrait doubler d'ici 25 ans, d'importants moyens et efforts sont mis en place pour comprendre et, éventuellement, traiter les maladies associées à l'obésité (3). Les données de la troisième étude du *National Health and Nutrition Examination Survey*, ou NHANES III, indiquent que 85,2% et 54,8% des citoyens américains souffrent de surpoids (IMC > 27 kg/m²) et d'obésité (IMC > 30 kg/m²), respectivement (3). Les pathologies majeures qui peuvent affecter plus particulièrement les individus obèses sont le diabète, les maladies cardiovasculaires, les accidents vasculaires cérébraux, l'ostéo-arthrite ainsi que certaines formes spécifiques de cancer (entre autre des reins, du tractus GI, du sein et de la prostate).

Est-ce que l'obésité peut être considérée comme une pathologie? Cette question a été débattue avec un intérêt particulier au cours des deux dernières décennies. L'évolution de la définition du syndrome métabolique en fonction des découvertes continues dans le domaine illustre bien la complexité du problème. Les troubles dérivés de l'obésité sont multifactoriels et la présence d'un surpoids est généralement, mais pas nécessairement, associée à la présence de troubles métaboliques. En d'autres termes, l'obésité est souvent associée à la présence de maladies cardiovasculaires et/ou au diabète de type 2 (4, 5). Toutefois, un bon nombre d'individus obèses montrent un profil métabolique plus favorable que d'autres individus de poids normal (6).

La prochaine section de ce chapitre résume l'état général des connaissances dans le domaine, en insistant sur l'étiologie des facteurs impliqués dans le développement des troubles métaboliques, tels la résistance à l'insuline, le diabète et les maladies cardiovasculaires.

2.1.1 APPÉTIT ET PRISE ALIMENTAIRE

Chez l'humain, la prise alimentaire est épisodique, sous la forme de repas ou de collations (7). Pendant un repas, l'apport alimentaire se fait jusqu'à ce qu'une impression de saturation se manifeste, la satiété ; cette sensation est suivie par une période de satiété où les besoins alimentaires se font graduellement sentir (8, 9). La sensation de satiété peut durer et se manifester de façon plus ou moins importante, selon l'individu et la nature de la dernière prise alimentaire. Cette sensation s'estompe avec le temps, jusqu'à ce que la sensation de faim se manifeste et/ou que d'autres facteurs influencent la recherche de nourriture. Des facteurs externes (environnementaux, circadiens, sociaux et psychologiques) et internes (manque d'énergie, appétit, stimulation sensorielle) peuvent influencer la prise alimentaire (10-12).

L'appétit peut être défini comme étant *le sentiment intérieur qui pousse à la recherche, au choix et à l'ingestion d'aliments*. Deux approches sont possibles pour mesurer l'appétit. La première permet l'évaluation subjective de la faim, du désir de manger, de la consommation prospective d'aliments, ou du degré de satiété (13-18). La seconde approche consiste à évaluer l'apport alimentaire (19, 20). Différentes méthodes sont utilisées dans le domaine de la recherche pour évaluer l'apport alimentaire. Les rappels de 24h, les journaux alimentaires de 3 jours, ainsi que les questionnaires de fréquence alimentaire constituent des approches fiables et éprouvées, permettant à un individu ou à un professionnel d'évaluer la consommation alimentaire. Les cuisines métaboliques et les buffets à volonté permettent d'évaluer les apports alimentaires de façon plus contrôlée. Toutefois, chacune des méthodes précédentes comporte des limitations. Il est rapporté que des sujets soumis à l'auto-évaluation surestiment (sujets anorexiques) ou encore, sous-estiment (sujets obèses) leurs apports alimentaires. Cependant, les cuisines métaboliques et les buffets à volonté sont des méthodes invasives où un personnel qualifié peut évaluer l'apport alimentaire avec une plus grande précision.

De multiples facteurs peuvent influencer l'aspect quantitatif et qualitatif de l'apport alimentaire. En effet, la dépense énergétique (de base, post-prandiale ou associée à l'activité physique), les réserves énergétiques (tissus adipeux et glycogène), la disponibilité des aliments, ainsi que des facteurs psychologiques et sociaux peuvent fortement influencer

l'apport de macronutriments. Cet apport peut varier de façon importante d'un repas à l'autre (régulation aiguë). Toutefois, à long terme, un équilibre doit être établi entre l'apport et la dépense énergétique (régulation chronique). Un déséquilibre de cet équilibre provoque des changements de masse et de composition corporelle et se traduit par un gain (apports alimentaires trop importants) ou une perte (apports alimentaires trop faibles) de poids.

2.1.2 DÉPENSE ÉNERGÉTIQUE

On soupçonne depuis longtemps qu'une dépense énergétique peu élevée pourrait être un facteur prédisposant à l'obésité. Toutefois, chez l'humain, il est difficile de valider cette hypothèse, vu la complexité de l'évaluation de la dépense énergétique totale. Afin d'obtenir une première approximation, la dépense énergétique a été divisée en plusieurs composantes, incluant le métabolisme au repos, l'effet thermique d'un repas et la dépense énergétique liée à l'activité physique. Les premières méthodes d'évaluation de la dépense énergétique provenaient des équations de Harris et Benedict, proposées en 1918 (21). Aujourd'hui, les principales méthodes d'évaluation de la dépense énergétique comprennent la calorimétrie indirecte (en chambre calorimétrique ou au moyen d'un calorimètre, par mesure des échanges gazeux lors de la respiration d'un sujet), les instruments évaluant le coût énergétique des déplacements (accéléromètres tridimensionnels) ou des changements physiologiques corporels (capteurs thermiques et cardiaques), ainsi que les questionnaires d'activité physique. De plus, la calorimétrie indirecte permet d'évaluer le niveau d'oxydation du glucose et des lipides au moyen du quotient respiratoire (QR). L'assignation du QR ($QR = \text{volume de CO}_2 \text{ produit} / \text{volume d'O}_2 \text{ consommé}$) a pu démontrer que, plus sa valeur tend vers 0,71, plus la proportion de l'énergie dérivée de l'oxydation des lipides est importante; d'autre part, plus il tend vers 1,00, plus les substrats énergétiques utilisés sont les carbohydrates (22). Bien que procurant des valeurs d'un grand intérêt scientifique, la plupart de ces méthodes comportent des désavantages importants. En effet, la nature intrusive (calorimétrie indirecte), la contrainte d'espace (chambre calorimétrique) ou encore l'évaluation imprécise de l'activité physique représentent autant de sources d'erreurs dans l'évaluation de la dépense énergétique.

Au cours des années 1980, une nouvelle technique a été proposée pour évaluer la dépense énergétique chez le sujet humain, et ce, sans entraver ses habitudes de vie. Cette technique, qui utilise de l'eau doublement marquée, permet ainsi d'évaluer la dépense énergétique pendant une période déterminée, qui peut varier entre 1 et 2 semaines (23, 24). Elle est basée sur l'absorption de doses de molécules d'eau comprenant des marqueurs isotopiques stables ($^2\text{H}_2\text{O}$ et H_2^{18}O). Ainsi, les molécules de $^2\text{H}_2\text{O}$ sont évacuées dans les liquides corporels, alors que celles de H_2^{18}O peuvent être libérées à la fois sous forme d'eau ou de CO_2 par l'anhydrase carbonique. La dépense énergétique totale est donc obtenue en mesurant le rapport isotopique dans l'urine, avant et après la période déterminée. Par conséquent, lors de la collecte du dernier échantillon d'urine, plus la concentration de marqueurs isotopiques dans l'urine d'un sujet est faible, plus on estime que sa dépense énergétique est élevée (22, 25).

2.1.3 SYNDROME MÉTABOLIQUE

Entre les années 1960 et 1970, le «Syndrome Métabolique» a été défini par la présence de multiples facteurs de risques cardiovasculaires, comprenant l'obésité, l'hypertension, le diabète et la dyslipidémie (26-28). Contrairement aux facteurs de risques individuels qui le caractérisent, le syndrome métabolique ne peut s'exprimer à partir de valeurs de référence définies. En effet, dans une population caractérisée comme étant atteinte du syndrome métabolique, le nombre et le degré de sévérité des troubles métaboliques individuels peuvent varier de façon importante d'un individu à un autre.

Différentes définitions du syndrome métabolique sont présentement utilisées (29-33). Les Tableaux 1, 2, 3 et 4 résument celles qui sont les plus reconnues. Il est important de noter que l'obésité est l'un des facteurs de risque important dans l'expression du syndrome métabolique. Toutefois, différentes méthodes de détection et différents taux d'obésité sont considérés. Par exemple, la circonférence de taille, le rapport circonférence de taille/circonférence des hanches et l'Indice de Masse Corporelle (IMC) sont des méthodes simples, utilisées couramment en clinique; par contre, en milieu de recherche, des méthodes de détection plus spécifiques sont utilisées. Il faut noter cependant que, selon la définition

du syndrome métabolique utilisée, les «taux seuil» de certains facteurs de risque peuvent être différents.

Les données de NHANES III rapportent que, entre 1994 et 1998, 24%, 30% et 40% des individus américains âgés de plus de 20, 50 et 60 ans, respectivement, étaient affectés par le syndrome métabolique (34). On rapporte également que l'incidence du syndrome métabolique est plus élevée chez les caucasiens hispaniques que chez les caucasiens non-hispaniques et les afro-américains.

Au cours des prochaines années, il est fort probable que les définitions du syndrome métabolique se seront ajustées au diapason de l'évolution des connaissances dans le domaine. Conséquemment, une révision constante du concept même du syndrome métabolique sera imposée par la découverte (en milieu de recherche) de nouveaux paramètres impliqués dans le développement des divers troubles métaboliques, et leur impact devra être réassigné au moyen d'études cliniques exhaustives.

Un nombre grandissant d'auteurs remettent en question la valeur du terme «syndrome métabolique». Toutefois, les objectifs de ce projet de recherche n'incluaient pas une remise en question du terme lui-même, mais plutôt son évaluation quantitative et la justification de son utilité dans un contexte clinique.

Tableau 1. Définition du syndrome métabolique selon le *National Cholesterol Education Program* ou NCEP dérivé de l'*Adult Treatment Program III* ou ATPIII (29)

FACTEURS DE RISQUE (3 de 5 critères)	TAUX
Obésité abdominale (circonférence de taille)	> 102 cm (H) ou > 88cm (F)
HDL	< 1,03 mmol/L (H) ou < 1,28 mmol/L (F)
Triglycérides	> 1,7 mmol/L
Pression artérielle	> 130/85 mm de Hg
Glycémie à jeun	> 6,1 mmol/L de glucose

HDL: lipoprotéines à densité élevée; H: hommes; F: femmes.

Tableau 2. Définition du syndrome métabolique selon l'Organisation Mondiale de la Santé ou OMS (30, 32)

FACTEURS DE RISQUE	TAUX
Résistance à l'insuline (plus d'un des critères suivants):	
- diabète de type 2	
- hyperglycémie à jeun	> 6,1 mmol/L
- hyperglycémie post-prandiale	> 8,1 mmol/L
- capacité à disposer du glucose inférieure au plus bas quartile de la population (clamps euglycémiques/hyperinsulinémiques)	
Au moins deux des critères suivants:	
- Tension artérielle	> 140/90 mm de Hg
- Triglycérides	> 1,7 mmol/L
- HDL	< 0,9 mmol/L (H) ou < 1,0 mmol/L (F)
- IMC ou W/H	> 30 kg/m ² et W/H: > 0,9 (H) ou > 0,85 (F)
- sécrétion d'albumine urinaire	> 20µg/min ou albumine/créatinine: > 30mg/g

HDL: lipoprotéines à densité élevée; IMC : indice de masse corporelle; H: hommes; F: femmes et W/H: rapport circonférence de la taille/circonférence des hanches.

Tableau 3. Définition du syndrome métabolique selon l'*American Association of Clinical Endocrinologists* ou AACE (31)

FACTEURS DE RISQUE	TAUX
Indice de masse corporelle	>25 kg/m ²
Triglycérides	>1,7 mmol/kg
HDL	<1,04 mmol/L (H) ou <1,29 mmol/L (F)
Hypertension	> 130/85 mm de Hg
Glucose à jeun	> 6,1 mmol/L
Glucose après HGPO	> 7,8 mmol/L après 2 heures

Selon cette définition, le diagnostic d'un des facteurs doit impliquer un traitement et un suivi médical. HDL: lipoprotéines à densité élevée; H: hommes; F: femmes; HGPO: hyperglycémie provoquée oralement.

Tableau 4. Définition du syndrome métabolique selon *l'International Diabetes Federation* (33)

FACTEURS DE RISQUE	TAUX
Obésité centrale	> 94 cm (H) ou > 80 cm (F)
Plus deux des critères suivants:	
- Tension artérielle	> 130/85 mm de Hg
- Triglycérides	> 1,7 mmol/L
- HDL	< 1.03 mmol/L (H) ou < 1,29 mmol/L (F)
- Glycémie à jeun	> 5,6 mmol/L

HDL: lipoprotéines à densité élevée; H: hommes; F: femmes et W/H: rapport circonférence de la taille/circonférence des hanches.

2.1.4 RÉPARTITION DES TISSUS ADIPEUX

Le professeur Jean Vague avait observé, au cours des années 1950, que les patients diabétiques obèses manifestant une adiposité abdominale importante (retrouvée principalement chez les hommes: les pommes) étaient plus susceptibles de développer des désordres reliés à l'obésité (diabète de type 2, maladies cardiovasculaires, goutte et calculs rénaux) que les patients dont l'adiposité était plutôt du type glutéofémorale (retrouvée principalement chez les femmes: les poires) (35). Il avait été également observé qu'avant la puberté, pour un même IMC, peu de différence de circonférence de taille et de rapport circonférence de taille/circonférence des hanches existe entre les garçons et les filles (36). De plus, la distribution glutéofémorale de l'obésité observée chez les femmes semble être redistribuée vers l'abdomen après la ménopause (37). Ainsi, la ménopause est associée à la disparition des effets cardioprotecteurs. Donc, les hormones sexuelles sécrétées après la puberté (et la cessation de leur sécrétion à partir de la ménopause chez la femme) semblent jouer un rôle déterminant dans la régulation de la répartition des tissus adipeux chez l'homme et la femme.

Selon leur définition du syndrome métabolique, le NCEP (circonférence de la taille) et l'OMS (rapport circonférence de taille/circonférence des hanches) utilisent des valeurs qui estiment l'adiposité viscérale. En milieu de recherche, la composition corporelle totale est couramment évaluée par la technologie DXA (*Dual-Energy X Ray Absorptiometry*), et la répartition de la masse adipeuse est déterminée par tomographie axiale ou encore, par imagerie de résonance magnétique. Ces deux dernières techniques permettent de déterminer, avec une grande précision, l'adiposité viscérale et sous-cutanée. Plusieurs méthodes d'évaluation de l'adiposité viscérale ont été rapportées dans la littérature, et la majorité des protocoles utilisés quantifient les tissus adipeux entre les vertèbres lombaires 4 et 5 par tomographie axiale (38-44).

Selon l'hypothèse de Randle, une libération excessive d'acides gras libres (AGL) peut induire une résistance à l'insuline périphérique en inhibant l'incorporation de glucose dans le muscle squelettique (45). Des études de Basu et coll. (46) et Guo et coll. (47) ont de plus révélé que l'adiposité abdominale et la présence de diabète contribuent à libérer des quantités importantes d'AGL dans la circulation.

D'autres études ont évalué l'importance de la répartition des tissus adipeux dans le développement de troubles métaboliques. Ainsi, il a été proposé par Peiris et coll. (48, 49) que la mesure de l'adiposité viscérale puisse fournir un pronostic fiable de la résistance à l'insuline, des taux de triglycérides (TG) ainsi que de la pression artérielle. De plus, Pouliot et coll. ont suggéré que l'adiposité viscérale pourrait jouer un rôle majeur dans le développement et l'évolution du syndrome métabolique (50). Plusieurs études subséquentes ont corroboré les hypothèses de Pouliot et coll., puisqu'une importante adiposité viscérale a été associée à la présence d'hyperinsulinémie (38, 39), à la résistance à l'insuline (4, 40, 41, 51-55), au diabète de type 2 (56) et aux maladies cardiovasculaires (57-61). Brochu et coll. ont également observé que, chez des obèses, une faible adiposité viscérale peut indiquer une sensibilité accrue à l'insuline (62).

2.1.5 RÉSISTANCE À L'INSULINE ET INTOLÉRANCE AU GLUCOSE

En 1988, Reaven avait émis l'hypothèse que la résistance à l'insuline pourrait être l'élément déterminant dans l'apparition des troubles reliés au syndrome métabolique ou syndrome X (6). Le *Framingham Study* et l'*Insulin Resistance Atherosclerosis Study* ou IRAS ont démontré de façon convaincante que l'hypertension est un facteur qui ne dépend pas directement de la résistance à l'insuline (63, 64). Ces résultats suggèrent donc que la résistance à l'insuline ne serait pas responsable, à elle seule, du développement des dysfonctions métaboliques. Toutefois, bien que les hypothèses de Reaven se soient avérées inexactes, la résistance à l'insuline demeure tout de même un facteur important dans la définition du syndrome métabolique.

Dans ses conclusions, l'étude NHANES III postulait que l'obésité associée au diabète pourrait favoriser le développement de l'intolérance au glucose, de l'hypertension et de la dyslipidémie, et ce, en plus d'accroître les risques de troubles microvasculaires et cardiovasculaires (64-68). Dans cette optique, un effort important a été mis de l'avant par la suite pour détecter les cas de diabète chez des patients obèses. Il a été rapporté entre autre que 83% du nombre total de cas de diabète de type 2 sont diagnostiqués au Etats-Unis au sein d'une population d'obèses morbides, avec un IMC supérieur à 35 kg/m² (69). De plus,

on a observé que 86% des sujets diabétiques, 31% des sujets intolérants au glucose et 71% des sujets hyperglycémiques à jeun sont affectés par le syndrome métabolique (70).

Est-ce l'obésité qui est à la base de la résistance à l'insuline ou est-ce plutôt le contraire? Il est généralement admis que la résistance à l'insuline augmente avec une adiposité accrue. Cependant, une importante variation de la sensibilité à l'insuline peut être observée chez des individus dont les proportions de tissus adipeux sont comparables (71). La plupart des individus dont l'IMC est supérieur à 30 kg/m² manifestent de l'hyperinsulinémie postprandiale et des taux peu élevés de sensibilité à l'insuline (72).

Des facteurs héréditaires peuvent également influencer la sensibilité à l'insuline. De fait, au sein de certaines populations asiatiques, la résistance à l'insuline est commune chez des individus dont l'IMC est inférieur à 25 kg/m² (73). Cependant, une augmentation de la masse corporelle engendre une résistance à l'insuline plus importante. De plus, il est rapporté que les afro-américains et les hispaniques courent entre 2 et 3 fois plus de risques de développer le diabète de type 2 que les caucasiens non-hispaniques (74). L'effet combiné de l'obésité et de l'hérédité sur la résistance à l'insuline et le développement du diabète de type 2 a également été observé chez des jumeaux monozygotes (75).

La technique étalon pour déterminer le degré de résistance à l'insuline est le clamp euglycémique/hyperinsulinémique ou CEH (76, 77). Cette méthode évalue la capacité d'assimilation du glucose lors d'une hyperinsulinémie constante. Ainsi, plus un sujet est résistant à l'insuline, moins de glucose lui sera administré pendant le clamp. D'autres méthodes d'évaluation du degré de résistance à l'insuline, telle HGPO (hyperglycémie provoquée oralement), et les indices de sensibilité à l'insuline, tels HOMA (modèle d'évaluation de l'homéostasie) et QUICKI (indexe quantitatif de sensibilité à l'insuline) sont également d'utilisation courante en clinique et en recherche.

2.1.6 DYSLIPIDÉMIE

Une relation très étroite est solidement établie entre l'importance de l'adiposité abdominale et la dyslipidémie. Il avait déjà été observé que l'augmentation du volume de tissus adipeux abdominaux engendre une modification du métabolisme des lipides (78). Ces changements ont été associés à une augmentation des taux de triglycérides (TG), d'apolipoprotéines B (apo-B), des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et des petites particules denses de cholestérol LDL (lipoprotéines à faible densité ou petites molécules denses de LDL), alors que les taux de cholestérol HDL (lipoprotéines à densité élevée) et de HDL₂ sont diminués (79).

2.1.6.1 TG et AGL

L'hypertriglycéridémie observée en présence d'obésité abdominale et de résistance à l'insuline est associée à une sécrétion importante de particules VLDL riches en triglycérides. Il a été rapporté que l'absorption d'une quantité importante d'AGL dans le foie stimule la sécrétion d'apo-B₁₀₀ (80). On retrouve une molécule d'apo-B₁₀₀ par molécule de LDL, de lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) et de VLDL. De plus, des effets athérogènes et des risques élevés de maladies coronariennes sont associés à des taux élevés d'apo-B₁₀₀ (81, 82). La lipase lipoprotéinique (LPL), présente dans la circulation périphérique, stimule l'hydrolyse des triglycérides présents dans les VLDL pour libérer les AGL.

2.1.6.2 LDL

Les LDL comprennent une vaste variété de formats, de densités, de compositions chimiques et de potentiels d'athérosclérose. Des taux élevés de *small dense* LDL sont associés à l'obésité abdominale, à la résistance à l'insuline, aux lipides intraabdominaux ainsi qu'à l'hypertension (80, 83, 84). Il a été rapporté que l'hypertriglycéridémie cause un enrichissement en triglycérides, combiné à un appauvrissement en cholestérol ester dans les particules de LDL. Ces modifications de la composition des LDL augmentent les risques de

développer des maladies cardiovasculaires (85-87) et sont associées à une aggravation plus ou moins sévère lors de problèmes coronariens (88-90). De plus, il a été rapporté que les particules de *small dense* LDL peuvent adhérer aux protéoglycans de la paroi artérielle avec plus d'aisance et être captées plus facilement par les macrophages que les LDL (91-93). Les informations tirées de la littérature semblent donc indiquer que l'augmentation des taux de LDL, plus spécifiquement les taux de *small dense* LDL, pourrait jouer un rôle majeur dans le développement de maladies cardiovasculaires, en stimulant la différenciation des macrophages en cellules spumeuses athérogènes.

2.1.6.3 HDL

Le métabolisme des particules de HDL est étroitement associé à celui des VLDL. Cette relation permet d'expliquer que des taux élevés de TG sont associés à des taux diminués de particules HDL. L'enzyme *cholesteryl ester transfer protein* est responsable de l'échange de TG des VLDL contre les cholesteryl esters des LDL et des HDL. La présence importante de TG dans les particules de VLDL favorise donc la formation de LDL et HDL riches en TG et, subséquemment, l'hydrolyse de ces particules par des lipases hépatiques; la formation de *small dense* LDL sera ainsi favorisée au détriment des HDL₂ (94). Il a été rapporté que les HDL₂ sont des molécules antiathérogènes; donc, la diminution de leur concentration plasmatique est considérée comme un facteur de risque cardiovasculaire. Il semble que le catabolisme des particules de HDL soit également stimulé par l'augmentation des taux de lipases au cours du processus inflammatoire (95).

2.1.6.4 Apolipoprotéines

La présence d'apolipoprotéines A-II, B, C, D et E a été associée au développement d'effets athérogènes (96). Toutefois, des taux élevés d'apoC-III correspondent à des troubles cardiovasculaires moins sévères (97). On a rapporté également que les taux de particules de VLDL, d'apoC-III (dans les particules de VLDL), et de LDL permettent un pronostic plus exact des problèmes cardiaques chroniques que ne le peuvent les TG plasmatiques (96). Des taux peu élevés d'apoA ont également été considérés comme facteurs de risque de

troubles cardiaques chroniques (98, 99). Enfin, les résultats d'une autre étude, le *Framingham Offspring Study*, ont révélé que les taux de particules résiduelles (dérivées de chylomicrons ou de VLDL) de lipoprotéines associées aux triglycérides ou au cholestérol sont plus élevés chez des hommes et des femmes diabétiques (100).

2.1.7 ADIPOCYTOKINES

Des études récentes ont postulé que les réserves adipeuses pourraient jouer un rôle endocrinien important (101, 102). Un lien étroit a en effet été établi entre l'obésité et des taux élevés de leptine, d'apeline, d'ASP (protéine stimulant l'acylation), de résistine, de TNF- α (facteur de nécrose tumorale α) et d'IL-6 (interleukine 6) (103-109).

Contrairement à la leptine, à l'apeline, à l'ASP, à la résistine, au TNF- α et à l'IL-6, l'adiponectine est sécrétée par les tissus adipeux viscéraux (en voie de différenciation) et est négativement régulée par l'obésité, la résistance à l'insuline et les taux élevés de triglycérides (110-113). Chez la souris, l'administration d'adiponectine stimule l'oxydation des lipides, diminue les AGL en circulation et les TG intracellulaires des myocytes et des hépatocytes, en plus d'augmenter la sensibilité à l'insuline (114). De plus, l'adiponectine est associée à la diminution des molécules d'adhésion vasculaire des cellules épithéliales et des cytokines inflammatoires produites par les macrophages (115). Ces derniers effets sont reliés à une diminution du degré d'athérosclérose chez des sujets présentant des taux élevés d'adiponectine.

Chez des patients diabétiques, il a été montré que l'administration d'agonistes de PPAR- γ (thiazolidinediones ou TZD) stimule la sensibilité à l'insuline, tout en favorisant l'élévation des taux d'adiponectine (116, 117). Les mêmes études ont permis d'établir que les taux d'adiponectine sont plus élevés chez les femmes que chez les hommes. Ces observations pourraient expliquer, du moins en partie, la protection cardiovasculaire présente chez la femme avant la ménopause (116, 117).

2.1.8 MARQUEURS DE L'INFLAMMATION

La sécrétion sub-chronique de certains marqueurs de l'inflammation a été associée au développement de dysfonctions reliées à l'obésité. Tel que proposé par plusieurs auteurs (118-121), une étroite association semble exister entre les facteurs du syndrome métabolique et des taux sub-chroniques élevés de cytokines pro-inflammatoires, tels CRP (protéine C-réactive), ainsi que les systèmes TNF- α et IL-6.

2.1.8.1 CRP

Le CRP est un marqueur hépatique, sensible à l'inflammation systémique, qu'on soupçonne d'être relié à l'obésité et à la résistance à l'insuline (122). De plus, des taux élevés de CRP ont été associés à des facteurs majeurs de risque de maladies cardiovasculaires, tels l'IMC, le tabagisme, l'hypertension, la consommation d'alcool, l'âge et les bas taux de HDL (123). Une association a également été faite entre la perte de poids chez des patients obèses et une diminution des taux de CRP (124, 125).

2.1.8.2 Système TNF- α et IL-6

Tel qu'évalué et revu par plusieurs auteurs (126, 127), l'expression du système TNF- α (TNF α , sTNF-R1 et sTNF-R2) par les macrophages infiltrants et dans les tissus adipeux, est également associée au développement de la résistance à l'insuline, du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires. Toutefois, les mécanismes par lesquels ces facteurs produisent leurs effets métaboliques défavorables restent encore à établir.

D'autres marqueurs de l'inflammation, tel IL-6, ont également été associés au développement de troubles métaboliques (128, 129). Toutefois, les résultats souvent contradictoires de ces études laissent soupçonner la complexité des mécanismes de régulation des facteurs impliqués. Le but du présent projet de recherche n'étant pas d'évaluer l'effet de IL-6 ou des autres marqueurs de l'inflammation sur l'apparition ou

l'évolution du syndrome métabolique, le sujet ne sera pas revu ici de façon plus approfondie.

2.1.9 AUTRES FACTEURS DE RISQUES CARDIOVASCULAIRES

2.1.9.1 Acide urique

L'obésité et la consommation d'alcool sont associées au développement de l'hyperuricémie (130). Il a été proposé par certains auteurs que l'hyperuricémie pourrait être causée, du moins en partie, par la résistance à l'insuline, et que des taux élevés d'acide urique seraient intimement reliés aux maladies et à la morbidité cardiovasculaires (130-132).

2.1.9.2 Facteurs de coagulation et de fibrinolyse

L'obésité (abdominale), le syndrome métabolique, l'hypertension, le tabagisme et l'âge accompagnent généralement une réduction de la fibrinolyse et l'activation du système de coagulation (133-137). Kohler a rapporté récemment que la résistance à l'insuline est associée aux phénomènes reliés à l'aggrégation de facteurs thrombotiques, telle la suppression de la fibrinolyse et, conséquemment, à des taux élevés de PAI-1 (inhibiteur de l'activateur de plasminogène 1), de facteurs VII et IX, de fibrinogène et de facteur de von Willebrand (135). De plus, Rissanen et coll. ont rapporté que la coagulabilité et la fibrinolyse sont améliorées et que l'activité de PAI-1 et du facteur VII diminue suite à une réduction de la masse pondérale chez des femmes obèses (138).

2.1.9.3 Facteurs de stimulation de l'hypertension

L'obésité est associée à une réduction de la bioactivité du monoxyde d'azote (NO), un facteur anti-athérogène et anti-thrombotique présent dans les cellules de l'endothélium

(139). Des taux élevés de ROS (espèces réactives à l'oxygène) peuvent entrer en réaction avec NO et conduire au diabète de type 2, à l'athérosclérose, à l'hypertension et même à l'arrêt cardiaque (140-142).

On a rapporté que l'insuline peut exercer divers effets sur la tension artérielle, provoquant la vasoconstriction par l'activation du système nerveux sympathique (143, 144) ou induisant la production du peptide ET-1 (endotheline-1) (145). D'autre part, le peptide Ang II (Angiotensine II) a été reconnu pour promouvoir l'inflammation vasculaire, entre autre chez des sujets obèses et/ou souffrant du syndrome métabolique (146-149). De plus, l'administration de Ang II dans l'aorte de souris diminue l'expression des PPAR α et PPAR γ (récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes α et γ) (150). Toutefois, on a observé, lors de cette même administration de Ang II, qu'on stimulait également la transcription de MCP-1 (protéine chimotactique de monocytes 1), de M-CSF (facteur stimulant la colonie de macrophages), de *E-Selectin* (sélectine endothéliale), de ICAM-1 (molécule d'adhésion intracellulaire 1), de VCAM-1 (molécule d'adhésion vasculaire 1), de iNOS (synthase d'oxyde nitrique inductible), et de COX-2 (cyclooxygénase-2) dans l'aorte, favorisant ainsi la vasoconstriction. Ces observations semblent donc indiquer que Ang II pourrait jouer un rôle dans les pathologies associées au syndrome métabolique.

2.1.10 SYNTHÈSE DE LA SECTION SUR LE SYNDROME MÉTABOLIQUE

Tel que décrit à la Section 2.1, le développement du syndrome métabolique est associé à de multiples facteurs pouvant interagir entre eux, et ce de façon directe ou indirecte. Bien que sa définition, ses causes et ses conséquences aient été constamment documentées, particulièrement au cours des vingt dernières années, il n'en demeure pas moins qu'un nombre considérable de mécanismes, de facteurs et d'interactions sont encore mal connus ou compris et restent à être élucidés.

2.2 GHRÉLINE: ISOLATION, CARACTÉRISATION ET PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Au début des années 1980, Bowers et coll. ont rapporté que des peptides synthétiques, en particulier l'analogue de l'enképhaline Tyr-D-Trp-Gly-Phe-Met-NH₂, pouvaient induire la sécrétion d'hormone de croissance (GH) dans des cultures primaires de cellules hypophysaires antérieures (151). Plus de quinze années après cette observation fondamentale de Bowers qui mettait en évidence l'existence des GHRP (peptides de libération de l'hormone de croissance), le récepteur responsable de l'activité biologique de ces GHRP, le GHS-R1a (récepteur GHS 1a), était enfin isolé par une équipe de recherche de la compagnie pharmaceutique Merck (152). En dépit de l'intérêt croissant dont il était l'objet, le GHS-R1a n'était toujours qu'un récepteur orphelin, jusqu'à la découverte de la ghréline par Kangawa et coll. en 1999 (153). La ghréline, un peptide linéaire de 28 acides aminés isolé principalement de l'estomac des mammifères, est maintenant reconnue comme étant le ligand endogène du GHS-R1a.

2.2.1 GHS-R

Une fois publiées la synthèse et l'activité biologique du premier GHRP, actif *in vitro*, mais pas *in vivo* (154), il s'est écoulé quelques années avant que Bowers et coll. ne puissent mettre au point un analogue capable de stimuler la sécrétion d'hormone de croissance (GH) *in vivo* (155, 156). Suite à de laborieuses études de structure-activité impliquant la synthèse de plusieurs dizaines d'analogues, le peptide His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂, désigné sous l'acronyme GHRP-6, fut obtenu. Ce peptide stimulait une fonction somatotrope *in vitro* et *in vivo* (155), supportant l'hypothèse qu'une nouvelle classe de récepteurs, dont l'activation provoquerait la sécrétion de GH, pouvait exister.

Suite aux travaux de Bowers, plusieurs groupes de recherche ont déployé des efforts considérables pour isoler le récepteur induisant l'activité biologique des GHRPs. C'est ainsi

que le groupe de Roy Smith chez Merck est parvenu à isoler et à cloner le récepteur GHS-R (*Growth Hormone Secretagogue Receptor*), à partir de cellules hypophysaires de porc (152). Cette preuve convaincante de l'existence d'un récepteur pour GHRP et les secrétagogues de la GH fut publiée dans la revue *Science* (152, 157). Le groupe de Merck décrit GHS-R comme étant un récepteur distinct de celui du GHRH-R (*Growth Hormone Releasing Factor*), faisant partie de la famille des récepteurs couplés à une protéine G (152). Des études subséquentes ont démontré que la séquence du récepteur est fortement conservée chez l'humain, le chimpanzé, le porc, le bovin et les rongeurs (152). On observa également qu'une mutation dans les domaines transmembranaires 2,3 ou 5,6 affectait la liaison du GHRP et l'activation du GHS-R (152, 158, 159).

En se basant sur ces études, le groupe de Merck était désormais en mesure de développer des modèles tridimensionnels du GHS-R conduisant à la synthèse d'une série d'analogues (agonistes) non-peptidiques des GHRP. La mise au point de tels analogues était requise pour éviter les problèmes de dégradation rapide et de biodisponibilité inhérents aux voies d'administration des peptides, en vue de créer une nouvelle classe de médicaments pouvant interagir avec GHS-R. Ainsi, des molécules de type spiropiperidines et benzolactames, capables de stimuler la sécrétion de GH, ont été synthétisées et comparées avec le GHRP (160). Dans un même ordre d'idée, des ligands peptidomimétiques radioactifs, tel le composé MK-0677, ont été synthétisés par les chercheurs de Merck et utilisés pour déterminer l'affinité de liaison sur des préparations membranaires hypophysaires et hypothalamiques (157, 161).

Des études chez l'humain et chez le porc ont permis d'identifier deux types du récepteur GHS-R, soient GHS-R1a (366 aa) et GHS-R1b (289 aa). Le premier type, 1a, possède une séquence transmembranaire 7 complète, alors que le 1b comporte des délétions dans les séquences transmembranaires 6 et 7 (152, 158). Howard et coll. ont également rapporté que les secrétagogues de la GH se lient spécifiquement à GHS-R1a pour induire une réponse, alors que GHS-R1b ne semble pas avoir d'affinité pour ces ligands (152).

Bien que GHS-R ait été cloné et caractérisé à partir de cellules hypophysaires, des études subséquentes ont permis de le détecter dans différents autres organes et tissus. Ainsi, Tannenbaum et coll. (162) ont rapporté l'expression du GHS-R dans les neurones sécrétant

le GHRH du noyau arqué et ventromédian de l'hypothalamus, tandis que des études plus générales ont décrit la présence du type 1a (ARNm et/ou protéine) dans des tissus hypophysaires, hypothalamiques, de l'hippocampe, thyroïdiens, pancréatiques, de la rate, myocardiques, surrénaliens, testiculaires, aortiques, pulmonaires, ovariens, hépatiques, adipeux, musculaires, rénaux, veineux, artériels, utérins et de la peau (158, 162-166). Ces résultats suggèrent que l'activation du GHS-R1a peut induire des effets biologiques importants et diversifiés selon la nature et la fonction des tissus. De plus, l'expression du récepteur GHS-R1b a été localisée dans tous les tissus étudiés (164).

Les effets de la régulation de l'expression du GHS-R1a ont été étudiés par Petersenn et coll. (167). Bien que la somatostatine et l'IGF-I n'aient causé aucun effet, l'hormone thyroïdienne (T_3), les agonistes du GHRH (168, 169) et l'œstrogène stimulent l'expression du GHS-R1a dans l'hypophyse (167). Il a été également rapporté que des taux élevés de GH ou de glucocorticoïdes inhibent l'expression du récepteur (167, 170-172).

2.2.1.1 Mécanismes de signalisation du GHS-R1a

À ce jour, alors que les réponses en GH résultant de l'activation du récepteur GHS-R1a ont été décrites dans la littérature, les mécanismes de cette activation ne font que commencer à être élucidés. Par exemple, le GHRP-6 active l'expression de Pit-1 (facteur de transcription hypophysaire 1) requis pour l'expression de la GH hypophysaire (173). Ces observations indiquent que l'activation du récepteur GHS-R1a par les sécrétagogues de la GH augmente les taux du facteur de transcription Pit-1 et favorise indirectement la synthèse de GH.

De plus, la liaison du GHS-R1a à son ligand active la phospholipase C, qui hydrolyse le phosphatidyl-inositol-4,5-biphosphate de la membrane plasmique afin de produire du DAG (diacylglycerol) et de l' IP_3 (inositol triphosphate). L'activité du GHS-R1a implique l'activation du système PKC, ce qui provoque à la fois la fermeture des canaux potassiques et l'ouverture, par dépolarisation, des canaux calciques de type L dépendants du voltage (157, 174). Ultiment, cette voie favorise l'élévation des concentrations de CI (calcium intracellulaire). Il a également été proposé que IP_3 stimule la fusion des granules contenant la GH pour en favoriser l'exocytose (157). De plus, certaines observations indiquent que

l'administration d'agonistes de GHS-R1a pourrait favoriser l'augmentation des taux d'AMPC par l'activation de l'adénylate cyclase (175).

Des études récentes ont également rapporté que la ghréline agit comme agent anti-apoptotique et proliférateur. Plus spécifiquement, ces effets seraient modulés par l'activation de signaux de transcription, tels MAPK (protéine kinase activée par des agents mitogènes), ERK1/2 (kinase sous contrôle du signal extracellulaire 1/2), IRS-1 (substrat du récepteur de l'insuline 1), PKC (protéine kinase C) ou PI3K (kinase de phosphatidylinositol 3) (176-178). Bien que certains éléments de la signalisation de l'activation du GHS-R1a aient été rapportés, de nombreux mécanismes restent à être éclaircis.

2.2.2 ISOLATION ET CARACTÉRISATION DE LA GHRÉLINE

La découverte de la ghréline par Kojima et coll. en 1999 a fourni la preuve ultime de l'existence d'un ligand endogène pour le récepteur GHS-R1a (153). Pour y arriver, ils ont tout d'abord développé une souche stable de cellules d'ovaires de hamster chinois, CHO-GHSR62, capable d'exprimer le récepteur GHS-R1a de rat, pour ensuite évaluer les changements de CI en présence d'extraits de tissus provenant du cerveau, des poumons, du cœur, des reins, de l'estomac et des intestins de rats. Suite à leur observation d'une plus grande variation de CI en présence d'échantillons d'estomacs de rats, ils ont purifié ces extraits pour obtenir des fractions qu'ils ont mis en présence de cellules CHO-GHSR62 pour en évaluer la capacité à stimuler la sécrétion de GH. Les analyses par spectrométrie de masse ont permis de déterminer que l'échantillon manifestant l'activité biologique la plus importante contenait une molécule d'origine peptidique dont le poids moléculaire était de 3314,9 dalton. Les études de séquençage ont confirmé que ce peptide possédait une séquence de 28 acides aminés (GSXFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR), dont le troisième à partir de la glycine N-terminale, (identifié ici comme X) était inconnu.

L'identité de l'acide aminé inconnu X a été révélée par Kojima et coll. (153) comme étant un dérivé de sérine. Les données, recueillies à la fois de la reconstitution de la nouvelle

substance ainsi isolée par synthèse peptidique et des résultats de spectrométrie de masse, révélèrent que le résidu X était en fait une sérine estérifiée sur son groupe hydroxyle par l'acide octanoïque. Le peptide isolé possédait une masse moléculaire de 3314,9 dalton, comparativement à 3189 dalton pour le peptide non-acylé de rat. De plus, Kojima et coll. (153) démontrèrent que ce groupe acyl était essentiel à l'activité de la ghréline sur la sécrétion de GH *in vitro*.

La ghréline représentait donc le premier exemple d'un peptide contenant une chaîne latérale dont la fonction hydroxyle était modifiée par un mécanisme d'acylation post-traductionnelle. De plus, cette modification conférait au peptide un caractère hydrophobe inédit et venait expliquer, du moins en partie, les propriétés particulières des sécrétagogues de type GHRPs connus depuis les premiers travaux de Bowers (179), dont le caractère hydrophobe était essentiel à l'activité biologique. Toutefois, le mécanisme cellulaire qui permet l'acylation de la ghréline n'a pas encore été élucidé.

La confirmation de la structure moléculaire de la ghréline a également été fournie par le groupe de Kojima (153), qui a effectué la synthèse totale du peptide acylé sur la sérine en position 3 ([O-*n*-octanoyl-Ser³]). À l'image de l'isolation initiale du peptide, la caractérisation du peptide synthétique a été effectuée au moyen d'analyses chimique, biochimique, pharmacologique et physiologique (sécrétion de GH *in vitro*). Tous ces résultats reproduisaient exactement ceux obtenus avec le peptide naturel, confirmant ainsi son identité (153).

2.2.2.1 Phylogénie de la ghréline

Les travaux subséquents de Kojima et coll. ont permis de déterminer la séquence de la prépro-ghréline de rat, un peptide de 117 résidus montrant 82,9% d'homologie avec l'ADNc d'origine humaine. Les différences entre la séquence humaine et celle du rat se retrouvent aux acides aminés en positions 11 et 12 de la ghréline. Ainsi donc, le groupe de Kojima et coll. a rapporté un poids de 3371,9 dalton et de 3244,7 dalton, respectivement, pour les séquences de ghréline acylée et non-acylée humaine. Il est possible d'observer l'homologie entre ces séquences à partir des informations tirées de Genbank, où les résidus

encadrés en gris correspondent à la ghréline, et ceux en caractères gras indiquent les différences entre les espèces (h-ghréline, numéro d'accès de la séquence ADNc et de protéine: AB029434; r-ghréline, numéro d'accès de la séquence d'ADNc et de protéine: AB029433):

Humain	1	MPSPGTVCSLLLLGMLWDLAMA	GSSP	30
Rat	1	MVSSATICSLLLLSMLWMDMAMA	GSSP	30
Humain	31	EHIQRYVOQRNE	SKKPPAKLQPR	60
Rat	31	EHIQKAGQQRKE	SKKPPAKLQPR	60
Humain	61	DGGQAEGAEDELEVRFNAPFDVGIKLSGVQ		90
Rat	61	DRGQAEEAEELEIRFNAPFDVGIKLSGAQ		90
Humain	91	YQQHSQALGKFLQDILWEEAKEAPADK	117	
Rat	91	YQQHGRALGKFLQDILWEEVKEAPANK	117	

D'autre part, les séquences d'ADN génomique correspondant à la ghréline humaine (numéro d'accès Genbank: AF296558; (180)), de souris (AB060078; (181)), de dindon (AY497549; (182)) et de singe rhésus (AY372274; (183)) ont été complètement déterminées.

Bien que la séquence d'acides aminés de la ghréline soit remarquablement conservée chez ces espèces, il existe tout de même entre elles certaines variations. Ainsi, Hosoda et coll. (184) ont isolé et caractérisé la [des-Gln¹⁴]-ghréline chez le rat, résultat probable d'un épissage alternatif du gène de la ghréline. De plus, l'isolation de la ghréline chez la grenouille a permis de caractériser des formes inédites du peptide, dont une où la thréonine remplace la sérine en position 3 (185).

2.2.2.2 Études de structure-activité de la ghréline

Afin de mieux comprendre l'activité de la ghréline et la nature de sa liaison avec le récepteur GHS-R, plusieurs études de structure-activité impliquant des analogues synthétiques ont été effectuées. Ainsi, Bednarek et coll. (186) ont étudié la liaison spécifique de la ghréline avec le récepteur GHS-R en fonction de différents paramètres structuraux du peptide. Ces variations impliquaient la nature de la chaîne aliphatique, la nature du lien unissant le groupe aliphatique à la Ser³, la position du groupe octanoyl sur les différentes sérines (positions 2, 3, 6 et 18) du peptide, ainsi que la longueur de la chaîne peptidique elle-même. De ces études, il ressort que la liaison des analogues de ghréline au récepteur GHS-R est peu ou pas affectée par la longueur de la chaîne aliphatique, qui peut varier de C₆ à C₁₆ (186, 187), la nature du lien (amide ou ester) unissant Ser³ à la chaîne aliphatique (186) ou encore la longueur de la chaîne peptidique N-terminale. Dans cette dernière série d'analogues, des fragments octanoylés N-terminaux ne comprenant que les quatre premiers acides aminés GSSF peuvent encore se lier au récepteur GHS-R (186, 187). Par contre la position du groupe octanoyl sur la chaîne de la ghréline apparaît comme un facteur déterminant pour sa liaison spécifique avec le récepteur (187).

Matsumoto et coll. (187, 188) ont décrit la plus petite forme d'analogue de ghréline biologiquement active (*in vitro*) comme étant le 5-aminopentanoyl-Ser(Octanoyl)-Phe-Leu-aminoethylamide. Les propriétés de cet analogue indiquent l'importance des deux premiers résidus quant à l'espacement entre le groupe N-terminal et le groupe *n*-octanoyl (188). Un modèle *in vivo* chez le rat a permis de démontrer qu'on peut remplacer Ser³-*n*-octanoyl par Cys³-*n*-octanoyl (187). Ceci montre que l'oxygène ou le soufre peuvent tout aussi bien être liés au groupe aliphatique pour permettre la stimulation de la sécrétion de GH par la ghréline chez le rat (187). L'analyse de la structure tridimensionnelle de la ghréline naturelle et du fragment 1-5 de ghréline par résonance magnétique nucléaire tend à démontrer qu'il existe une analogie structurale importante entre la portion N-terminale du peptide et le GHRP-6, analogie observée également par des études parallèles de modelage. Il est toutefois impossible de déduire, à partir de ces modèles, la nature de la liaison entre la ghréline et le récepteur GHS-R1a (189).

Des études récentes tendent à démontrer que la ghréline peut également se lier à un ou plusieurs autres récepteurs que GHS-R1a. En effet, il a été observé qu'à des concentrations sensiblement similaires, les deux formes, acylée et non-acylée, de la ghréline peuvent se lier à des cellules n'exprimant pas le récepteur GHS-R1a (190-194). On a rapporté également que la forme de ghréline non-acylée est capable d'autres activités biologiques, telles que l'inhibition de l'apoptose des cardiomyocytes, la lipolyse des adipocytes et la libération hépatique de glucose, et ce malgré la non-expression de GHS-R1a dans ces lignées cellulaires (177, 195-200).

De plus, des sécrétagogues de GH, l'adénosine et la cortistatine, sont des agonistes partiels de GHS-R1a. Ainsi, l'adénosine élève la concentration de CI sans stimuler la sécrétion de GH (201, 202), alors que la cortistatine atténue les effets biologiques subséquents à l'activation du récepteur GHS-R1a de l'hypophyse en bloquant les sites de liaison (202-206).

2.2.2.3 Niveau d'expression et distribution de la ghréline

La mise au point de troupes de radioimmunoétalonnage (RIA) commerciales, qui a suivi de peu la découverte de la ghréline, a permis à un grand nombre de laboratoires à travers le monde d'en mesurer les concentrations *in vitro*, dans différents tissus et organes, ainsi que *in vivo*, chez des animaux de laboratoire, des sujets humains normaux ou des patients présentant différentes pathologies. Toutefois, des troupes RIA plus spécifiques, permettant de distinguer entre les formes de ghréline acylée et non-acylée, n'ont été développées et commercialisées que plus récemment. Ainsi, la distinction entre les concentrations des deux formes n'a été évaluée que dans un nombre restreint d'études. Les paragraphes suivants résument les résultats des mesures des taux d'expression et des concentrations plasmatiques de ghréline recensés jusqu'à maintenant dans la littérature.

Chez l'humain, la séquence du promoteur du gène de ghréline est retrouvée en amont, entre les paires de bases -667 et -468, et inclue l'exon 1 non codé et l'intron 1 en 5'. Bien que la ghréline ait été isolée à partir d'extraits d'estomacs de rats (153), l'ARNm et la protéine ont été localisés par hybridation histochimique *in situ*, RT-PCR et microscopie électronique

immunohistochimique dans des cellules X/A-semblables (*X/A-like*) chez le rat (207), dans des cellules entériques endocrines chez l'humain et le rat, ainsi que dans des glomérules de souris et de rat (208). Dans l'estomac, les cellules X/A-semblables, qui sont rondes ou ovoïdes, n'ont aucun contact direct avec la lumière, mais sont disposées à proximité des capillaires (207, 209). La ghréline est principalement sécrétée dans le fundus de l'estomac, plus précisément par la glande oxyntique, mais pas dans la région pylorique. Bien que la concentration la plus élevée de ghréline soit retrouvée dans l'estomac, on a observé que des quantités non négligeables ($\approx 30\%$ de la quantité produite dans l'estomac) sont aussi produites par l'intestin grêle (210-212). Contrairement aux cellules X/A-semblables de l'estomac, les cellules immunoréactives à la ghréline de la partie inférieure du tractus GI sont en contact direct ou non avec la lumière (213).

L'expression de prépro-ghréline (ARNm et protéine) est détectée dans plusieurs régions du système nerveux central, telles le noyau arqué, le noyau ventromédial, le noyau dorsomédial, le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ainsi que dans l'hypothalamus latéral, l'hypophyse, la couche épendyme du troisième ventricule, la stria terminalis, l'amygdala, le thalamus et l'habenula (153, 214-216).

En plus du tractus GI et du système nerveux central, l'expression de l'ARNm de ghréline est également observée dans des cellules du système immunitaire (217, 218), des poumons (219), du placenta (220), des ovaires (221, 222), des reins (208), ainsi que dans les cellules pancréatiques α , β et ϵ (223-226).

L'expression de la ghréline pourrait également être impliquée dans la pathophysiologie de certains cancers. En effet, l'ARNm de ghréline a été détecté dans des tissus tumoraux tels les adénomes hypophysaires, les tumeurs neuroendocrines, les carcinomes thyroïdiens et médullaires thyroïdiens ainsi que dans des tumeurs endocrines du pancréas et des poumons (215, 227-232). Les effets biologiques de la ghréline, tels que la stimulation de la sécrétion de GH et l'augmentation de la prise alimentaire, pourraient ainsi favoriser la croissance de tissus tumoraux.

Chez l'humain, l'expression de l'ARNm de ghréline a été étudiée dans des cellules de Leydig des testicules de mâles adultes (233). D'ailleurs, une forme de ghréline, désignée

comme transcrit-dérivé-du-gène-de-ghréline (*ghrelin gene-derived transcript*), est produite exclusivement dans les testicules de souris (234). Cette forme correspond exactement aux 252 paires de bases de l'ADNc de la ghréline (de souris), auxquelles sont ajoutées 68 paires de bases 5' (234). Tanaka et coll. ont décrit, pour le transcrit-dérivé-du-gène-de-ghréline, l'addition de 12 acides aminés en C-terminal de la séquence de ghréline de souris, qui en comporte donc 54 au total (234).

Puisque l'un des effets biologiques majeurs de la ghréline est de stimuler la sécrétion de GH hypophysaire, l'expression du gène chez le rat en croissance a été étudiée. Les taux d'ARNm de ghréline dans l'estomac atteignent un minimum vers 9 jours et se stabilisent autour de 40 jours (post-natal), autant chez le rat mâle que chez la femelle (235). L'ovariectomie ou la castration n'ont pas modifié les taux d'ARNm gastrique de ghréline en fonction de l'âge chez le rat, ce qui suggère que, chez cette espèce du moins, l'expression de la ghréline dans l'estomac est dépendante de l'âge, du sexe et non de la maturité sexuelle (235, 236).

La disponibilité de deux troupes RIA distinctes, capables de reconnaître spécifiquement la séquence N-terminale (partie octanoylée) et la séquence C-terminale ont permis d'évaluer la concentration et la distribution de ghréline chez le rat (237). C'est suite à l'intérêt scientifique suscité par la découverte de la ghréline que des sociétés biopharmaceutiques telles Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, USA) et Linco Research (St-Charles, MO, USA) ont développé des troupes RIA commerciales permettant de doser les taux de ghréline totale (acylée + non-acylée) et acylée chez différentes espèces, et dans diverses pathologies.

Ces techniques ont d'ailleurs permis de confirmer la présence de ghréline octanoylée chez le rat, dans l'estomac ($377,31 \pm 55,83$ fmol/mg de tissus humide), le duodénum ($20,57 \pm 0,69$ fmol/mg de tissus humide), le jéjunum ($10,73 \pm 5,44$ fmol/mg de tissus humide) et le plasma sanguin ($4,02 \pm 1,91$ fmol/mL) (237). Chez la souris, la présence de ghréline est plus importante dans les tissus rénaux ($6,79 \pm 0,48$ fmol/mg) que dans le plasma sanguin ($0,339 \pm 0,029$ fmol/mL) (208), alors que chez l'humain, la concentration normale de ghréline dans le plasma à jeun est évaluée à $166,0 \pm 10,1$ fmol/mL (≈ 560 pg/mL) (210).

Dans ce cas, ces taux peuvent varier selon la nature et la période de la dernière prise alimentaire d'un individu.

Certaines activités biologiques de la ghréline étant reliées directement à la présence du groupe *n*-octanoyl sur Ser³, la présence des deux formes de ghréline a été étudiée chez le rat (237). Dans les tissus analysés et dans le plasma sanguin, entre 85% et 90% de la ghréline se retrouve sous la forme non-acylée (207, 237). La présence d'une faible proportion de ghréline acylée par rapport à celles de ghréline totale chez le rat soulève l'hypothèse que des mécanismes biochimiques d'importance stratégique pourraient permettre de contrôler le rapport ghréline acylée/non-acylée chez les mammifères, dans le contexte de l'homéostasie post-prandiale. Bien que les mécanismes d'acylation n'aient pas été démontrés, la lysophospholipase I (238) et la carboxylestérase (239) chez le rat, ainsi que la paraoxonase I associée aux molécules de HDL chez l'humain (240), pourraient induire la désacylation de la ghréline en circulation.

2.2.3 EFFETS BIOLOGIQUES DE LA GHRÉLINE

2.2.3.1 Effets de la ghréline sur la prise alimentaire

La régulation de l'apport alimentaire est le résultat de l'intégration, au niveau du système nerveux central (SNC), de signaux centraux et périphériques complexes qui reflètent l'état métabolique. Les repas sont initiés, maintenus et terminés en fonction de ces différents signaux, émis à plusieurs reprises chaque jour. Des signaux résultants de plusieurs taux physiologiques peuvent interagir dans la régulation de l'apport alimentaire. Ces signaux peuvent provenir de facteurs centraux, gastro-intestinaux (GI), adipocytaires, ou varier selon les taux plasmatiques de certains macronutriments. Suite à leur intégration, ces signaux génèrent une réponse centrale et/ou périphérique, de façon aiguë et/ou chronique.

Des études effectuées chez le rat ou la souris ont permis de mesurer les effets de sécrétagogues de la GH, tels les GHRP et les peptidomimétiques, sur la stimulation de la prise alimentaire (241-247). L'isolation du peptide ghréline a permis d'étudier son effet, non seulement sur la sécrétion de GH, mais aussi sur l'appétit et le gain de poids. D'autre part, des études chez l'humain et chez le rat ont rapporté l'apparition d'effets orexigéniques comparables à ceux observés suite à l'administration d'autres sécrétagogues de la GH (248-254). Au contraire, Furuse et coll. (255) ont observé que, chez les poussins, l'administration de ghréline causait plutôt une diminution de la prise alimentaire.

Les mécanismes de contrôle des effets de la ghréline sur la prise alimentaire ont aussi fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières années. Ainsi, on a montré récemment que le récepteur GHS-R1a était présent dans le noyau arqué (ARC) et le noyau ventromédial de l'hypothalamus, ainsi que dans l'hypophyse (246). Les premiers effets orexigéniques de la ghréline administrée en périphérie ou intracérébro-ventriculaire (icv) ont été observés chez le rat, peu après sa découverte (249, 250). On obtenait plus récemment des effets similaires chez l'humain (256). Les effets orexigéniques de la ghréline sont principalement reliés aux noyaux ARC, latéraux (LHA) et paraventriculaires (PVN) de l'hypothalamus (245, 248, 257-274). En plus de la stimulation de l'appétit lors de son administration chez l'humain, les concentrations préprandiales de ghréline sont positivement corrélées au degré d'intensité de l'appétit (*hunger scores*). Ces données renforcent l'hypothèse que la ghréline est impliquée de façon importante dans le mécanisme d'initiation de la prise alimentaire (275).

L'activité orexigénique de la ghréline correspond à une expression accrue des protéines c-Fos et Egr-1, des marqueurs de l'activité cellulaire dans les neurones sécrétant le neuropeptide Y ou NPY (245, 257, 259). Un des mécanismes de stimulation de l'appétit induit par la ghréline impliquerait la modulation positive de l'expression d'ARNm des facteurs orexigènes NPY et AGRP (Protéine associée Agouti), ainsi qu'une diminution de l'expression des agents anorexigènes POMC (proopiomelanocortine) et CART (transcrit sous contrôle de cocaïne et d'amphétamine) dans le noyau ARC de l'hypothalamus (248, 261, 276, 277).

Un second mécanisme de contrôle de l'appétit a été étudié. Contrairement au NPY, qui est reconnu pour ses effets orexigènes, la leptine, une adipokine, diminue l'appétit. Toshinai et coll. (278) ont observé que, lors de l'administration de leptine chez le rat, le niveau d'expression de l'ARNm de ghréline dans l'estomac augmente. Enfin, Bagnasco et coll. (265) ont démontré que, chez le rat nourri *ad libitum*, la sécrétion de ghréline et de leptine est pulsatile et que les concentrations plasmatiques respectives des deux peptides sont inversement proportionnelles. De plus, d'autres facteurs anorexigènes principalement dérivés du tractus GI ont été récemment observés. De telle sorte que les facteurs hormonaux tels CCK (273), GLP-1 (tel que revu par (279)), OXM (280, 281), PYY₃₋₃₆ (Peptide YY 3-36) (272, 282), Urocortine-1 (283, 284) et les inhibiteurs de la synthèse de monoxyde d'azote ou NOS (285, 286) inhibent l'activité orexigène de la ghréline. Une hausse significative des taux plasmatiques de ghréline a été observée entre 60 et 120 min suivant une prise alimentaire (210, 249, 287-289). Il a été rapporté que cette augmentation des concentrations de ghréline est inversement proportionnelle au contenu calorique ingéré (290). D'autre part, chez le rat, les concentrations sanguines de ghréline varient selon le contenu en macronutriments ingéré et la période écoulée depuis la dernière prise alimentaire (291).

Ariyasu et coll. ont aussi observé une diminution de 35% de la concentration de ghréline dans le plasma, immédiatement après une prise alimentaire normale chez des patients ayant subi une gastrectomie complète, alors que, chez des sujets normaux, cette diminution n'était que de 22% (210). Toutefois, chez des individus normaux, le niveau de ghréline dans le plasma a augmenté de 31% lors d'un jeûne de 12 heures (210). La ghréline serait la principale cause de la sécrétion accrue de GH chez l'homme lors d'un jeûne de 3 jours (292). Chez des patients anorexiques, les taux de ghréline mesurés dans le plasma sanguin peuvent correspondre au double des taux mesurés chez des sujets normaux (210). Ces données soulignent l'importance de l'estomac, ainsi que de l'état d'alimentation, comme facteurs déterminants de la régulation des concentrations de ghréline en circulation chez l'homme.

Quels sont les facteurs qui influencent la baisse des taux de ghréline suite à une prise alimentaire? Chez des rongeurs à jeun, les taux de ghréline diminuent suite à l'administration d'une solution glucosée directement dans l'estomac, alors que le même

volume d'eau ne cause aucun effet (249). De plus, la vidange gastrique semble nécessaire à l'inhibition des taux endogènes de ghréline après un repas (293). Chez l'humain, plusieurs questions restent encore à élucider afin d'évaluer quels sont les macronutriments les plus enclins à influencer le degré d'inhibition postprandiale des taux de ghréline. Il semble toutefois y avoir consensus que la consommation d'aliments riches en glucose et en lipides induise les diminutions les plus importantes des taux de ghréline (294). Par contre, les niveaux de ghréline ont été affectés positivement chez l'humain (236, 295) et négativement chez le rat (294), suite à l'ingestion de repas-tests riches en protéines. De façon similaire aux repas riches en protéines, il semble que le fructose ne puisse induire de réduction des taux postprandiaux de ghréline (296) .

Il a été postulé que l'apport énergétique peut causer la diminution des taux de ghréline. Une étude basée sur des déjeûners-tests avec différents apports caloriques (entre 7,5 et 33% de l'apport calorique total quotidien) a démontré que les taux de ghréline sont abaissés de façon plus importante lors de l'ingestion d'un repas à haute teneur énergétique (290).

Entre deux prises alimentaires, une hausse significative des taux d'expression d'ARNm de ghréline a été observée dans le tractus GI, sans toutefois être détectée dans l'hypophyse ou dans l'hypothalamus (297). Cette hausse d'expression se traduit par l'augmentation correspondante des taux plasmatiques de ghréline chez l'humain, le rat ou la souris, alors que l'ingestion d'un repas induit une baisse de la concentration de l'hormone (278, 287, 292, 298). Les taux de ghréline les plus élevés ont été observés juste avant une prise alimentaire chez des sujets humains, alors qu'une élévation moins importante est également détectable pendant la nuit entre 02h00 et 04h00 (288). De façon surprenante, les taux de ghréline plasmatique n'ont pas été altérés par 3 jours de jeûne intégral chez l'humain (299). Toutes ces observations regroupées semblent indiquer que les concentrations plasmatiques de ghréline sont diminuées suite à une prise alimentaire, et non pas augmentées par le jeûne. En d'autres termes, l'élévation des taux de ghréline pourrait influencer l'appétit de façon aiguë et non chronique.

Bien qu'un effet significatif de la nature des apports alimentaires semble influencer les taux de ghréline en circulation, plusieurs questions restent sans réponse en vue d'expliquer la nature des mécanismes de contrôle. Entre autre, des liens possibles existent avec la

distension gastrique par rapport au rapport énergie/volume des aliments, les interactions avec les nombreuses hormones dérivées du tractus GI, responsables de la régulation de l'appétit et, finalement, l'état des réserves énergétiques des cellules musculaires ou adipocytaires, qui pourraient expliquer les fluctuations des taux de ghréline de façon aiguë et chronique.

2.2.3.2 Ghréline et obésité

Bien que l'implication de la ghréline en tant que signal aigu d'initiation de l'appétit soit généralement admise, on se questionne toujours sur son rôle dans les mécanismes de régulation de la masse corporelle par le biais des réserves énergétiques. Chez les personnes obèses, les taux sanguins de ghréline sont plus faibles que chez des sujets ayant un poids santé (298, 300, 301). Dans la même optique, on a observé que, chez l'humain, la perte de poids provoque une augmentation des taux de ghréline en circulation (288, 302). De même, la privation ou la restriction alimentaire, ainsi que l'anorexie causées par certaines pathologies peuvent également causer une augmentation des taux de ghréline endogène, alors que, avec la normalisation de poids, ces taux tendent à revenir à la normale (302-306). On est alors en mesure de justifier si les fluctuations des concentrations circulantes de ghréline se produisent selon l'état nutritionnel ou plutôt en fonction des apports et des réserves énergétiques? Deux études de perte de poids indiquent que les taux de ghréline ne sont pas affectés par l'exercice physique (307, 308). Suite à un entraînement chronique, une hausse des taux de ghréline a été observée chez les sujets dont la masse corporelle avait diminué, alors qu'aucune fluctuation des concentrations de ghréline n'a été détectée chez les individus dont le poids est demeuré constant.

La chirurgie de réduction de l'estomac représente un modèle intéressant pour étudier les fluctuations des taux de ghréline résultant d'une perte de poids. Entre autre, une de ces techniques, connue sous le nom de déviation gastrique de Roux-en-Y est reconnue, avec un succès d'environ 35% de perte de poids durable, comme étant l'une des plus efficaces pour permettre de réduire la masse corporelle de patients souffrant d'obésité morbide.

Cummings et coll. ont été les premiers à mesurer les taux de ghréline après la réduction gastrique chez des sujets obèses (288). Suite à la procédure, contre toute attente, et malgré une réduction importante de la masse corporelle, une diminution significative des taux de ghréline a pu être observée (288). De plus, la chirurgie a semblé également affecter le profil général de sécrétion de ghréline en inhibant les pics postprandiaux, caractéristiques de l'effet initiateur de l'appétit (288). Bien que des études cliniques subséquentes aient pu reproduire les résultats de Cummings et coll. (309-312), d'autres n'ont rapporté aucune variation (313, 314), alors qu'une dernière a plutôt rapporté une légère élévation des taux de ghréline suite à la perte de poids post-opératoire (315). Une explication possible serait que, lors de l'intervention visant la réduction de l'estomac, l'implantation d'un anneau gastrique ajustable et la diversion biliopancréatique n'affectent pas l'intégrité du fundus, alors que la procédure Roux-en-Y la diminue considérablement. Ces caractéristiques, propres à chacun des types de chirurgies, pourraient expliquer, du moins en partie, l'amplitude de la fluctuation des taux de ghréline observés, ainsi que leur efficacité respective à induire la perte de poids. De plus, la durée de la période post-opératoire, la diète (ou l'absence de diète) prescrite ainsi que des effets neurologiques (via le nerf vagal) pourraient influencer la variation des concentrations de ghréline observée au cours des différentes études.

D'autre part, la diminution des taux de ghréline chez des sujets ayant augmenté leur masse corporelle a fait l'objet d'un plus petit nombre d'études. Bien que restreintes, ces études semblent indiquer que les taux de ghréline totale de base sont moins élevés chez des sujets soumis à une diète hypercalorique, ainsi que lors de la prise de poids qui en résulte (301, 316). En parallèle, l'expression de la ghréline dans le tractus GI de la souris a été inhibée de façon significative suite à une diète riche en lipides suivie sur une période de 10 semaines (317). La surconsommation de lipides semble provoquer une variation à la baisse des concentrations circulantes de ghréline chez l'humain (318). La validité de cette hypothèse doit toutefois être confirmée par des études plus approfondies.

2.2.3.3 Ghréline et insuline

Des études effectuées chez des modèles animaux et des sujets humains ont permis de constater l'existence de certaines associations entre les taux circulants de ghréline et leur degré respectif de sensibilité à l'insuline (319-322). De telles associations permettraient d'argumenter sur les interactions possibles entre la ghréline et l'insuline lors du développement de la résistance à l'insuline et, ultimement, sur les origines moléculaires du diabète de type 2.

On soupçonne qu'un nombre important de pathologies soit relié, directement ou indirectement, à un dérèglement des taux normaux de ghréline en circulation. En effet, à de bas taux de ghréline sont associés, de façon indépendante, la résistance à l'insuline, l'hypertension et la prévalence du diabète de type 2 (323). De plus, il a été rapporté par Shiiya et coll. que les taux de ghréline totale des patients obèses affectés par le diabète de type 2 sont moins élevés que chez des sujets non-diabétiques de poids normal (324). De même, des patients acromégaliques (325), et d'autres porteurs d'ovaires polykystiques (326), présentaient également des taux anormalement faibles de ghréline totale. Des taux anormalement bas de ghréline totale ont aussi été observés chez des indiens Pima normaux et obèses avec des prédispositions accrues pour le développement de l'obésité et du diabète de type 2 (298). Toutefois, les enfants atteints du syndrome de Prader-Willi (l'une des causes les plus communes d'obésité congénitale), présentent des taux de ghréline totale jusqu'à trois fois plus élevés que des sujets normaux, après avoir corrigé l'effet de la masse adipeuse viscérale (318).

À l'image de l'inhibition postprandiale des taux de ghréline, il a été observé que le CEH induit une inhibition des taux de ghréline totale (319). De plus, cet effet inhibiteur est plus marqué chez des individus manifestant des taux de ghréline plus élevés que chez des sujets avec des concentrations inférieures. Conséquemment, en état d'hyperinsulinémie, des sujets de poids normal et insulino-sensibles démontrent une capacité d'inhibition des taux de ghréline supérieurs à ceux d'individus obèses et/ou insulino-résistants (327). Ces observations supportent l'hypothèse voulant que l'insuline soit un facteur de régulation important des taux de ghréline en circulation.

Bien que l'impact de l'hyperinsulinémie sur les taux de ghréline totale ait été étudié de façon exhaustive, on ne dénombre qu'une quantité très limitée d'études sur la mesure des taux de ghréline acylée dans ce contexte clinique. L'étude de Katsuki et coll. (328) indique que la résistance à l'insuline peut être associée positivement, chez des sujets obèses, à des taux élevés de ghréline acylée, tandis que celle de Paik et coll. (329) rapporte une relation inverse avec la réduction post-prandiale des taux de ghréline acylée chez des patients atteints du syndrome de Prader-Willi. Des études futures devront donc faire la lumière autour des effets chroniques de la variation des taux de ghréline acylée sur le profil métabolique.

La ghréline semble également capable d'affecter la sécrétion d'insuline chez les mammifères. Il est d'autant plus intéressant de noter que, selon la dose de ghréline administrée, la sécrétion d'insuline peut être, soit stimulée ou inhibée (224, 330). De plus, dans un article de revue publié récemment, le groupe de Ghigo propose que la ghréline acylée puisse être à l'origine d'effets diabétogéniques, alors que la ghréline non-acylée jouerait plutôt un rôle protecteur contre le développement du diabète (331). Cette hypothèse est appuyée par les résultats de deux études où l'administration d'une dose pharmacologique de ghréline acylée a causé une diminution de la sensibilité à l'insuline, alors que la co-administration de ghréline acylée et de ghréline non-acylée a produit l'effet inverse (200, 332).

Bien qu'il ait été proposé que la ghréline soit inhibée en phase d'hyperinsulinémie, peu de données se rapportent à la modulation des taux de ghréline acylée par rapport aux taux de ghréline non-acylée. Paik et coll. avaient noté que l'inhibition postprandiale de ghréline acylée est plus importante chez des enfants souffrant du syndrome de Prader-Willi que chez d'autres enfants obèses, mais autrement normaux (329). Cette étude fut la première à proposer que la régulation de la ghréline acylée pourrait être associée au développement de troubles métaboliques chez des patients obèses. Ces quelques observations et hypothèses supportent donc l'utilité de développer des études qui permettraient de mieux décrire les mécanismes de régulation physiologique reliés aux formes de ghréline acylée et non-acylée. Ainsi, l'étude dans ce contexte de sous-populations spécifiques, tels des obèses insulino-sensibles ou d'autres souffrant d'insulino-résistance serait pleinement justifiée.

2.2.3.4 Ghréline et dépense énergétique

Suite à l'observation d'effets orexigéniques significatifs provoqués chez l'humain par l'administration de sécrétagogues de la GH, plusieurs auteurs ont voulu vérifier si de tels effets pouvaient aussi être causés par la ghréline. De fait, tel que mentionné dans la section 2.2.3.1, la ghréline acylée semble stimuler la prise alimentaire. D'autre part, l'augmentation de l'adiposité notée chez des modèles animaux a incité certains auteurs à postuler que la ghréline pourrait également exercer une influence négative sur le métabolisme énergétique. Les premières indications établissant une association possible entre la ghréline et la dépense énergétique proviennent d'un modèle murin (249). En effet, il fut observé par Tschöp et coll. qu'en plus d'induire une augmentation de l'appétit et de l'adiposité, l'administration périphérique de ghréline acylée favorisait une augmentation significative du QR et donc, l'oxydation des carbohydrates au détriment de celle des substrats lipidiques. Plus récemment, on a observé que les taux de ghréline totale sont inversement corrélés avec la dépense énergétique au repos chez des sujets humains minces, obèses ou hyperthyroïdiens (249, 256, 333). Bien que la dépense énergétique de base soit négativement corrélée avec les taux de ghréline, on n'observe aucune corrélation significative en ce qui concerne la dépense énergétique totale déterminée par la technique de l'eau doublement marquée chez des hommes de poids normal (334). Bien que certaines études laissent entrevoir la possibilité que la ghréline pourrait intervenir dans la régulation du métabolisme, la relation entre ses effets physiologiques et l'homéostasie énergétique reste à définir.

2.2.3.5 Ghréline et adipogénèse

On avait déjà observé que l'administration chronique de ghréline pouvait induire une augmentation de l'adiposité chez les rongeurs (244, 249). De façon inattendue, l'analyse d'imagerie par résonance magnétique (IRM) a révélé que les animaux traités avec de la ghréline ne manifestent pas une augmentation de masse corporelle, mais plutôt une adiposité totale accrue (335). Ces résultats indiquaient que la ghréline pourrait influencer la dépense énergétique ou l'oxydation des substrats pour favoriser l'adipogénèse.

Des études *in vitro* avec des adipocytes ont montré que la ghréline acylée et non-acylée pouvait induire la même activité biologique. En effet, la ghréline semble promouvoir la différenciation (190, 195, 336, 337) et la prolifération cellulaires (195, 336, 337), tout en favorisant l'inhibition de la lipolyse induite par un agoniste du récepteur β -adrénergique (26-28, 195, 336, 337). Ces informations supportent l'hypothèse qu'un récepteur différent du GHS-R1a (permettant seulement la liaison avec la ghréline acylée) pourrait également induire les effets biologiques de la ghréline acylée et de la non-acylée. Toutefois, aucune étude n'a encore pu démontrer l'existence de ce récepteur. Plusieurs auteurs ont déjà rapporté que la liaison entre le récepteur GHS-R1a et la ghréline acylée pourrait donner lieu à plusieurs effets biologiques. Cependant, il est présentement impossible, à partir des connaissances actuelles, de déterminer si les effets métaboliques associés à la ghréline acylée et non-acylée sont induits par GHS-R1a ou par un autre récepteur. Par conséquent, bien que des voies de signalisation aient été décrites pour certains effets métaboliques, il est pour le moment prématuré de les attribuer à la régulation par GHS-R1a.

La ghréline semble inhiber l'activité de l'adénosine monophosphate kinase (AMPK) du foie et des adipocytes, ce qui pourrait influencer à la baisse l'oxydation des lipides dans des tissus ayant une importance stratégique face à l'équilibre des réserves énergétiques (338). Certains travaux ont suggéré, d'ailleurs, que la ghréline pourrait influencer l'adipogénèse en favorisant l'expression de ADD1 (Facteur dépendant de la détermination et de la différenciation adipocytaire 1), de aP2 (protéine adipocytaire 2), de GPD (déshydrogénase du glycerol-3-phosphate) et de PPAR γ 2 (195, 336, 337). De plus, il a été rapporté que les effets anti-apoptotiques et prolifératifs de la ghréline pourraient être associés à l'activation des voies de signalisation MAPK par la voie de ERK1/2, de IRS-1, de PKC et de PI3K (176, 339, 340).

La ghréline représente l'exemple typique d'un peptide qui peut être, à la fois, associé à la régulation de l'apport alimentaire aigu et au contrôle chronique des taux énergétiques. L'impact de ce peptide sur les centres de contrôle de l'appétit et sa relation inverse avec la dépense énergétique en témoignent.

2.2.3.6 Ghréline et inflammation

La grande majorité des études sur les effets de la ghréline se sont limitées à en évaluer les conséquences métaboliques. Toutefois, on a rapporté également que le récepteur GHS-R1a est exprimé dans des cellules du système immunitaire de souches différentes (217). De plus, la perte d'appétit et l'anorexie sont parmi les symptômes des plus courants lorsqu'un sujet est affligé par une pathologie, une blessure ou l'inflammation. Kelley et coll. ont rapporté que ces effets anorexigènes pourraient être associés à la sécrétion accrue de cytokines proinflammatoires, telles IL-1 β (*interleukin 1 β*), IL-6 et TNF- α (341). Dans le même ordre d'idée, Dixit et coll. ont publié que la ghréline exerce un effet inhibiteur de l'expression de l'ARNm de IL-1 β , IL-6 et de TNF- α via un mécanisme spécifique au récepteur GHS-R1a (217). Une activité anti-proliférative a également été rapportée chez les cellules T murines (217). D'autres auteurs ont également observé que la diminution de la prolifération des cellules T était associée à une diminution non-spécifique de la production des cytokines IL-1, d'interféron γ (IFN- γ), de IL-4 et de IL-10 (342).

Lors d'un choc endotoxique causé par les lipopolysaccharides (LPS) de l'enveloppe cellulaire des bactéries gram négatives, les cellules B et les monocytes produisent une importante quantité d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF- α . Cette expression accrue de cytokines correspond à la réponse immunitaire aiguë. La hausse du niveau de ces cytokines induit une amplification du signal pro-inflammatoire et agit en tant que facteur anorexigène, contribuant à la pathogénèse associée à la septicémie et à la dysfonction de divers organes. De plus, lors d'un choc endotoxique induit par les LPS, les taux de ghréline sont abaissés de façon significative (343). Dans le même ordre d'idée, il a été récemment rapporté que la ghréline exerçait des effets protecteurs pouvant favoriser la survie de rats auxquels des LPS avaient été administrés (344, 345). Ces effets sont associés à l'atténuation des effets hypotenseurs et antikinétiques de l'iléon induits par une septicémie (346). Les effets protecteurs de la ghréline pourraient être induits, du moins en partie, par la diminution des taux de NF κ B (facteur nucléaire κ B), de IL-1 α , IL-1 β , IL-6 et de TNF- α observée chez des rats soumis à un choc endotoxique induit par des LPS (217, 347).

En plus d'agir comme facteur protecteur lors de réactions inflammatoires aiguës, la ghréline et un agoniste du GHS-R1a, le GHRP-2, semblent avoir des effets bénéfiques en présence d'un désordre inflammatoire chronique tel que l'arthrite. Ces effets pourraient être

associés à une diminution de la production d'IL-6 et de monoxyde d'azote (NO) par les macrophages, et de TNF- α , d'ubiquitine, de MuRF1 (*muscle ring finger 1*) et de MAFbx (*muscle atrophy F-box*) par le muscle squelettique (348-350). Conformément aux effets anti-arthritiques rapportés, une infusion de ghréline pendant 24 h a favorisé la prolifération d'ostéoblastes et stimulé la formation osseuse par des mécanismes indépendants de ceux de la GH (350).

Bien que l'administration de ghréline semble capable d'induire des effets anti-inflammatoires, on retrouve peu d'information permettant d'établir une relation entre l'inflammation et les taux physiologiques de ghréline chez l'humain. Deux études récentes ont tenté d'associer les taux de ghréline à ceux de marqueurs inflammatoires chez des patients atteints de troubles de santé sévères. Tout d'abord, chez des patients atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique, une corrélation négative a été obtenue entre les taux de TNF- α et de CRP et ceux de ghréline en circulation (351). Cependant, chez une autre population de patients souffrant d'insuffisance cardiaque, une corrélation positive entre les taux de TNF- α et ceux de ghréline a été rapportée (303).

Il est de plus en plus proposé que le développement de troubles métaboliques puisse être associé à des taux faibles de ghréline et élevés de marqueurs inflammatoires chroniques. Toutefois, aucune étude n'a encore pu établir une relation quelconque entre les taux de ghréline et ceux de marqueurs inflammatoires sub-chroniques chez des populations d'obèses. De la même façon, aucun travail de recherche n'a encore évalué l'importance physiologique de la régulation des taux de ghréline acylée vs. ceux de ghréline non-acylée.

2.2.3.7 Effets de la ghréline sur la libération de GH

Les tests biologiques effectués depuis le début des années 2000 au moyen d'analogues de la ghréline ont visé d'abord à résoudre les mêmes problématiques que lors des premiers essais menés avec les GHRPs et les sécrétagogues non peptidiques. Ces derniers étaient, en premier lieu, destinés à établir la nature de l'interaction ligand-récepteur par des études *in vitro* et, d'autre part, à déterminer les mécanismes contrôlant la libération de GH de l'hypophyse dans différents modèles animaux. Les premières études biologiques effectuées

avec les analogues de GHRP-6 avaient pour but de mesurer leur capacité à libérer la GH *in vitro*, puis *in vivo* (155). De même, les premières études *in vivo* effectuées avec la ghréline ont comparé la capacité de la ghréline acylée d'origine murine ou humaine, avec celle de deux analogues de la ghréline humaine (1-18) acylée et non-acylée, à libérer la GH chez le rat (352). Ces auteurs rapportèrent que, contrairement aux études *in vitro* où des analogues N-terminaux de ghréline acylée ne comprenant que 5 résidus pouvaient induire la libération de GH, seules les séquences complètes (1-28) donnaient lieu à une réponse significative *in vivo* (352). Cet effet était détectable à partir de cinq minutes suivant l'injection jusqu'à 60 ou 180 minutes après l'administration i.v. de ghréline acylée chez le rat ou l'humain, respectivement (352-358).

Chez l'humain, au moyen d'injections i.v., la dose minimale de ghréline acylée (0,07 nmol/kg) nécessaire pour provoquer une sécrétion significative de GH, ainsi que la dose provoquant la sécrétion maximale de GH (plus de 1,1 nmol/kg) ont été déterminées (353, 355). Chez le rat, suite à l'injection i.v. de doses aussi élevées que 60 nmol/kg de ghréline acylée, la libération maximale de GH n'a pu être atteinte.

L'activité de la ghréline acylée a aussi été comparée à celle d'autres composés reconnus pour stimuler la sécrétion de GH, soit GHRH et d'autres sécrétagogues de la GH. Arvat et coll. (357) ont comparé l'effet combiné, chez l'humain, de l'injection i.v. de 0,3 nmol/kg de ghréline acylée et de 1,1 nmol/kg d'hexareline, un agoniste synthétique du GHS-R1a. Les mêmes auteurs ont aussi rapporté que, malgré le fait que la dose molaire soit quatre fois moins importante, l'aire sous la courbe de la réponse à la ghréline acylée est significativement plus importante que celle de la réponse à l'hexareline ($1894,9 \pm 347,8$ vs $1546,9 \pm 380,0 \mu\text{g} \times \text{h} / \text{L}$, respectivement) (357). D'autre part, l'effet comparatif de l'injection i.v. de ghréline acylée ou de GHRH sur la sécrétion de GH a aussi été étudié par Seoane et coll. (354). À une dose de 3,0 nmol/kg, les aires sous les courbes respectives permettant de quantifier la libération de GH en réponse à la ghréline acylée et au GHRH étaient comparables. Cependant, suite à l'administration d'une dose de 12,0 nmol/kg, la ghréline acylée a donné lieu à un effet plus marqué que le GHRH sur la hausse des taux de GH (354).

2.2.3.8 Effets synergiques de la ghréline et du GHRH

Alors que des effets synergiques résultant de l'administration combinée de GHRH et de GHRP-6 sur la sécrétion de GH avaient déjà été décrits par Bowers et coll. (151), une telle synergie a pu également être observée entre la ghréline acylée et le GHRH (357, 358). Ainsi, lors de l'administration i.v. de 0,3 nmol/kg de GHRH combinée à différentes doses de ghréline (0,03; 0,06 et 0,3 nmol/kg) *in vivo* chez l'humain, les concentrations de GH mesurées dans le plasma étaient supérieures aux concentrations cumulatives obtenues suite à l'injection individuelle de chacun des peptides (358).

2.2.3.9 Effet de désensibilisation de l'activité de la ghréline

La désensibilisation de la libération de GH consécutive à la perfusion continue de cellules pituitaires de rat adultes avec GHRP-6 avait été décrite par Badger et coll. (359). Plus récemment, Tolle et coll. (352) ont étudié, chez le rat adulte mâle en éveil, l'effet d'injections répétées de doses de 10 µg de ghréline acylée murine, à des intervalles de 3 et 4 heures. À ces doses et fréquences, ces auteurs n'ont observé aucune différence de sécrétion de GH après chacune des injections.

2.2.3.10 Effets de la ghréline sur la motilité intestinale et les sécrétions gastriques

Tout juste après que Kojima et coll. aient publié les premiers résultats sur l'identité et les propriétés de la ghréline (153), Tomasetto et coll. rapportèrent avoir isolé un peptide gastro-intestinal partageant une importante homologie avec la séquence du peptide motiline: le *motilin-related peptide* (360). Il s'avéra que les séquences du *motilin-related peptide* et de la ghréline étaient identiques. S'inspirant de l'homologie importante de la séquence de la ghréline avec celle d'un autre peptide GI connu, la motiline, plusieurs auteurs, dont Poitras et coll., ont décrit les puissants effets de la ghréline sur la motilité et la vidange gastriques (361-367).

Les effets de l'administration de ghréline acylée sur la sécrétion d'insuline ainsi que sur la stimulation de la sécrétion d'acide chlorhydrique (HCl) et d'enzymes gastriques ont été rapportés (260, 340, 368, 369). Par contre, ces différentes études mènent à des conclusions contradictoires, de sorte que le rôle physiologique de la ghréline dans le système digestif n'a pu encore être assigné de façon certaine.

2.2.3.11 Autres effets biologiques de la ghréline

Parmi les autres effets biologiques de la ghréline décrits jusqu'à maintenant dans la littérature, mentionnons la stimulation de la sécrétion des hormones de stress (ACTH et cortisol), ainsi que prolactine (PRL) et aldostérone (175, 250, 353, 356, 370). Enfin, dans un tout autre ordre d'idées, certains auteurs ont décrit l'effet bénéfique de la ghréline acylée sur la force de contraction cardiaque dans des cas d'insuffisance cardiaque, ainsi que sur la régulation de la pression artérielle (303, 371-374).

3 PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

3.1 PROBLÉMATIQUE

Avec la croissance épidémique de l'obésité dans la population nord-américaine, il est devenu impératif, pour des raisons tant économiques qu'humanitaires, d'enrayer le phénomène et d'en atténuer ses conséquences. L'identification et la compréhension des différents facteurs qui initient et amplifient les dysfonctions métaboliques associées à l'obésité représentent donc des éléments essentiels pour permettre la mise en place de stratégies permettant d'atteindre et de maintenir un poids santé et, conséquemment, une meilleure santé globale. Plusieurs avenues de recherche ont été explorées au cours des dernières années pour tenter de cerner les entités moléculaires et les mécanismes responsables du contrôle de l'appétit, du métabolisme, de la capacité à entreposer les réserves énergétiques et de l'activation chronique du système inflammatoire, des composantes fondamentales du phénomène de l'obésité et ses conséquences. Il en ressort que le maintien de l'homéostasie métabolique est influencé par de nombreux mécanismes de régulation impliquant un nombre tout aussi grand de biomolécules, dont le rôle individuel et les interactions dans différents organes sont encore mal compris. Pour les besoins de ce projet de recherche, le profil métabolique est défini par des paramètres tels la composition corporelle, la sensibilité à l'insuline, le bilan lipidique sanguin, ainsi que les facteurs hormonaux, ceux de l'inflammation chronique, de la dépense énergétique et des comportements alimentaires.

La découverte récente de la ghréline, un peptide linéaire de 28 acides aminés, pourrait représenter une étape déterminante dans notre compréhension des phénomènes responsables de la régulation du métabolisme énergétique. Chez les mammifères incluant l'homme, ainsi que chez d'autres espèces, deux formes distinctes de ghréline existent: la ghréline acylée, où la chaîne latérale de l'acide aminé Ser³ est octanoylée et la ghréline non-acylée. Tout d'abord étudiée pour ses effets de stimulation de la sécrétion hypophysaire de GH, il a par la suite semblé de plus en plus évident, après de nombreuses études cliniques (voir recension de la littérature), que cette hormone peptidique, synthétisée par des cellules de type X/A du tractus GI, pourrait être impliquée, de façon à la fois aiguë et chronique, dans l'atteinte et le maintien de la balance énergétique. En effet,

l'augmentation aiguë des taux de ghréline initie la prise alimentaire, alors que des taux faibles de ghréline sont associés à une dépense énergétique amoindrie, ainsi qu'à des troubles métaboliques reliés à l'obésité.

Toutefois, un nombre plutôt restreint, parmi les très nombreuses études cliniques (375) visant à mesurer les taux de ghréline chez différents groupes d'individus, s'est intéressé à distinguer entre les concentrations circulantes de ghréline acylée et non-acylée. Pourtant, ces études semblent indiquer qu'il pourrait exister un lien direct entre l'état moléculaire de la ghréline et les mécanismes physiologiques précédant et suivant la prise de nourriture. Il est même possible qu'une altération du rapport à l'équilibre entre les taux respectifs de ghréline acylée et non-acylée puisse définir, sinon contribuer au développement d'une pathologie résultant d'une dysfonction métabolique.

De plus, la plupart des études visant à mesurer les taux de ghréline chez l'humain ont utilisé des groupes disparates de sujets expérimentaux, comprenant aussi bien des hommes que des femmes et cela sans tenir compte, dans la plupart des cas, de l'état de santé général et des habitudes de vie de chaque individu. Il semble donc nécessaire de cibler, pour obtenir des résultats consistants, des cohortes mieux caractérisées d'individus présentant des profils métaboliques comparables. De plus, la comparaison entre des groupes dont les profils métaboliques sont différents, comme les obèses insulino-sensibles et les insulino-résistants, devrait permettre de déterminer si les variations correspondantes des taux de ghréline acylée et non-acylée peuvent être impliquées dans le processus de développement de pathologies associés à l'obésité.

3.2 HYPOTHÈSES

Les hypothèses sur lesquelles se basent ces travaux de recherche sont: *a)* vu la complexité de l'étiologie de l'obésité, il serait justifié de restreindre les variables de l'étude en utilisant des populations-cibles distinctes (telles les femmes non-obèses entrant sur le marché du travail et les femmes post-ménopausées obèses et avec surpoids), chez lesquelles le risque de développement de troubles métaboliques est particulièrement élevé; *b)* on devrait pouvoir observer l'émergence de marqueurs précoces de dysfonctions métaboliques chez certaines femmes jeunes non-obèses et sensibles à l'insuline sujettes à des changements significatifs dans leurs habitudes de vie; *c)* on devrait aussi pouvoir observer que les taux de ghréline totale à jeun sont associés, indépendamment des facteurs de la composition corporelle, aux composantes de la dépense énergétique (métabolisme de base, quotient respiratoire, activité physique), aux apports caloriques, à la capacité aérobie à effort maximal et aux habitudes alimentaires (sensation générale de faim, inhibition alimentaire et désinhibition alimentaire) chez un tel groupe de sujets; *d)* comme elle permet de simuler une hausse post-prandiale importante de l'insulinémie indépendamment de l'état métabolique du sujet, l'utilisation de la technique CEH devrait induire de façon uniforme une réduction des taux de ghréline chez des femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids; *e)* d'autre part, chez ces mêmes femmes, on devrait observer une distribution importante des valeurs de composition corporelle, de degré de sensibilité à l'insuline et de taux de ghréline; *f)* de plus, chez de telles femmes, des profils différents de ghréline acylée, non-acylée et totale devraient être observés entre des individus insulino-résistants (IROS) et insulino-sensibles (ISOS); *g)* chez les femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids, les profils de ghréline acylée et totale défavorables devraient être associés à l'élévation des taux de marqueurs inflammatoires chroniques tels que le CRP, le TNF- α et le sTNF-R1.

3.3 OBJECTIFS

Par conséquent, ce projet de recherche vise à :

- 1) vérifier, chez des femmes présentant des profils métaboliques différents, si les taux circulants de ghréline acylée, non-acylée et totale, ainsi que le rapport ghréline acylée/non-acylée, peuvent être associés aux composantes de leur balance énergétique et à leur sensibilité à l'insuline;
- 2) évaluer chez des femmes post-ménopausées, obèses ou en surpoids, dans des conditions simulées au moyen de la technique CEH, les effets de l'hyperinsulinémie sur leur profil individuel de ghréline acylée, non-acylée et totale;
- 3) comparer, au sein d'un groupe de femmes obèses ou en surpoids comprenant des individus sensibles (ISOS) et résistants (IROS) à l'insuline (ISOS), les profils de ghréline acylée, non-acylée et totale et
- 4) déterminer si, chez un tel groupe de femmes, les profils de ghréline acylée et totale sont associés aux taux de marqueurs inflammatoires tels que le CRP, le TNF- α et le sTNF-R1.

4 MÉTHODOLOGIE

Les méthodes et protocoles décrits dans cette section ont été développés et appliqués en vue de caractériser, de façon exhaustive, le profil métabolique et de mesurer la variation de taux circulants d'hormones peptidiques et de protéines en relation avec un tel profil, chez des groupes de femmes sélectionnées selon des critères physiologiques stricts. Les participantes aux Études 1 et 2 ont été sélectionnées parmi une cohorte de jeunes femmes selon des critères métaboliques précis. Les sujets des l'Études 3 et 4 ont également été choisis parmi une cohorte de femmes post-ménopausées avec surpoids et obèses selon des critères métaboliques précis. Les résultats des Études 1 à 4 correspondent à des populations de femmes de différents âges; nos résultats ne peuvent donc pas nécessairement être automatiquement associés à des populations d'âges différents ou masculines. Toutes les études se sont déroulées sous la supervision médicale du Dr Rémi Rabasa-Lhoret et / ou d'une infirmière diplômée. Les études cliniques et les mesures des paramètres étudiés ont été effectuées selon des techniques et des méthodes statistiques bien établies et d'utilisation courante dans des études comparables, tels que décrit dans les sections suivantes.

4.1 PROTOCOLE I

4.1.1 ÉVALUATION DU PROFIL MÉTABOLIQUE CHEZ DES FEMMES JEUNES, NON-OBÈSES ET EN SANTÉ

4.1.1.1 Étude 1

Soixante-cinq femmes jeunes, non-obèses et en santé ont été recrutées pour participer à cette étude. La composition ethnique de la cohorte était 91% caucasienne, 4,5% arabe et 4,5% afro-américaine. Parmi cette population, 46% des jeunes femmes utilisaient des contraceptifs oraux et 6% étaient en aménorrhée. Un seul sujet s'est déclarée fumeur et fut avisée de ne pas fumer pendant une période de 24 h avant la séquence de tests. Les critères d'inclusion pour la participation à l'étude étaient d'être: 1) une femme; 2) âgée entre 18 à 35 ans; 3) sensible à l'insuline (HOMA < 1,69); 4) non-obèse (IMC < 30 kg/m²). Les critères d'exclusion pour la participation à l'étude étaient: 1) la grossesse, 2) une maladie aiguë à l'intérieur d'une période d'un mois, 3) des désordres alimentaires diagnostiqués, 4) la résistance à l'insuline, le diabète, l'hypertension ou la dyslipidémie et 5) une médication pouvant affecter les fonctions cardiovasculaires et/ou métaboliques (par exemple: médicaments anti-hypertension / hypotenseurs et TZD). Afin d'éliminer l'effet parasite du cycle menstruel sur le métabolisme, tous les tests ont été effectués au cours de la période folliculaire, dans les laboratoires de l'Unité Métabolique de l'Université de Montréal. Les sujets ont été recrutés par le biais d'annonces affichées sur le campus de l'Université de Montréal (Montréal, Qc, Canada) et dans son voisinage. Les sujets n'ont été soumis aux tests qu'après avoir lu et signé le formulaire de consentement préalablement approuvé par le comité d'éthique de l'Université de Montréal.

4.1.1.2 Étude 2

Soixante-trois jeunes femmes non-obèses ont été recrutées pour participer à cette étude. La composition ethnique de la cohorte était 90% caucasienne, 5% arabe et 5% afro-américaine. Dans cette population 46% des jeunes femmes utilisaient des contraceptifs oraux. Les critères d'inclusion pour la participation à l'étude étaient d'être: 1) une femme 2) âgée entre 18 à 35 ans. Les critères d'exclusion pour la participation à l'étude étaient: 1) la grossesse, 2) une maladie aiguë à l'intérieur d'une période d'un mois, 3) des désordres alimentaires diagnostiqués, 4) la résistance à l'insuline, le diabète, l'hypertension ou la dyslipidémie et 5) une médication pouvant affecter les fonctions cardiovasculaires et/ou métaboliques (par exemple: médicaments anti-hypertension / hypotenseurs et TZD). Afin d'éliminer l'effet parasite du cycle menstruel sur le métabolisme, tous les tests ont été effectués au cours de la période folliculaire, dans les laboratoires de l'Unité Métabolique de l'Université de Montréal. Les sujets ont été recrutés par le biais d'annonces affichées sur le campus de l'Université de Montréal (Montréal, Qc, Canada) et dans son voisinage. Les sujets n'ont été soumis aux tests qu'après avoir lu et signé le formulaire de consentement préalablement approuvé par le comité d'éthique de l'Université de Montréal.

4.1.2 DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE 1 ET DE L'ÉTUDE 2

À leur arrivée à l'Unité Métabolique vers 08h00, un échantillon sanguin fut prélevé chez les sujets à jeun depuis plus de 12 h. Par la suite, le métabolisme de base (MB) et l'effet thermique d'un repas (ETR) liquide (10 kcal/kg) ont été mesurés. Vers 12h00, un léger dîner fut servi aux sujets, après quoi les valeurs de composition corporelles furent mesurées. Au cours de l'après-midi, l'activité physique (loisirs et quotidienne), les questionnaires alimentaires et la mesure de la capacité aérobie à l'effort maximal (VO_{2peak}) furent évalués.

4.2 PROTOCOLE 2

4.2.1 ÉVALUATION DU PROFIL MÉTABOLIQUE CHEZ DES FEMMES POST-MÉNOPAUSÉES OBÈSES OU EN SURPOIDS

4.2.1.1 Étude 3

Cette cohorte comprenait 89 femmes post-ménopausées non-diabétiques, avec surpoids ou obèses, âgées entre 46 et 73 ans. Les critères d'inclusion étaient: 1) un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 27 kg/m², 2) des taux de FSH (hormone stimuloire du follicule) supérieurs ou égaux à 30 U/L, 3) une sédentarité élevée (moins de 2h d'exercice structuré par semaine), 4) non-fumeur, 5) une consommation d'alcool allant de faible à modérée (moins de 2 consommations par jour), 6) l'absence de troubles inflammatoires diagnostiqués et 7) l'absence de traitement de remplacement hormonal depuis une période d'un minimum de 3 mois. Suite à une évaluation physique et biologique (sous la supervision d'un médecin), les sujets ne démontrèrent aucune évidence ou historique de: (1) maladie cardiovasculaire, maladie vasculaire périphérique ou accident vasculaire cérébral, (2) diabète (glycémie à 2h supérieure à 11,0 mmol/L suite à l'ingestion de 75g de glucose pendant un test HGPO (hyperglycémie provoquée oralement), (3) limitation orthopédique, (4) trouble thyroïdien ou hypophysaire non contrôlé, (5) infection (questionnaire et examen médical combiné à l'évaluation de la formule sanguine complète) et (6) médication pouvant avoir des incidences sur les fonctions cardiovasculaires et/ou le métabolisme de base (par exemple: médicaments anti-hypertension / hypotenseurs et TZD). Cette étude a été approuvée préalablement par le comité d'éthique de l'Université de Montréal (Montréal, Qc, Canada). La série de tests a pu débuter après que les sujets aient lu et signé le formulaire de consentement.

4.2.1.2 Étude 4

Cette cohorte comprenait 51 femmes post-ménopausées non-diabétiques, avec surpoids ou obèses, âgées entre 48 et 73 ans. Les critères d'inclusion étaient: 1) un indice de masse corporel (IMC) supérieur à 27 kg/m², 2) des taux de FSH supérieurs ou égaux à 30 U/L, 3) une sédentarité élevée (moins de 2h d'exercice structuré par semaine), 4) non-fumeur, 5) une consommation d'alcool allant de faible à modérée (moins de 2 consommations par jour), 6) l'absence de troubles inflammatoires diagnostiqués et 7) l'absence de traitement de remplacement hormonal depuis une période d'un minimum de 3 mois. Suite à une évaluation physique et biologique (sous la supervision d'un médecin), les sujets ne démontrèrent aucune évidence ou historique de: (1) maladies cardiovasculaires, maladies vasculaires périphériques ou accident vasculaire cérébral, (2) diabète (glycémie à 2 h supérieure à 11,0 mmol/L suite à l'ingestion de 75 g de glucose pendant un test HGPO), (3) limitations orthopédiques, (4) troubles thyroïdiens ou hypophysaires non contrôlés, (5) infections (questionnaire et examen médical combiné à l'évaluation de la formule sanguine complète) et (6) médication pouvant avoir des incidences sur les fonctions cardiovasculaires et/ou le métabolisme de base. Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique de l'Université de Montréal (Montréal, Qc, Canada). La série de tests a pu débuter après que les sujets aient lu et signé le formulaire de consentement.

4.2.2 **DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE 3 ET DE L'ÉTUDE 4**

Les femmes participant aux Études 3 et 4 font partie d'un même protocole de recherche global. Le déroulement de ce projet de recherche a été divisé en trois parties:

4.2.2.1 Recrutement

Lors de la période de recrutement, les sujets ont été soumis à une série d'examens afin de déterminer si elles étaient éligibles. Ces tests incluaient un HGPO, un examen médical

complet (voir critères d'inclusion et d'exclusion) et un électrocardiogramme (ECG) au repos. Une fois ces tests complétés avec succès, les sujets ont reçu l'autorisation de débiter le protocole.

4.2.2.2 Stabilisation du poids corporel (4 semaines)

Pour s'assurer de la stabilisation du poids corporel de chaque sujet, le suivi a été effectué par une nutritionniste professionnelle de l'Unité Métabolique. Pendant cette période le poids des sujets a été stabilisé pour permettre le déroulement d'une série de tests visant à évaluer le plus exhaustivement possible le profil métabolique de chacune. La stabilisation a été nécessaire pour s'assurer que les tests soient représentatifs d'un état stable et non celui d'une phase de changement métabolique. Au cours de la stabilisation de poids corporel et pendant la série de tests, les sujets furent avisées de ne pas modifier leur activité physique quotidienne habituelle.

4.2.2.3 Séquence de tests métaboliques

Les sujets ont été soumises à une série de tests visant à évaluer: (1) leur sensibilité à l'insuline (voir clamp euglycémique/hyperinsulinémique) et (2) leur composition corporelle (voir DXA et tomographie axiale).

4.3 MÉTHODES

4.3.1 CLAMP EUGLYCÉMIQUE/HYPERINSULINÉMIQUE (CEH)

Le test débutait à 07h30 après un jeûne d'une durée minimale de 12 h, selon les procédures décrites par DeFronzo et coll. (77). Un cathéter fut introduit dans la veine antécubitale pour permettre l'infusion d'une solution à 20% de dextrose et l'administration d'insuline (Actrapid®, Novo-Nordisk, Toronto, Canada). L'autre bras des sujets fut également canulé afin de permettre la collecte des échantillons sanguins. Trois échantillons de plasma permettant de mesurer les taux de base de glucose et d'insuline furent prélevés pendant 40 minutes (-40, -20 et 0 min). Au temps 0 min, le débit de l'infusion d'insuline a été ajusté à 75 mU/m²/min pour une période de 180 min. Le glucose plasmatique a été mesuré à chaque 10 min à l'aide d'un analyseur de glucose (Beckman Instruments, Fullerton, CA) et maintenu aux taux de base (\approx 5,0 à 5,5 mmol/L) en utilisant l'infusion variable d'une solution de dextrose à 20%. La capacité d'assimilation du glucose a été calculée comme la moyenne d'infusion du glucose lors des 30 dernières minutes de l'effet représentant la période d'état stable de glycémie; cette valeur est exprimée en mL.min⁻¹.kg⁻¹ de masse non-adipeuse (*fat free mass*: FFM). La glycémie sérique basale a également été déterminée à l'aide d'un analyseur de glucose de marque Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Les CEH ont été effectués à l'Unité Métabolique du département de Nutrition, et l'auteur a participé à plus de 50 d'entre eux, en collaboration avec les autres étudiants et le personnel infirmier et/ou de recherche de l'Unité Métabolique.

4.3.2 ÉCHANTILLONS SANGUINS

Le sang veineux fut prélevé à jeun (Études 1 et 2) et pendant le CEH (0, 60, 160, 170 et 180 min des Études 3 et 4), centrifugé à 3900 X g pendant 10 minutes à 4 °C, et les échantillons

de sérum (Études 1 et 2) et de plasma (Études 3 et 4) furent congelés à -80°C pour les analyses subséquentes des taux de ghréline totale, de leptine et d'adiponectine (Études 1 à 4). Suite à la centrifugation, les échantillons de plasma (1 mL) destinés au dosage de la ghréline acylée (Études 3 et 4) furent traités avec 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de HCL (1N) et 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de phénylméthylsulfonyl afin de prévenir la dégradation du peptide et / ou la perte du groupe octanoyl sur l'acide aminé Ser³ de la ghréline (Linco Research, St-Charles, MO, USA). Les échantillons sanguins ont été prélevés par le personnel infirmier et traités par les étudiants responsables des CEH à l'Unité Métabolique.

4.3.3 ANALYSES SANGUINES

Les analyses RIA de ghréline (totale et acylée), de leptine et d'adiponectine ont été effectuées par l'auteur et les dosages affichant un coefficient de variation supérieur à 15% ont été rejetés. Les dosages de cholestérol, de HDL, de triglycérides et de glucose ont été effectués au Médiclub (Sanctuaire, Montréal, Canada). Les dosages ELISA d'insuline, de hsTNF- α et de sTNF-R1 ont été effectués au laboratoire du Dr Rémi Rabasa-Lhoret à l'Hôtel-Dieu (CHUM, Montréal, Canada). Les dosages de hsCRP ont été effectués dans le laboratoire du Dr Jean-Philippe Bastard (Paris, France).

4.3.3.1 Dosage de la ghréline totale

Pour l'Étude 1 et 2, les taux de ghréline immunoréactive furent évalués en duplicata au moyen d'une trousse de radioimmunoétalonnage commerciale (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA). Cette procédure RIA utilise la ghréline-I¹²⁵ humaine bioactive et des anticorps polyclonaux de lapins ciblés contre la séquence totale du peptide octanoylé. Deux études différentes ont confirmé que les coefficients de variation inter-dosage étaient de moins de 15%, alors que les coefficients intra-dosage étaient de moins de 9% (287, 298). La trousse RIA Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, USA) est à 100% spécifique pour les séquences de ghréline acylée et non-acylée humaine. Pour les Études 3 et 4, les taux de ghréline immunoréactive furent évalués en duplicata au moyen d'une autre trousse RIA

commerciale (Linco Research, St-Charles, MO, USA). Cette trousse RIA utilise la ghréline-I¹²⁵ humaine bioactive et des anticorps polyclonaux de lapins ciblés contre la séquence totale du peptide octanoylé (376). Selon le fabricant, les variations inter- et intra-dosage sont, respectivement, de moins de 18% et de 10%. La validation de la trousse RIA fut assurée par le dosage de deux échantillons de contrôle de qualité fournis par le fabricant. La trousse RIA est à 100% spécifique pour les séquences de ghréline, et ne possède aucune activité hétérospécifique pour les séquences de ghréline 1-10, de leptine, d'insuline, de glucagon, de peptides liés à la motiline et de GLP-1.

4.3.3.2 Dosage de la ghréline acylée

Les taux de ghréline acylée immunoréactive furent évalués en duplicata au moyen d'une trousse RIA commerciale (Linco Research, St-Charles, MO, USA). Pour les Études 1 et 2, les échantillons de sérum n'ont pas été traités pour contrer la dégradation du groupe octanoyl de la ghréline acylée; par conséquent, ces valeurs n'ont pas été déterminées. Cette procédure RIA utilise la ghréline-I¹²⁵ humaine bioactive et des anticorps polyclonaux de lapins ciblés contre le groupe octanoyl sur la Ser³ de la séquence du peptide (377). Selon le fabricant, les variations inter- et intra-dosage sont respectivement de moins de 17% et de 10%. La validation de la trousse RIA fut assurée par le dosage de deux échantillons de contrôle de qualité fournis par le fabricant. La trousse RIA est à 100% spécifique pour les séquences de ghréline acylée, moins de 0,1% pour les séquences de ghréline 14-28 et ne possède aucune activité hétérospécifique pour celles de leptine, d'insuline, de glucagon et de GLP-1. Pour l'Étude 3, les taux de ghréline non-acylée ont été évalués pour chaque patient en tenant compte de la valeur de ghréline totale moins celle de la ghréline acylée.

4.3.3.3 Dosage de la leptine

Les taux de leptine immunoréactive (Études 1 et 2: taux sériques; Études 3 et 4: taux plasmatiques) furent évalués en duplicata au moyen d'une trousse RIA commerciale (Linco Research, St-Charles, MO, USA). Cette procédure RIA utilise la leptine-I¹²⁵ humaine et des anticorps polyclonaux de lapins ciblés contre la séquence totale du peptide (378, 379).

Selon le fabricant, les variations inter- et intra-dosage sont respectivement de moins de 7% et 9%. La validation de la trousse RIA fut assurée par le dosage de deux échantillons de contrôle de qualité fournis par le fabricant. La trousse RIA est à 100% spécifique pour les séquences de leptine humaine, moins de 0,2% pour celle de rongeur, et ne possède aucune activité hétérospécifique pour les séquences d'insuline, de peptide C, de pro-insuline, d'IGF-1, de glucagon, de somatostatine et de polypeptide pancréatique.

4.3.3.4 Dosage de l'adiponectine

Les taux d'adiponectine (Études 1 et 2: taux sériques; Études 3 et 4: taux plasmatiques) immunoréactive furent évalués en duplicata au moyen d'une trousse RIA commerciale (Linco Research, St-Charles, MO, USA). Cette procédure RIA utilise l'adiponectine-I¹²⁵ humaine bioactive et des anticorps polyclonaux de lapins ciblés contre la séquence totale du peptide (380). Selon le fabricant, les variations inter- et intra-dosage sont respectivement de moins de 10% et 7%. La validation de la trousse RIA fut assurée par le dosage de deux échantillons de contrôle de qualité fournis par le fabricant. La trousse RIA est à 100% spécifique pour les séquences d'adiponectine humaine, 400% pour celle de souris et moins de 0,1% pour celle de C1q.

4.3.3.5 Dosage de l'insuline

Pour les Études 1 et 2, les taux d'insuline ont été évalués par électrochimiluminescence (ECLIA) adaptée pour l'analyseur Elecsys 1010, avec une trousse Elecsys Insulin (Ref. 12017547; Medicorp, Montréal, Qc, Canada). Sapin et coll. ont rapporté des coefficients inter- et intra-dosage de moins de 8% et 3%, respectivement (381). Pour les Études 3 et 4, les taux d'insuline ont été évalués par RIA (Linco Research, St-Charles, MO, USA). Selon le fabricant, les variations inter- et intra-dosage sont respectivement de moins de 6% et 4,5%. La validation de la trousse RIA fut assurée par le dosage de deux échantillons de contrôle de qualité fournis par le fabricant. La trousse RIA est à 100% spécifique pour les séquences d'insuline, et possède une activité hétérospécifique inférieure à 0,2% pour la

pro-insuline humaine et non-déetectable pour l'IGF-1, le glucagon, la somatostatine et le polypeptide pancréatique.

4.3.3.6 Dosage combiné du bilan lipidique et du glucose

Les analyses ont été effectuées avec l'analyseur COBAS INTEGRA 400 (Roche Diagnostic, Montréal, Canada). Les taux sériques de cholestérol total, cholestérol HDL, les TG et le glucose furent déterminés au moyen de cassettes spécifiques comprenant le système de réactifs de diagnostic *in vitro*. Les taux de cholestérol LDL furent dérivés de l'équation de Friedwald en tenant compte des taux de cholestérol total, de HDL et de TG (382). Selon le manufacturier, les coefficients de variation des échantillons sériques étaient de 1,7% pour le cholestérol, de 2,1% pour le HDL, de 1,3% pour les triglycérides et de 1,3% pour le glycémie. Le HOMA fut calculé selon la formule de Matthews et coll. ($HOMA = [glucose] \times [insuline] / 22,5$) (383).

4.3.3.7 Dosage de hsCRP (à sensibilité élevée pour la protéine c-réactive)

Les taux de *hsCRP* ont été évalués par immunonephélogométrie (384) à l'aide d'un analyseur IMMAGE (Beckman-Coulter, Villepinte, France). Les dosages ont été effectués dans le laboratoire du Dr Jean-Philippe Bastard (Paris, France) et les variations inter- et intra-dosage étaient de moins de 5%.

4.3.3.8 Dosage de hsTNF- α (à sensibilité élevée pour le facteur de nécrose tumorale α) et sTNF-R1 (récepteur soluble TNF 1)

Les taux de hsTNF- α (385) et de hsTNF-R1 (386) furent évalués par ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). Selon le manufacturier, les variations inter- et intra-dosage de hsTNF- α sont, respectivement, de moins de 16,7% et 8,8%. La trousse ELISA est à 100% spécifique pour les séquences de hsTNF- α et aucune activité hétérosécifique n'a été détectée. Selon le manufacturier, les variations inter- et intra-dosage de sTNF-R1 sont, respectivement, de moins de 8,8% et

5,0%. La trousse ELISA est à 100% spécifique pour les séquences de sTNF-R1 et aucune activité hétérospécifique n'a été détectée.

4.3.3.9 Activité physique des temps libres (APTL)

La dépense énergétique associée à l'*activité physique pratiquée pendant les temps libres* (APTL) a été évaluée au moyen du questionnaire validé *Minnesota Leisure-Time Physical Activity* (387). Sous la supervision d'un évaluateur de l'Unité Métabolique, les sujets rapportaient avoir pratiqué ou non une activité physique au cours des 12 derniers mois. Avec l'aide des sujets, la fréquence et la durée de chaque activité rapportée furent évaluées par l'un des moniteurs de l'étude. La dépense énergétique fut déterminée à l'aide du *Compendium of Physical Activities Tracking Guide 2000* (388).

4.3.3.10 Dépense énergétique reliée à l'activité physique de la vie courante (DEAP)

La DEAP fut évaluée à l'aide d'un accéléromètre tri-axial RT3 (TriTrac, Stayhealthy, Monrovia, CA, USA). Le RT3 est un dispositif non invasif (validé par la méthode de l'eau doublement marquée) permettant d'obtenir une approximation objective de l'activité physique associée à la vie courante des sujets (389, 390). Le RT3 mesure les accélérations axiales antérieures-postérieures (x), médio-latérales (y) et verticales (z) en interprétant les informations sous forme de vecteur magnitude. Le vecteur fut calculé comme la racine carrée de la somme des accélérations pour chaque direction au carré. Les calories associées à l'activité furent calculées selon la formule suivante: $((\text{comptes d'activité}/10) \times (\text{masse corporelle} \times 1,692)) / 10\,000$. La fréquence de réponse pour la mesure de l'accélération était de 1 Hz et les données ont été emmagasinées à chaque minute. Les sujets furent avisés de porter le RT3 sur la hanche droite pendant trois journées consécutives (deux jours de semaine et un jour de fin de semaine) correspondant à l'activité physique caractéristique d'une journée normale. Les moyennes de la dépense énergétique associée à ces 3 journées sont rapportées.

4.3.3.11 Apport énergétique

L'apport énergétique total quotidien fut évalué à partir d'un rappel de 24 h par l'une des nutritionnistes professionnelles de l'Unité Métabolique de l'Université de Montréal. La grosseur des portions fut évaluée en utilisant des modèles plastiques représentant différentes grosseurs standard de portion. Les apports en énergie, protéines, lipides et carbohydrates furent évalués au moyen du logiciel Food Processor en utilisant le Fichier Canadien des Nutriments 2001b publié par Santé Canada (391).

4.3.3.12 Habitudes alimentaires

Les habitudes alimentaires furent évaluées au moyen d'un questionnaire auto-administré TFEQ (*Three-Factor Eating Questionnaire*) de Stunkard et Messick (392). Les résultats de ces questionnaires ont été évalués par des nutritionnistes professionnelles de l'Unité Métabolique du département de Nutrition. Ce questionnaire comprend 51 questions validées par les auteurs. La première section évalue la perception qui permet à un individu de manger intentionnellement moins qu'il le désirerait, soit la restriction alimentaire. La seconde section mesure l'incapacité de résister à la tentation lors de perceptions associées à l'inhibition de la restriction alimentaire et, conséquemment, la prise alimentaire émotive, soit la désinhibition alimentaire. La dernière section examine de façon subjective la perception générale de la faim chez un individu. Le TFEQ a été validé comme étant capable de fournir une mesure précise des facteurs cognitifs influençant les comportements alimentaires (392, 393). Après vérification, une question de la section sur la restriction alimentaire a été annulée, donnant un résultat final sur 20 plutôt que sur 21.

4.3.3.13 Métabolisme de base (MB)

Le MB fut mesuré par calorimétrie indirecte, au moyen de la méthode de la cloche ventilée (SensorMedics Delta Track II, Datex-Ohmeda, Helsinki, Finlande) par les étudiants et/ou par le personnel de recherche de l'Unité Métabolique, responsables des différentes études (plus de 50 par l'auteur). Les mesures des concentrations gazeuses de O₂ et de CO₂ ont été,

par la suite, utilisées pour calculer le MB à l'aide de l'équation de Weir (394). En prévision de l'évaluation du MB, les sujets furent avisés: 1) d'être à jeun depuis plus de 12 h (la consommation d'eau étant toutefois permise), 2) de ne pas consommer d'alcool et de ne pas fumer pendant une période d'au moins 24 h, 3) se restreindre de faire de l'activité physique pendant une période d'au moins 24 h et 4) de réduire toute activité physique le plus possible le matin du test. Les mesures furent prises pendant 40 minutes, alors que les sujets étaient en position allongée, les 10 premières minutes (considérées comme période d'acclimatation) n'étant pas incluses dans les résultats. Ainsi, seulement les mesures prises pendant les 30 dernières minutes ont été considérées en tant qu'analyses valides. La température de la pièce a été maintenue de façon constante à 22° C. La calibration de l'appareil permettant de mesurer les taux de O₂ et de CO₂ et la pression atmosphérique a été effectuée avant chaque analyse.

4.3.3.14 Mesures de la composition corporelle et anthropométriques

Les analyses de composition corporelle ont été effectuées par les étudiants et/ou par le personnel de recherche de l'Unité Métabolique. La masse corporelle (kg) a été mesurée au moyen d'une balance électronique avec une sensibilité de 0,02 kg (Balances Industrielles Montréal Inc., Montréal, Qc, Canada) et la taille (m) a été évaluée à l'aide d'un stadiomètre avec une précision de 0,1 cm (Perspective Enterprises, Portage, Michigan, USA). L'indice de masse corporelle (IMC) a été calculé à partir de la relation: masse corporelle (kg) / taille² (m²). Les sujets avec un IMC ≥ 27 kg/m² sont considérés en surpoids alors que ceux avec un IMC ≥ 30 kg/m² sont définis comme obèses. La circonférence de la taille a été déterminée directement sur la peau avec un ruban à mesurer flexible en unités métriques, avec une précision de 0,5 cm. La masse maigre corporelle, la masse adipeuse, et le pourcentage de masse adipeuse ont été obtenus par DXA (*Dual Energy X Ray Absorptiometry*) à l'aide du logiciel LUNAR version 6.10.019, de Prodigy System (General Electric Lunar Corporation, Madison, WI, USA). La masse adipeuse viscérale a été mesurée par tomographie axiale au moyen d'un dispositif à balayage *Advantage* à haute vitesse de marque GE (General Electric Medical Systems, Milwaukee, WI, USA) par des techniciens en radiologie de l'Hôpital St-Luc (Montréal, Canada). Cet instrument permet d'obtenir la masse adipeuse sous-cutanée et viscérale en évaluant sa superficie sur une

tranche d'image corporelle à la hauteur des vertèbres lombaires L4 et L5. Les sujets furent examinés en position couchée, les deux bras au-dessus de leur tête. L'aire d'adiposité viscérale fut déterminée par la démarcation de la cavité intra-abdominale comprenant la partie la plus interne de la paroi musculaire abdominale/oblique qui entoure la cavité postérieure du corps vertébral.

4.3.3.15 Capacité aérobie à l'effort maximal ($VO_{2\max}$)

La capacité aérobie à l'effort maximal a été mesurée sur vélo ergocycle Ergoline 900 (Bitz, Allemagne) au moyen d'une station de test d'exercice cardio-pulmonaire Ergocard (Medi Soft, Dinant, Belgique) par des étudiants de l'Unité Métabolique du département de Nutrition. Le système fut calibré avant le début de chaque test. Les paramètres évalués pendant la calibration sont: la pression barométrique, l'humidité relative et les concentrations gazeuses (au moyen d'un gaz standard primaire). Les volumes gazeux furent calibrés à l'aide d'une seringue de 2 L. La capacité aérobie fut testée de façon progressive en débutant à 60 W et en augmentant de 40 W à chaque 3 min. Les sujets ont été avisés de garder une vitesse constante et le niveau de résistance de la roue fut ajusté afin de préserver une production de puissance constante lors du test. Les taux de O_2 et de CO_2 ont été mesurés de façon directe à l'aide d'un masque couvrant la figure. Le $VO_{2\max}$ était considéré comme atteint lorsque la production de puissance ne pouvait être maintenue. Le $VO_{2\max}$ fut défini comme étant la moyenne des 30 sec où la consommation d'oxygène était la plus élevée.

4.3.3.16 Statistiques

Les statistiques ont été effectuées par l'auteur. Afin de valider les différentes analyses, un biostatisticien (Dr Miguel Chagnon) a été consulté. Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm écart-type (ET). Une valeur de $P < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative. La normalité de la distribution des différents facteurs a été évaluée au moyen d'une analyse Kolmogorov-Smirnov. Les analyses de corrélation de Pearson (valeur de « r ») ont été utilisées pour examiner les associations entre les

différentes valeurs d'intérêt. Afin d'évaluer l'impact d'une covariante sur une ou des associations, des analyses de corrélations partielles ont été effectuées. Des tests de t (valeurs paramétriques) ou des tests de somme de rang Mann-Whitney (valeurs non-paramétriques) ont été utilisés pour détecter des différences entre deux groupes. Pour permettre de déterminer l'impact de facteurs indépendants sur la variation des taux d'une valeur dépendante, une analyse de régression par étape fut effectuée. Les facteurs indépendants furent choisis de façon à ce qu'aucun facteur co-variant ne soit inclus dans le modèle. Une analyse de variance (ANOVA) fut effectuée afin de détecter un effet de temps (0 vs. 60, 160, 170, 180 min) sur les taux de ghréline (Études 3 et 4) et également pour évaluer si deux groupes ont réagi de façon différente pendant le CEH. En présence d'une interaction de temps ou de groupe, un test de Bonferroni fut utilisé pour déterminer si une différence significative existe entre le temps de base et les autres temps du CEH. Pour les Études 3 et 4, l'amplitude maximale de l'inhibition des taux de ghréline acylée, non-acylée et totale a été évaluée en tant que valeur de base (0 min) moins le niveau minimal (60, 160, 170 ou 180 min) observé pour chaque sujet. Les valeurs de l'aire sous la courbe ont été calculées manuellement par la méthode trapézoïdale pour les taux de base et les valeurs de l'AUC. Les analyses statistiques ont été exécutées au moyen du logiciel SPSS pour Windows (version 11.5).

5 RÉSULTATS

5.1 ASSOCIATION ENTRE LES TAUX CIRCULANTS DE GHRÉLINE ET LE MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE (ÉTUDE 1)

Étude publiée dans *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (référence 395).

Co-auteurs: David H. St-Pierre (collecte de données, analyses statistiques, rédaction du manuscrit, révision du manuscrit), Antony D. Karelis (analyses statistiques, collaboration à la rédaction du manuscrit, révision du manuscrit), Katherine Cianflone (révision du manuscrit), Florence Conus (collecte de données, révision du manuscrit), Diane Mignault (révision du manuscrit), Remi Rabasa-Lhoret (révision du manuscrit), Maxime St-Onge (collecte de données), Andréanne Tremblay-Lebeau (collecte de données, révision du manuscrit) et Eric T. Poehlman (supervision de l'étude).

Les résultats de plusieurs travaux récents suggèrent l'existence d'une association étroite entre les taux de ghréline totale en circulation et la régulation de l'homéostasie énergétique (331). L'Étude 1 (395) visait à établir plus spécifiquement la relation entre les taux circulants de ghréline avec le MB et l'utilisation des substrats énergétiques. L'Étude 1 s'est penchée également sur l'association possible entre les taux de ghréline totale et certains indices d'apport alimentaire, d'activité physique et de comportements alimentaires chez des femmes jeunes, non-obèses et en bonne santé.

Le **Tableau 5** présente les caractéristiques physiques de la cohorte de femmes de 18 à 35 ans, sensibles à l'insuline, qui a fait l'objet de l'Étude 1. Cette cohorte représente un échantillonnage statistiquement valable de poids, de composition ainsi que d'habitus corporels, à l'intérieur d'une population d'âge spécifique et de poids normal. Les critères de sélection utilisés pour recruter les sujets de cette cohorte ont été choisis en vue d'éliminer des facteurs tels l'âge, les désordres de comportements alimentaires, les taux élevés d'adiposité, la résistance à l'insuline ainsi que les importantes disparités de l'habitus corporel sur le développement de complications métaboliques, afin d'éviter que de tels facteurs ne puissent entraîner une interprétation biaisée des résultats.

Tableau 5. Caractéristiques physiques observées chez les sujets ayant participé à l'Étude 1

Jeunes femmes sensibles à l'insuline		
(n = 65)		
Caractéristiques Physiques	Moyenne ± ET	Étendue
Âge (années)	23 ± 4	18 – 35
Taille (m)	1,65 ± 0,05	1,53 – 1,82
Masse Corporelle (kg)	59,5 ± 7,4	41,6 – 77,9
IMC (kg/m ²)	21,99 ± 2,45	16,88 – 28,29
MAT (kg)	15,46 ± 5,16	7,00 – 28,70
MNA (kg)	41,51 ± 3,40	32,58 – 49,47
% MA	25,49 ± 5,85	14,0 – 37,7

Les valeurs sont exprimées en tant que moyenne ± ET. IMC: indice de masse corporelle; MAT: masse adipeuse totale; MNA : masse non-adipeuse; % MA : pourcentage de masse adipeuse. MAT et MNA sont mesurés par DXA.

Le **Tableau 6** fait état des variables pouvant être potentiellement associées aux taux de ghréline totale sérique chez cette même cohorte. Les mesures de la sensibilité à l'insuline (HOMA), du métabolisme de base (MB), de l'oxydation des substrats à jeun (QR), de l'estimé des apports caloriques (rappel de 24 h), de l'indice de dépense énergétique reliée à l'activité physique (questionnaire d'activité physique; DEAP), de la capacité aérobie à effort maximal ($VO_{2\text{ max}}$) et des caractéristiques des comportements alimentaires (restriction alimentaire, désinhibition alimentaire et perception générale de la faim) sont spécifiquement rapportées. Chez de jeunes femmes sensibles à l'insuline, les valeurs de désinhibition alimentaire et de perception générale de la faim ont été faibles alors que les valeurs d'inhibition alimentaire étaient plus élevées. Une importante amplitude de variation peut être observée parmi les jeunes femmes de cette cohorte.

Tableau 6. Caractéristiques du bilan énergétique des sujets ayant participé à l'Étude 1

Variable	Jeunes femmes sensibles à l'insuline (n = 65)	
	Moyenne ± ET	Étendue
APTL (kcal/jour)	335 ± 191	36 – 952
Apport énergétique (kcal/jour)	2381 ± 718	1145 – 4033
MB (kcal/jour)	1219 ± 157	820 – 1550
QR (à jeun)	0,82 ± 0,05	0,73 – 0,93
Désinhibition alimentaire	5,4 ± 3,1	0,0 – 13,0
Inhibition alimentaire	9,3 ± 3,8	1,0 – 18,0
Perception générale de la faim	5,2 ± 2,7	1,0 – 13,0
VO _{2 max} (ml/kg/min) (n= 64)	37,7 ± 6,3	25 – 56,5
Insuline à jeun (μU/ml)	4,3 ± 1,7	1,2 – 7,9
Ghréline totale sérique (pg/ml)	785 ± 260	128 – 1360

Les valeurs sont présentées comme étant la moyenne ± ET. MB: métabolisme de base (calorimétrie indirecte); QR: quotient respiratoire; APTL: activités physiques pendant les loisirs (LTA); VO_{2 max}: consommation d'oxygène à effort maximal. Les résultats maximaux pour les comportements alimentaires furent de 20 pour la restriction alimentaire, 16 pour la désinhibition alimentaire et 14 pour la perception générale de la faim. Après vérification et suite à l'annulation d'une question (due à une traduction inexacte), le résultat maximal pour la portion de la restriction alimentaire a été de 20 plutôt que de 21 (tel que trouvé originalement dans le *TFEQ*).

Une analyse corrélative de Pearson a été effectuée afin d'évaluer la relation entre les facteurs du bilan énergétique et les taux de base de ghréline totale. La **Figure 1** montre l'association négative entre les concentrations de ghréline totale à jeun et le MB ($r = -0,350$; $P = 0,004$). Cette relation est également examinée après une correction pour l'effet de la composition corporelle et des taux de base d'insuline à l'aide d'une analyse de corrélation partielle. La corrélation partielle entre la ghréline totale et le MB demeure significative après avoir pris en considération l'effet combiné de MAT et de MNA ($r = -0,284$; $P = 0,024$), ainsi que des taux de base d'insuline ($r = -0,255$; $P = 0,046$).

Comme l'indique la revue de la littérature, plusieurs auteurs ont décrit et commenté les effets orexigéniques de la ghréline totale (voir Section 2.2.3.1). Dans la même optique, nous avons vérifié s'il existait une relation significative entre les taux circulants de ghréline totale et les apports énergétiques quotidiens chez les jeunes femmes âgées entre 18 et 35 ans avec une importante variation de profil métabolique. Les résultats obtenus indiquent l'existence d'une relation négative entre l'apport énergétique quotidien et les taux de ghréline totale dans le sérum ($r = -0,27$; $P = 0,03$). Pour compléter ces résultats, une analyse partielle de corrélation a été effectuée et a permis de constater que l'association entre la ghréline totale et le MB était indépendante de l'effet de l'apport énergétique ($r = -0,34$; $P = 0,006$). Toutefois, aucune corrélation significative n'a pu être établie entre les taux de ghréline totale et les valeurs de MAT ($r = -0,138$), de MNA ($r = -0,209$), d'IMC ($r = -0,083$), de % MA ($r = -0,085$), de QR à jeun ($r = -0,002$), d'activité physique reliée aux loisirs ($r = 0,104$), de $VO_{2\max}$ ($r = 0,138$) et des pointages des comportements alimentaires (restriction alimentaire: $r = 0,051$; désinhibition alimentaire: $r = -0,071$; perception générale de la faim: $r = -0,028$).

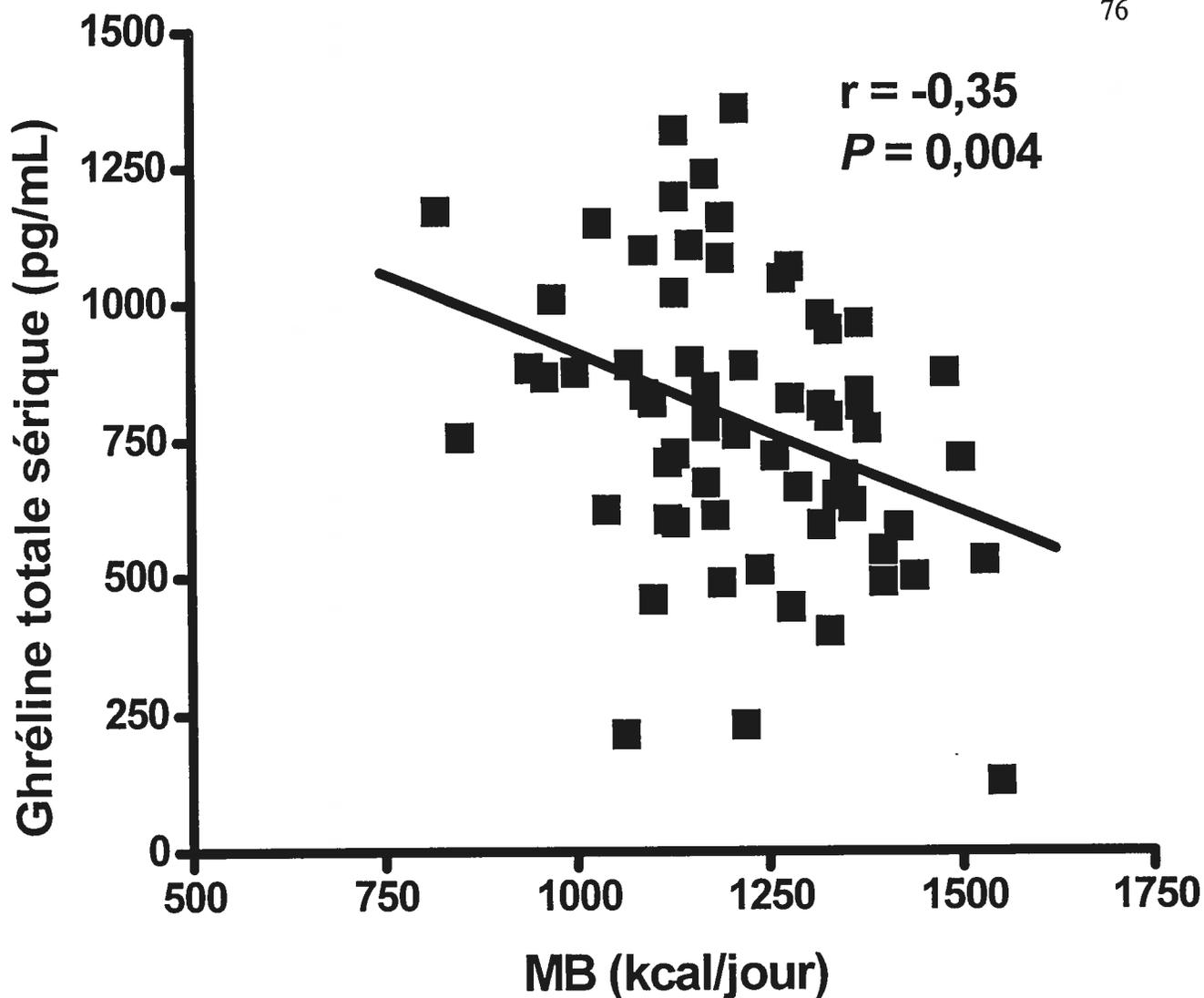


Figure 1 Corrélation entre les taux sériques de ghréline totale présents dans le sérum et le métabolisme de base. La droite de régression est indiquée. Suite à l'analyse de corrélations partielles, la valeur de « r » est demeurée significative après la correction pour l'effet combiné de MAT et de MNA ($r = -0,284$; $P = 0,024$), ainsi que pour celui des taux d'insuline en circulation ($r = -0,255$; $P < 0,05$).

5.2 HABITUDES DE VIE ET COMPOSANTES DE LA BALANCE ÉNERGÉTIQUE COMME PRÉDICTEURS DE LA VARIATION DES TAUX SÉRIQUES DE GHRÉLINE TOTALE, D'ADIPONECTINE ET DE LEPTINE (ÉTUDE 2)

Étude publiée dans *Diabetes & Metabolism* (référence 396).

Co-auteurs: David H. St-Pierre (collecte de données, analyses statistiques, rédaction du manuscrit, révision du manuscrit), May Faraj (analyses statistiques, rédaction du manuscrit, révision du manuscrit), Antony D. Karelis (analyses statistiques, collaboration à la rédaction du manuscrit, révision du manuscrit), Florence Conus (collecte de données), Jean-François Henry (collecte de données, révision du manuscrit), Maxime St-Onge (collecte de données), Andréanne Tremblay-Lebeau (collecte de données), Katherine Cianflone (révision du manuscrit) et Remi Rabasa-Lhoret (révision du manuscrit).

Les résultats d'études cliniques récentes semblent indiquer qu'il pourrait exister un lien étroit entre les taux circulants de ghréline totale et / ou acylée, d'adiponectine et de leptine et le développement de troubles métaboliques reliés à l'obésité (maladies cardiovasculaires, résistance à l'insuline, diabète de type 2) (104). Toutefois, on n'y retrouve pas en général d'explication satisfaisante relativement à la nature de l'implication de ces hormones dans l'origine et dans l'évolution de ces pathologies chez l'humain, et encore moins sur les mécanismes qui en sont responsables. L'état actuel des connaissances ne permet pas d'évaluer l'influence des habitudes de vie sur les paramètres hormonaux associés au développement de troubles métaboliques. L'Étude 2 a donc été planifiée pour étudier plus spécifiquement l'influence des habitudes alimentaires, de la forme physique, des taux d'activité physique et de l'utilisation de contraceptifs oraux chez des jeunes femmes non-obèses, en vue de tenter d'établir un lien entre ces facteurs et les variations des taux circulants de ghréline totale, d'adiponectine et de leptine. La cohorte sélectionnée pour cette étude était constituée de 63 jeunes femmes non-obèses, dont l'âge variait entre 18 et 35 ans. Les jeunes femmes des Études 1 et 2 ont participé au même protocole de recherche. Cependant, la population de l'Étude 1 comprend des jeunes femmes sensibles à l'insuline,

alors que la cohorte de l'Étude 2 inclut également les jeunes femmes résistantes à l'insuline.

Tel que rapporté dans le **Tableau 7**, les sujets faisant partie de l'Étude 2 présentaient une importante variation de poids (bien qu'aucune de ces jeunes femmes n'ait été obèse), de composition corporelle, de métabolisme énergétique, de taux de forme physique, de dépense énergétique reliée à l'activité physique ainsi que de comportements alimentaires.

Tableau 7. Caractéristiques physiques et habitudes de vie des sujets ayant participé à l'Étude 2

Jeunes femmes non-obèses		
(n=63)		
Caractéristiques	Moyenne ± ET	Étendue
Âge (années)	23,2 ± 3,7	18,2 – 35,3
IMC (kg/m ²)	21,9 ± 2,7	16,9 – 28,3
MNA (kg)	40,9 ± 3,3	34,6 – 50,7
MAT (kg)	16,2 ± 6,5	7,0 – 44,2
% MA	26,5 ± 7,0	14,0 – 49,0
MAC (kg)	5,8 ± 3,2	1,8 – 20,4
Circonférence de la taille (cm) (n = 61)	70,5 ± 6,4	57,5 – 97,0
Apport énergétique quotidien (Kcal/ jour)	2417 ± 721	1145 – 4033
MB (Kcal/jour)	1226 ± 156	820 – 1530
DÉAP (Kcal/ jour) (n = 58)	628 ± 192	191 – 1021
VO _{2 max} (mL/ kg/min) (n = 62)	36,8 ± 6,7	23,3 – 56,5
Désinhibition alimentaire	5,5 ± 3,1	0,0 – 13,0
Restriction alimentaire ^a	9,7 ± 4,0	1,0 – 18,0
Perception générale de la faim	5,1 ± 2,8	1,0 – 13,0

Les valeurs sont présentées en tant que moyenne ± ET. IMC : indice de masse corporelle; MNA : masse non-adipeuse; MAT: masse adipeuse totale; % MA: pourcentage de masse adipeuse; MAC: masse adipeuse centrale; MB: métabolisme de base; DÉAP: dépense énergétique reliée à l'activité physique (évaluée par RT3); VO_{2 max}: consommation d'oxygène à effort maximal. Les résultats maximaux pour les comportements alimentaires sont de 20 pour la restriction alimentaire, 16 pour la désinhibition alimentaire et 14 pour la perception générale de la faim. ^a: Après vérification et l'annulation d'une question (due à une traduction inexacte), le résultat maximal pour la portion de la restriction alimentaire est de 20 au lieu de 21 (tel que retrouvé à l'origine dans le *TFEQ*).

Le **Tableau 8** présente les valeurs du profil sanguin des jeunes femmes non-obèses. Plus spécifiquement, ce tableau comprend les données du profil lipidique (cholestérol total, HDL, LDL, TG), de la glycémie, de l'insuline, de la sensibilité à l'insuline, ainsi qu'un bilan hormonal sérique (ghréline totale, adiponectine et leptine) à jeun. Comme dans le **Tableau 7**, d'importantes variations des taux des différents facteurs du profil sanguin peuvent être observées. De plus, une étude plus approfondie a permis d'établir une fréquence d'antécédents familiaux de 19% pour le diabète de type 2, de 25% pour l'obésité, de 2% pour la dyslipidémie et de 18% pour l'hypertension chez ces jeunes femmes non-obèses.

Tableau 8. Caractéristiques du profil sanguin des sujets ayant participé à l'Étude 2

Jeunes femmes non-obèses		
(n = 63)		
Profil sanguin	Moyenne ± ET	Étendue
Cholestérol total (mmol/L)	4,49 ± 0,91	2,70 – 7,42
HDL (mmol/L)	1,69 ± 0,41	0,97 – 2,68
LDL (mmol/L)	2,42 ± 0,78	1,01 – 4,68
TG (mmol/L)	0,82 ± 0,33	0,42 – 1,82
Glycémie à jeun (mmol/L)	4,68 ± 0,38	3,8 – 5,4
Insuline à jeun (µU/mL)	5,1 ± 2,7	1,2 – 13,1
HOMA	1,07 ± 0,59	0,23 – 2,91
Ghréline totale sérique (pg/mL)	793 ± 247	214 – 1360
Adiponectine sérique (µg/mL)	10,1 ± 4,2	2,1 – 22,3
Leptine sérique (ng/mL)	8,21 ± 4,79	2,43 – 24,6

Les valeurs sont présentées en tant que moyenne ± ET. HDL: lipoprotéines à densité élevée; LDL: lipoprotéines à faible densité; TG: triglycérides; HOMA: *homeostasis model assessment*.

La prise de contraceptifs oraux étant très répandue chez les jeunes femmes des sociétés industrialisées, nous avons voulu tenir compte de ce facteur dans l'information tirée de l'Étude 2, pour vérifier si la prise de contraceptifs oraux pouvait influencer le profil métabolique ou les taux circulants de ghréline, d'adiponectine et de leptine.

Tel que présenté dans le **Tableau 9**, 46% des jeunes femmes non-obèses faisaient usage de contraceptifs oraux. Comparativement aux sujets n'en faisant pas usage, elles affichaient des taux accrus d'insuline à jeun, de résistance à l'insuline, et de TG. À la lumière de ces premiers résultats, l'impact de l'utilisation des contraceptifs oraux a été examiné en relation avec les composantes de la balance énergétique. Bien qu'aucun effet significatif n'ait été observé avec le MB, les analyses incluant le QR ont révélé que les sujets utilisant des contraceptifs oraux avaient tendance à oxyder les substrats énergétiques de nature lipidique au détriment de ceux de la famille des carbohydrates. Toutefois, aucune relation significative n'a pu être établie entre l'utilisation de contraceptifs oraux et les concentrations circulantes de ghréline totale, d'adiponectine et de leptine ou sur tout autre paramètre évalué dans l'Étude 2. Les associations entre la prise de contraceptifs oraux et les facteurs du profil métabolique n'ont pas été approfondies afin de ne pas interférer avec l'objectif principal de l'Étude 2, tel que décrit dans la Section 5.2.

Tableau 9. Différences des taux d'IMC, d'insuline à jeun, de résistance à l'insuline, de pourcentage de MA, d'oxydation des taux sériques de ghréline totale, d'adiponectine et de leptine chez les sujets ayant participé à l'Étude 2, faisant usage ou non de contraceptifs oraux

Jeunes femmes non-obèses		
	Utilisatrices de contraceptifs oraux (n= 29)	Non-utilisatrices de contraceptifs oraux (n= 34)
IMC (kg/m ²)	21,7 ± 2,8	22,1 ± 2,7
Insuline à jeun (μU/mL)	6,0 ± 2,9	4,3 ± 2,2*
HOMA	1,25 ± 0,66	0,92 ± 0,48*
TG (mmol/L)	0,98 ± 0,33	0,70 ± 0,28**
Ghréline totale sérique (pg/mL)	790 ± 242	795 ± 254
Adiponectine sérique (μg/mL)	10,6 ± 4,1	9,7 ± 4,2
Leptine sérique (ng/mL)	8,8 ± 5,1	7,7 ± 4,5
MB (Kcal/jour)	1230 ± 145	1223 ± 168
QR	0,81 ± 0,48	0,83 ± 0,05

Les valeurs sont présentées en tant que moyenne ± ET. IMC: indice de masse corporelle; HOMA: *homeostasis model assessment*; TG: triglycérides ; MB: métabolisme basal; QR; quotient respiratoire. Les taux de signification: * = $P < 0,01$; ** = $P < 0,001$.

L'hypothèse voulant que les concentrations sanguines de ghréline totale, d'adiponectine et de leptine soient influencées par les composantes de la balance énergétique (forme physique, activité physique et habitudes alimentaires) a été vérifiée chez la cohorte de jeunes femmes non-obèses. Le **Tableau 10** présente les associations entre les trois hormones d'intérêt et les paramètres de la balance énergétique.

Les données du **Tableau 10** indiquent, tel que déjà publié par St-Pierre et coll. (395), que les taux sériques de ghréline totale sont négativement corrélés aux apports énergétiques quotidiens ($r = -0,26$; $P = 0,04$) et au MB ($r = -0,28$; $P = 0,03$). Aussi, les taux de ghréline totale sont corrélés négativement aux taux d'insuline à jeun ($r = -0,26$; $P = 0,04$) ainsi qu'à l'indice de sensibilité à l'insuline HOMA ($r = -0,25$; $P < 0,05$), mais positivement aux taux de HDL ($r = 0,32$; $P = 0,01$).

Dans le **Tableau 10**, on observe également que les taux d'adiponectine sont corrélés négativement aux apports énergétiques quotidiens ($r = -0,38$; $P = 0,002$) et positivement à la dépense énergétique reliée à l'activité physique ($r = 0,31$; $P = 0,019$). Les concentrations sériques d'adiponectine sont associées de façon négative à tous les indices d'adiposité: l'IMC ($r = -0,28$; $P = 0,02$), la MAT ($r = -0,31$; $P = 0,01$), la MAC ($r = -0,35$; $P = 0,005$) et à la circonférence de la taille ($r = -0,452$; $P = 0,001$). Finalement, l'adiponectine en circulation est reliée positivement au HDL ($r = 0,36$; $P = 0,004$) ainsi qu'au cholestérol total ($r = -0,28$; $P = 0,03$), mais négativement à la leptine ($r = -0,25$; $P < 0,05$).

Les taux circulants de leptine sont corrélés positivement au MB ($r = 0,33$; $P = 0,007$) et à la désinhibition alimentaire ($r = 0,27$; $P = 0,03$), mais négativement aux taux d'activité physique ($VO_2 \text{ max}$) ($r = -0,34$; $P = 0,006$) (voir **Tableau 10**). La leptine est également associée positivement à l'insuline à jeun ($r = 0,42$; $P < 0,001$), au HOMA ($r = 0,44$; $P < 0,001$) et ainsi, tel qu'anticipé, à tous les indices d'adiposité (et ce même dans une cohorte de jeunes femmes non-obèses), tels IMC ($r = 0,60$; $P < 0,001$), MAT ($r = 0,726$; $P < 0,001$), MAC ($r = 0,71$; $P < 0,001$) et la circonférence de la taille ($r = 0,55$; $P < 0,001$).

Tableau 10. Corrélations de Pearson entre les taux sériques de ghréline totale, d'adiponectine, de leptine et des variables métabolique de sujets ayant participé à l'Étude 2

Jeunes femmes non-obèses			
Caractéristiques physiques et métaboliques	Ghréline totale	Leptine	Adiponectine
IMC	NS	0,60***	-0,28*
MAT	NS	0,73***	-0,31*
MAC	NS	0,71***	-0,35**
Circonférence de la taille	NS	0,55***	-0,45***
HOMA	-0,25*	0,44***	NS
Insuline à jeun	-0,26*	0,42***	NS
Glycémie à jeun	NS	NS	NS
TG	NS	NS	NS
HDL	0,32*	NS	0,36**
LDL	NS	NS	NS
Cholestérol total	NS	NS	0,28*
Comportements alimentaires et composantes de la balance énergétique			
Apport énergétique quotidien	-0,26*	NS	-0,38**
MB	-0,28*	0,33**	NS
DÉAP	NS	NS	0,31*
VO ₂ max	NS	-0,34**	NS
Restriction alimentaire	NS	NS	NS
Désinhibition alimentaire	NS	0,27*	NS
Perception générale de la faim	NS	NS	NS

Niveau de signification: NS = non-significatif; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Un modèle de régression linéaire à étape a été utilisé pour évaluer la possibilité que les composantes de la balance énergétique puissent expliquer les variations des taux de ghréline totale, d'adiponectine et de leptine dans la cohorte de jeunes femmes non-obèses. Les résultats des différents modèles de régression linéaire par étape sont présentés dans le **Tableau 11**. Ce modèle statistique permet d'observer la valeur des prédicteurs indépendants des taux hormonaux en ordre croissant.

Dans un modèle d'analyse de régression par étape visant à expliquer la variation des taux de ghréline totale, les variables indépendantes utilisées étaient: l'indice de sensibilité à l'insuline HOMA, le HDL, MB et l'apport énergétique quotidien. Après avoir contrôlé l'effet de l'IMC, les valeurs de HDL et de MB ont prédit une variation de 17,6% des concentrations de ghréline en circulation (voir **Tableau 11**).

Dans un modèle d'analyse de régression par étape visant à expliquer la variation des taux d'adiponectine, les variables indépendantes utilisées étaient: l'apport énergétique quotidien, DÉAP, MAT, la circonférence de la taille et le HDL. Après avoir corrigé l'effet de MAT, la variance des taux d'adiponectine peut s'expliquer jusqu'à 43% par une combinaison de facteurs indépendants, soient les apports énergétiques quotidiens, la circonférence de la taille et DÉAP (voir **Tableau 11** et **Figure 2**).

Dans un modèle d'analyse de régression par étape visant à expliquer la variation des taux de leptine, les variables indépendantes utilisées étaient: MAT, l'indice de sensibilité à l'insuline HOMA, MB, la désinhibition alimentaire, $VO_2 \text{ max}$ et les concentrations d'adiponectine. MAT peut expliquer jusqu'à 52,7% la variation des taux de leptine, alors que l'effet d'aucun autre facteur n'a pu être ajouté au modèle (**Tableau 11**).

Finalement, il est important de noter que l'indice de sensibilité à l'insuline HOMA est corrélé positivement, à la fois avec MAT ($r = 0,38$; $P = 0,002$) et la masse adipeuse centrale ($r = 0,41$; $P = 0,001$). De plus, aucune corrélation n'est observée entre DÉAP et MB dans l'Étude 2.

Tableau 11. Analyse de régression par étape évaluant l'effet de prédicteurs indépendants reliés au développement de troubles métaboliques sur la variation des concentrations sériques de ghréline totale, d'adiponectine et de leptine chez les sujets ayant participé à l'Étude 2 (n = 55)

Variable Dépendante	Étape	Variable indépendante ^a	Direction	r ² Partiel	r ² Cumulatif	Valeur P
Ghréline sérique	1	HDL	+	0,11	0,11	0,001
	2	MB	-	0,07	0,18	0,001
Adiponectine sérique	1	Apport énergétique quotidien	-	0,28	0,28	0,003
	2	Circonférence de la taille	-	0,08	0,36	0,01
	3	DÉAP	+	0,08	0,44	0,01
Leptine sérique	1	MAT	+	0,53	0,53	<0,001

^a Le modèle de régression linéaire par étapes a été corrigé avec l'effet d'IMC pour la ghréline totale, et avec l'effet de MAT pour l'adiponectine et la leptine.

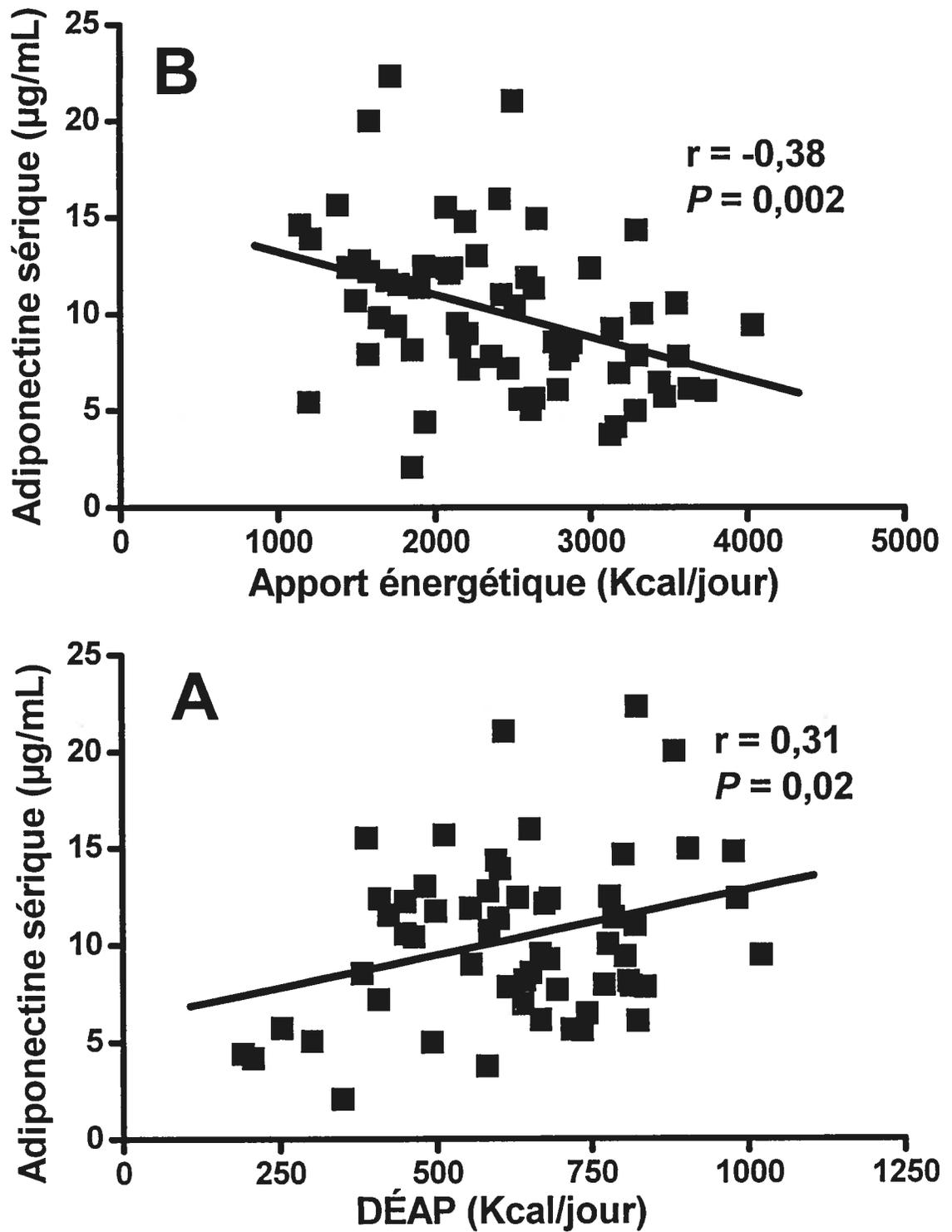


Figure 2. Association des taux sériques d'adiponectine à ceux de la dépense énergétique liée à l'activité physique (A) et à l'apport énergétique quotidien (B) chez les sujets ayant participé à l'Étude 2.

5.3 ÉTUDE DES PROFILS DE GHRÉLINE ACYLÉE ET NON-ACYLÉE CHEZ DES FEMMES POST-MÉNOPAUÉES INSULINO-SENSIBLES OU INSULINO-RÉSISTANTES, OBÈSES OU EN SURPOIDS (ÉTUDE 3)

Étude acceptée dans *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.

Co-auteurs: David H. St-Pierre (collecte de données, analyses statistiques, rédaction du manuscrit, révision du manuscrit), Antony D. Karelis (collecte de données, analyses statistiques, collaboration à la rédaction du manuscrit, révision du manuscrit), Lise Coderre (collaboration à la rédaction et révision du manuscrit), Florin Malita (collecte de données et révision du manuscrit), Jonathan Fontaine (collecte de données et révision du manuscrit), Diane Mignault (collecte de données et révision du manuscrit), Martin Brochu (révision du manuscrit), Jean-Philippe Bastard (révision du manuscrit), Katherine Cianflone (révision du manuscrit), Éric Doucet (révision du manuscrit), Pascal Imbeault (révision du manuscrit) et Rémi Rabasa-Lhoret (supervision de l'étude, collecte de données et révision du manuscrit).

Récemment acceptée pour publication dans *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, l'Étude 3 vise à évaluer les profils de ghréline acylée, non-acylée et totale dans deux sous-groupes de sujets *InsulinoSensibles* ou *InsulinoRésistants Obèses* ou avec *Surpoids* (ISOS ou IROS respectivement). Le CEH a été utilisé afin d'établir un profil de ghréline acylée, non-acylée et totale le plus représentatif et le plus exhaustif possible. Les paramètres de ghréline examinés sont: les taux de base (0 min), les taux de fin de clamp (180 min), les valeurs d'AUC et l'abaissement maximal des taux de ghréline stimulée par l'insuline. De plus, le rapport ghréline acylée/non-acylée a été calculé pour les valeurs de base (0 min) et pour l'AUC.

La cohorte ayant participé à l'Étude 3 comprenait 89 femmes post-ménopausées non-diabétiques, mais manifestant des problèmes d'obésité ou de surpoids. L'âge des sujets variait entre 46 et 73 ans. La classification des sujets ISOS et IROS a été effectuée en tenant compte des tertiles de sensibilité à l'insuline (déterminée par la technique du CEH).

Les individus faisant partie du tertile avec la sensibilité à l'insuline la plus élevée (sensibilité à l'insuline $\geq 12,07$ mL/min/kg de MNA; $n = 31$) ont été classifiés comme ISOS, alors que les sujets étant associés au tertile de sensibilité à l'insuline la plus réduite (sensibilité à l'insuline $\leq 10,28$ mL/min/kg de MNA; $n = 29$) ont été considérés comme IROS.

Les caractéristiques générales des sujets ISOS et IROS sont présentées dans le **Tableau 12**. Les deux groupes sont comparables en ce qui concerne l'âge, la taille, la masse corporelle, l'IMC et la MAT. Par contre, les taux d'adiposité viscérale (AV), de masse maigre (MM) et d'insuline de base sont significativement plus bas chez les sujets ISOS ($P < 0,05$). Conséquemment à nos critères de classification, les sujets ISOS ont manifesté une sensibilité à l'insuline accrue lorsque comparés à celle du sous-groupe IROS ($P < 0,001$). De plus, des taux moins importants de triglycérides ($P < 0,001$) et plus élevés de HDL ($P < 0,001$) ont été observés chez les ISOS. Toutefois, aucune différence significative dans le cholestérol total, le LDL ou dans la glycémie à jeun n'a été décelée entre les sujets ISOS et IROS.

Tableau 12. Caractéristiques générales des femmes obèses ou en surpoids post-ménopausées ayant participé à l'Étude 3

Caractéristiques générales	ISOS (n = 31)	IROS (n = 29)
Âge (années)	57,70 ± 5,80	58,82 ± 4,58
Taille (m)	1,60 ± 0,05	1,62 ± 0,07
Poids (kg)	83,08 ± 10,12	88,11 ± 14,80
IMC (kg/m ²)	32,62 ± 4,31	33,63 ± 4,23
MM (kg)	40,68 ± 3,78 **	45,59 ± 7,71
MAT (kg)	39,96 ± 8,69	40,08 ± 8,74
AV (cm²)	181,09 ± 49,99 *	215,81 ± 65,77
Cholestérol total (mmol/L)	5,60 ± 0,77	5,55 ± 0,86
Triglycérides (mmol/L)	1,32 ± 0,47 **	2,12 ± 0,88
HDL (mmol/L)	1,63 ± 0,34 **	1,33 ± 0,21
LDL (mmol/L)	3,36 ± 0,62	3,25 ± 0,83
Glycémie à jeun (mmol/L)	4,94 ± 0,48	5,10 ± 0,52
Insulinémie à jeun (µU/mL)	12,58 ± 4,48 *	19,50 ± 7,70
Sensibilité à l'insuline (mL/min/kg de MNA)	14,65 ± 2,46 **	8,20 ± 1,43

Les données sont présentées par moyenne ± ET. IMC: indice de masse corporelle; MM: masse maigre; MAT: masse adipeuse totale; AV: adiposité viscérale; HDL: lipoprotéines à densité élevée; LDL: lipoprotéines à faible densité. Les caractères gras indiquent une différence significative entre les sujets ISOS et IROS. Les taux de signification déterminés par ANOVA sont: * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,005$.

La **Figure 3** présente les profils de sécrétion de ghréline acylée, non-acylée et totale lors du CEH. Les valeurs de base des concentrations de ghréline acylée (ISOS: 98 ± 47 pg/mL; IROS: 114 ± 57 pg/mL) non-acylée (ISOS: 1156 ± 359 pg/mL; IROS: 971 ± 395 pg/mL) et totale (ISOS: 1246 ± 369 pg/mL; IROS: 1063 ± 399 pg/mL) sont aussi exprimées. Bien qu'on observe une tendance vers des taux de ghréline totale plus élevés ($P < 0,08$) chez les sujets ISOS, aucune différence significative des taux de base de ghréline acylée, non-acylée et totale n'est observée.

Toutefois, le rapport des taux de base de ghréline acylée/non-acylée est significativement moins élevé chez les ISOS que chez les IROS ($0,08 \pm 0,03$ vs. $0,13 \pm 0,11$ respectivement; $P < 0,01$). Les données de la **Figure 3** indiquent que, chez les ISOS et les IROS, le maintien de l'état d'hyperinsulinémie induit un effet significatif de groupe sur les profils de sécrétion de ghréline acylée et de ghréline totale. De plus, l'administration d'insuline a engendré une décroissance des concentrations de base de ghréline non-acylée et totale tout au long du CEH (60, 160, 170 et 180 min). Toutefois, cette diminution des taux de base de ghréline acylée n'a pu être détectée que chez les sujets ISOS (60, 160, 170 et 180 min).

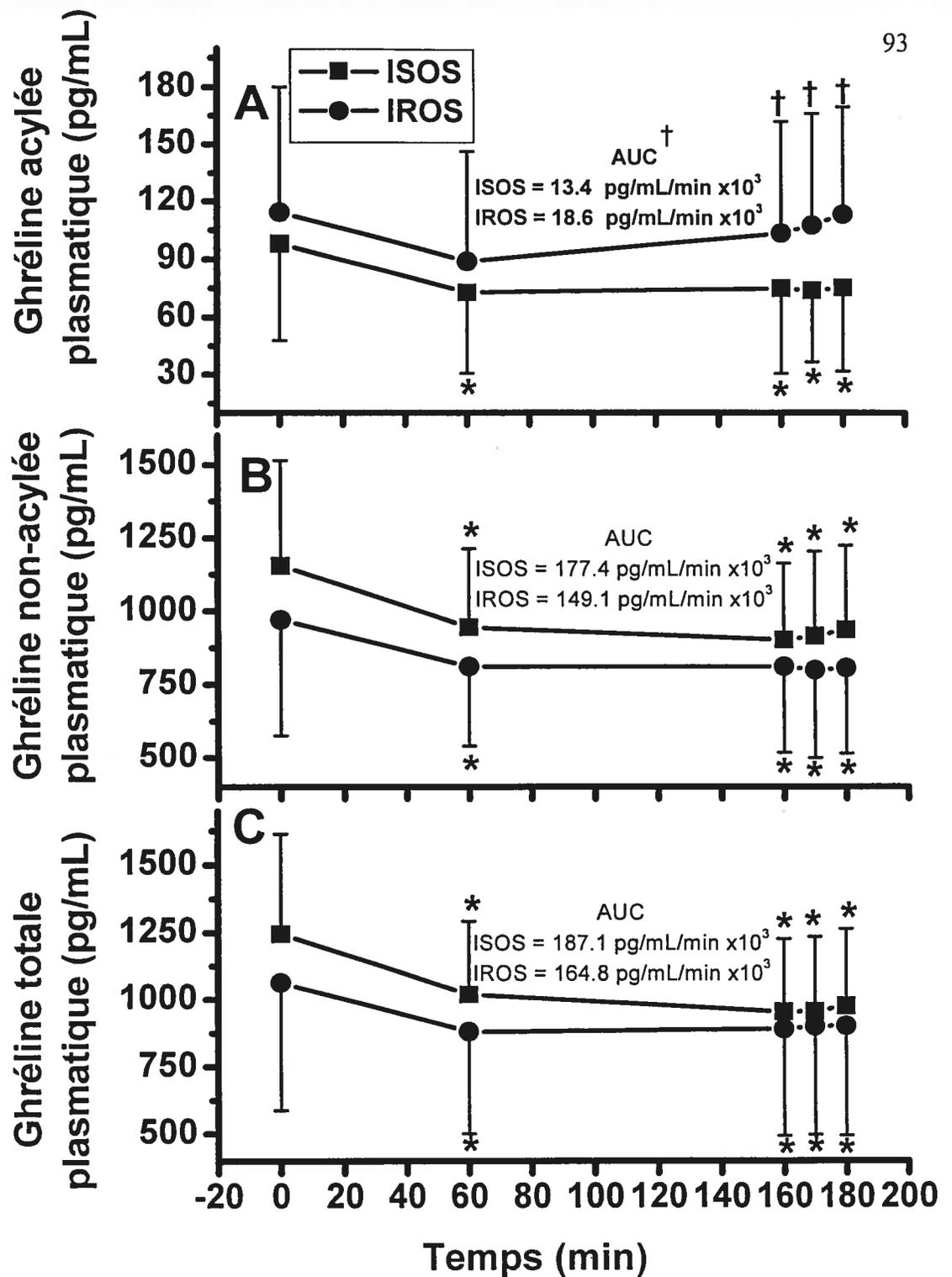


Figure 3. Taux plasmatiques de ghréline acylée (A), non-acylée (B) et totale (C) de base et pendant le CEH chez les sujets ISOS et les IROS ayant participé à l'Etude 3. Les valeurs exprimées: moyenne \pm ET. * = significativement différent des valeur de bases ($P < 0.01$). † = significativement différent entre les sujets ISOS et IROS ($P < 0.05$). Un effet significatif de groupe, déterminé par ANOVA, est détecté pour la ghréline acylée et la ghréline totale ($P < 0.05$).

Les valeurs d'AUC de ghréline acylée, non-acylée et totale sont décrites dans le **Tableau 13**. Bien qu'aucune différence ne soit observée pour la ghréline non-acylée et totale, les valeurs d'AUC de ghréline acylée des sujets ISOS sont significativement abaissées ($P < 0,05$) comparativement à celles des sujets IROS. De plus, chez les ISOS, le rapport dérivé des valeurs d'AUC de ghréline acylée/totale est également plus bas que celui des IROS ($0,07 \pm 0,02$ vs. $0,14 \pm 0,11$ respectivement; $P < 0,05$).

Tableau 13. Différences entre les valeurs d'AUC de ghréline acylée, non-acylée et totale chez les sujets ISOS et IROS ayant participé à l'Étude 3 pendant le CEH

AUC	ISOS	IROS
Ghréline totale plasmatique (pg/mL/min x10 ³)	187,1 ± 49,1	164,8 ± 54,1
Ghréline non-acylée plasmatique (pg/mL/min x10 ³)	177,4 ± 49,9	149,1 ± 53,8
Ghréline acylée plasmatique (pg/mL/min x10 ³)	13,4 ± 5,9 *	18,6 ± 9,0

Les données sont présentées en tant que moyenne ± ET. Le niveau de signification déterminé par ANOVA est: * = $P < 0,05$.

Tel que l'indiquent la **Figure 3** et la **Figure 4**, des taux plus élevés de ghréline acylée sont détectés aux temps 160, 170 et 180 min du CEH chez les individus IROS. L'abaissement maximal des taux de ghréline acylée, non-acylée et totale induit par l'état d'hyperinsulinémie est observé à des temps différents (de 60 à 180 min) chez les sujets de cette cohorte. De plus, aucune différence significative entre ces valeurs ne permet d'établir que les taux de ghréline ont été diminués de façon différente chez les sujets ISOS ou IROS. Toutefois, tel que présenté dans la **Figure 4**, chez les ISOS, l'état d'hyperinsulinémie prolongée a induit un abaissement maximal supérieur à celui des IROS pour les taux de ghréline acylée ($44,1 \pm 32,5$ pg/mL vs $23,0 \pm 30,4$ pg/mL respectivement; $P < 0,05$) et ceux de ghréline totale ($369,1 \pm 183,8$ pg/mL vs $225,7 \pm 203,4$ pg/mL respectivement; $P < 0,05$). Cependant, aucune différence significative n'a pu être détectée pour la ghréline non-acylée.

Le **Tableau 14** présente les associations entre la valeur de sensibilité à l'insuline et les différents facteurs du profil de ghréline acylée, non-acylée et totale chez les femmes post-ménopausées ISOS et les IROS. La valeur de sensibilité à l'insuline est significativement corrélée avec l'abaissement maximal de ghréline acylée et de la ghréline totale pendant le CEH ($r = 0,36$; $P < 0,01$ and $r = 0,36$; $P < 0,05$ respectivement).

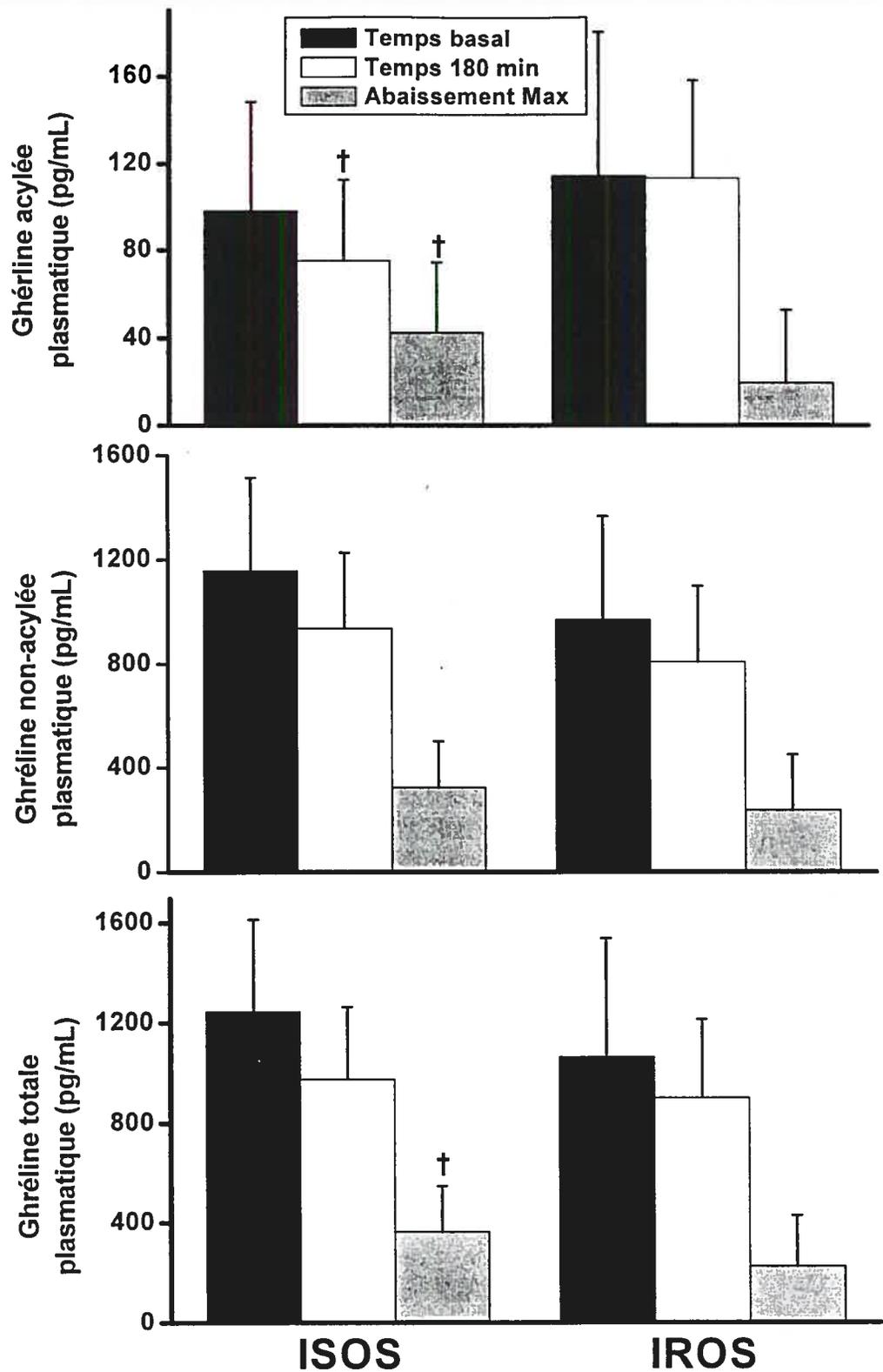


Figure 4. Valeur de base, au temps 180 min Baseline, et abaissement maximal des taux plasmatiques de ghréline acylée, non-acylée et totale chez les sujets ISOS et IROS de l'Étude 3. Les valeurs: moyenne \pm ET. † indiquent une différence significative entre les individus ISOS et IROS ($P < 0,05$).

Tableau 14. Corrélations de Pearson entre la sensibilité à l'insuline et les valeurs d'AUC et d'abaissement maximal de ghréline acylée, non-acylée et totale chez la cohorte de femmes ayant participé à l'Étude 3, comprenant à la fois les femmes post-ménopausées ISOS et IROS

Hormones	Sensibilité à l'insuline	
	AUC	Abaissement maximal
Ghréline totale plasmatique (n = 55)	R = 0,21	r = 0,36 **
Ghréline non-acylée plasmatique (n = 39)	R = 0,23	r = 0,25
Ghréline acylée plasmatique (n = 40)	r = -0,21	r = 0,36 *

Les données sont présentées en tant que moyenne \pm ET. Le niveau de signification * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$.

5.4 ÉTUDE DE LA RELATION POSSIBLE ENTRE LES TAUX PLASMATIQUES DE GHRÉLINE ACYLÉE ET LES MARQUEURS CHRONIQUES DE L'INFLAMMATION CHEZ DES FEMMES POST-MÉNOPAUSÉES OBÈSES OU EN SURPOIDS (ÉTUDE 4)

Étude soumise dans *Clinical Endocrinology*.

Co-auteurs: David H. St-Pierre (collecte de données, analyses statistiques, rédaction du manuscrit, révision du manuscrit), Jean-Philippe Bastard (révision du manuscrit et dosages de hsCRP), Martin Brochu (révision du manuscrit), Antony D. Karelis (collecte de données, analyses statistiques, collaboration à la rédaction et révision du manuscrit), Lise Coderre (collaboration à la rédaction et révision du manuscrit), Marie-Ève Lavoie (révision du manuscrit), Florin Malita (collecte de données et révision du manuscrit), Jonathan Fontaine (collecte de données et révision du manuscrit), Diane Mignault (collecte de données et révision du manuscrit), Katherine Cianflone (révision du manuscrit), Pascal Imbeault (révision du manuscrit), Éric Doucet (révision du manuscrit) et Rémi Rabasa-Lhoret (supervision de l'étude, collecte de données et révision du manuscrit).

L'Étude 4 visait à examiner l'association entre les taux de base de marqueurs de l'inflammation chronique, tels hsCRP (*high sensitivity CRP*), hsTNF- α et sTNF-R1 et les profils de ghréline (acylée, totale et acylée/totale) en état d'hyperinsulinémie prolongée, chez des femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids.

La population de l'Étude 4 comprend 53 femmes post-ménopausées dont l'âge variait entre 48 et 73 ans. Pour les fins de cette étude, une cohorte composée de femmes obèses ou en surpoids, présentant des taux allant de faibles à élevés de susceptibilité à développer des troubles métaboliques, sans avoir préalablement reçu de diagnostic de complications sévères (tels diabète de type 2 ou maladies cardiovasculaires), a été sélectionnée et recrutée. Tel qu'anticipé, d'importantes variations de poids, de composition corporelle, de profil lipidique, de résistance à l'insuline et de profil inflammatoire ont été observées chez cette cohorte. Ces paramètres sont présentés dans le **Tableau 15** et le **Tableau 16**.

Trois sujets ayant affiché des taux plasmatiques supra-physiologiques de hsCRP, hsTNF- α et sTNF-R1, leurs données métaboliques ont été considérées comme aberrantes et ont été exclues des analyses statistiques.

L'adiposité viscérale des sujets utilisés est positivement associée aux taux mesurés de hsCRP et de sTNF-R1 ($P < 0,05$), mais pas aux profils plasmatiques de ghréline acylée ou totale ($P > 0.05$). Toutefois, les taux plasmatiques de ghréline acylée, hsCRP et sTNF-R1 sont tous associés, de façon significative, à l'adiposité totale. Ces données sont présentées dans le **Tableau 17**.

Tableau 15. Caractéristiques physiques des sujets ayant participé à l'Étude 4

Femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids		
(n = 50)		
Caractéristiques Physiques	Moyenne ± ET	Étendue
Âge (années)	58,0 ± 5,7	48,8 – 72,9
Taille (m)	1,60 ± 0,06	1,50 – 1,73
Poids (kg)	83,4 ± 13,9	62,6 – 123,6
IMC (kg/m ²)	32,5 ± 4,3	26,2 – 42,8
MAT (kg)	38,6 ± 9,1	25,2 – 61,2
MM (kg)	42,4 ± 6,8	32,6 – 61,3
% MA	46,0 ± 4,9	36,5 – 56,9
AV (cm ²)	188,8 ± 61,4	93,7 – 345,6

Valeurs présentées en tant que moyenne ± ET. IMC: indice de masse corporelle; MAT: masse adipeuse totale; MM: masse maigre; %MA: pourcentage de masse adipeuse; AV: adiposité viscérale. MAT et MM sont mesurés à l'aide du DXA.

Tableau 16. Caractéristiques du profil métabolique et inflammatoire des sujets ayant participé à l'Étude 4

Femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids			
(n = 50)			
Variable	Moyenne ± ET	Étendue	
Cholestérol total (mmol/mL)	5,70 ± 0,81	4,01 – 7,45	
Triglycérides (mmol/mL)	1,76 ± 0,75	0,7 – 4,5	
HDL (mmol/mL)	1,51 ± 0,32	0,99 – 2,36	
LDL (mmol/mL)	3,39 ± 0,74	1,43 – 5,09	
Glycémie à jeun (mmol/mL)	4,99 ± 0,43	4,00 – 5,83	
Insuline à jeun (µUI/mL)	15,22 ± 7,01	4,87 – 44,48	
HOMA	3,40 ± 1,65	1,00 – 9,50	
Sensibilité à l'insuline (mL/min/kg de MNA)	11,66 ± 3,52	4,76 – 19,04	
hsCRP de base (mg/L)	3,89 ± 3,38 (n= 49)	0,40 – 14,60	
hsTNF-α de base (pg/mL)	0,68 ± 0,61 (n= 48)	0,06 – 3,25	
sTNF-R1 de base (pg/mL)	999 ± 208 (n= 49)	612 – 1607	

Valeurs présentées en tant que moyenne ± ET. HDL: *high density lipoprotein*; LDL: *low density lipoprotein*; HOMA: *homeostasis model assessment*; MM: masse maigre; hsCRP: *high sensitivity C-reactive protein*; hsTNF-α: *high sensitivity tumor necrosis factor α*; sTNF-R1: *soluble tumor necrosis factor receptor 1*.

Tableau 17. Corrélations de Pearson entre les taux plasmatiques basaux de ghréline totale, de ghréline acylée, de hsCRP, de hsTNF- α et de sTNF-R1 chez les femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids ayant participé à l'Étude 4

Facteurs plasmatiques	MAT	AV
Ghréline totale basale	NS	NS
Ghréline acylée basale	- 0,35*	NS
hsCRP basale	0,42**	0,55***
hsTNF- α basale	NS	NS
sTNF-R1 basale	0,39**	0,36*

Niveau de signification: MAT: masse adipeuse totale; AV: adiposité viscérale; NS: non-significatif; hsCRP: protéine C-réactive à sensibilité élevée; hsTNF- α : facteur de nécrose tumorale à sensibilité élevée; sTNF-R1: récepteur TNF soluble 1. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

L'effet prolongé de l'état hyperinsulinémique sur les taux en circulation de ghréline acylée et de ghréline totale est décrit dans le **Tableau 18** et dans la **Figure 5**. Pendant les 160 premières minutes du CEH, les valeurs des taux de base de ghréline acylée et de ghréline totale diminuent. Cette diminution est maintenue pour la ghréline totale, alors que les concentrations de ghréline acylée tendent à revenir vers les taux de base aux temps 170 et 180 du CEH (voir **Figure 5**).

Suite aux résultats obtenus au cours de l'Étude 4 pour la ghréline acylée et totale, les valeurs d'AUC, d'abaissement maximal ainsi que le rapport ghréline acylée/ghréline totale sont présentées dans le **Tableau 18**.

Tableau 18. Profils plasmatiques de ghréline acylée, totale et du rapport ghréline acylée / ghréline totale chez les sujets ayant participé à l'Étude 4

Femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids			
(n = 50)			
	0 min	AUC x 10³	Réduction maximale
	(pg/mL)	(pg/mL/min)	(pg/mL)
Ghréline totale plasmatique	1164 ± 405 (470 – 1890)	177 ± 55 (79 – 287)	293 ± 196 (43 – 934)
Ghréline acylée plasmatique	104 ± 52 (38 – 235)	15 ± 7 (6 – 34)	36 ± 37 (48,4 – 145)
Ghréline acylée/totale plasmatique	0,09 ± 0,04 (0,04 – 0,28)	0,09 ± 0,05 (0,04 – 0,36)	–

Les valeurs sont présentées en tant que moyenne ± ET (Étendue).

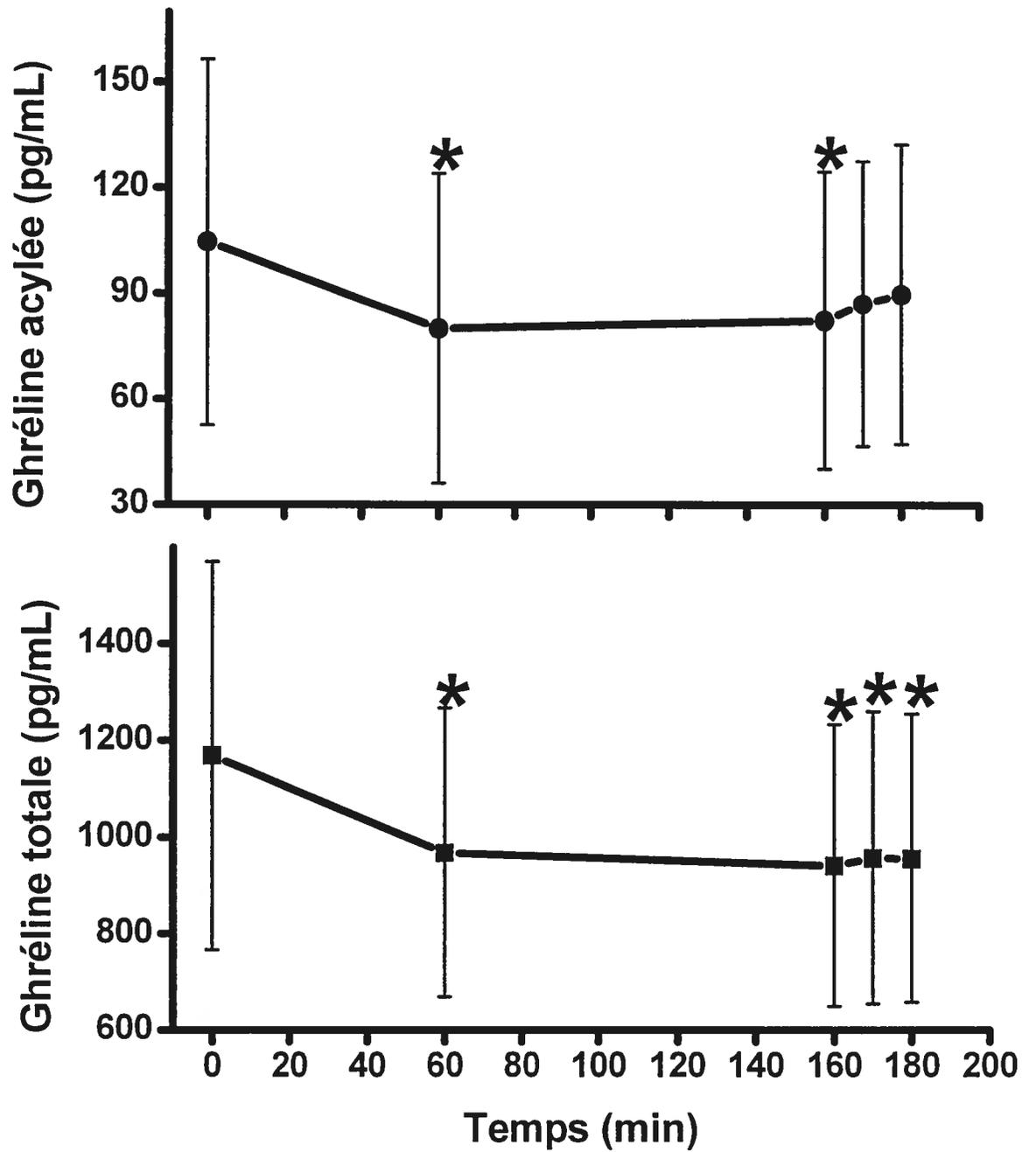


Figure 5. Profil plasmatique de sécrétion de la ghréline acylée et de la ghréline totale pendant le CEH chez les sujets ayant participé à l'Étude 4. Les valeurs sont présentées en tant que moyenne \pm ET. * = différences significative avec la valeur de base ($P < 0.05$).

Les associations des taux de ghréline acylée et totale avec les marqueurs inflammatoires chroniques sont présentées dans le **Tableau 19**. Les concentrations de hsTNF- α sont associées positivement aux valeurs de base de ghréline acylée/totale ($r = 0,37$; $P = 0,009$). Après avoir corrigé l'effet de MTA, les valeurs de hsTNF- α demeurent corrélées à celles de la ghréline acylée/totale de base ($r = 0,39$; $P = 0,006$). À l'opposé, les taux de sTNF-R1 sont inversement proportionnels aux valeurs basales de ghréline acylée ($r = -0,47$; $P < 0,001$; voir **Figure 6**) et de ghréline acylée/totale ($r = -0,39$; $P = 0,005$). Après avoir ajusté les résultats en tenant compte de l'effet de MAT, les taux de sTNF-R1 sont demeurés significativement associées aux valeurs basales de ghréline acylée ($r = -0,38$; $P = 0,008$) mais pas à celles de ghréline acylée/totale ($r = -0,27$; NS).

Suite au maintien de l'hyperinsulinémie, les valeurs d'abaissement maximal des taux de ghréline acylée et totale sont négativement associées au hsCRP ($r = -0,30$; $P = 0,04$) et au sTNF-R1 ($r = -0,34$; $P = 0,02$), respectivement. Suite au contrôle pour l'effet de MTA, les taux de sTNF-R1 demeurent inversement proportionnels à la valeur d'abaissement maximal de ghréline acylée ($r = -0,32$; $P = 0,03$), alors que la perte de signification est observée entre la valeur d'abaissement maximal de ghréline totale et hsCRP ($r = 0,23$; NS). Dans un même ordre d'idée, les valeurs de hsTNF- α sont proportionnelles à celles d'AUC de ghréline acylée/totale avant ($r = 0,35$; $P = 0,01$) et après ($r = 0,36$; $P = 0,01$) l'ajustement pour l'effet de MTA. Toutefois, la corrélation négative entre les concentrations de sTNF-R1 et la valeur d'AUC de ghréline acylée est significative seulement avant la correction qui tient compte de l'effet de MTA ($r = -0,21$; NS).

Tableau 19. Associations entre les taux plasmatiques de ghréline (acylée, totale et rapport ghréline acylée/totale) et hsCRP, hsTNF- α et sTNF-R1 chez les sujets ayant participé à l'Étude 4

		Corrélations de Pearson (r=)		
		hsCRP (n= 49)	hsTNF- α (n= 48)	sTNF-R1 (n= 49)
Ghréline totale	Taux de base	-0,18	-0,07	-0,16
	AUC	-0,11	-0,15	-0,07
	Abaissement maximal	-0,30*	0,05	-0,26
Ghréline acylée	Taux de base	-0,22	0,25	-0,47**
	AUC	-0,15	0,20	-0,33*
	Abaissement maximal	-0,17	0,09	-0,35*
Ghréline acylée/totale	Taux de base	-0,08	0,37**	-0,39**
	AUC	-0,05	0,35*	-0,25

Les valeurs en caractères gras sont significatives: * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$.

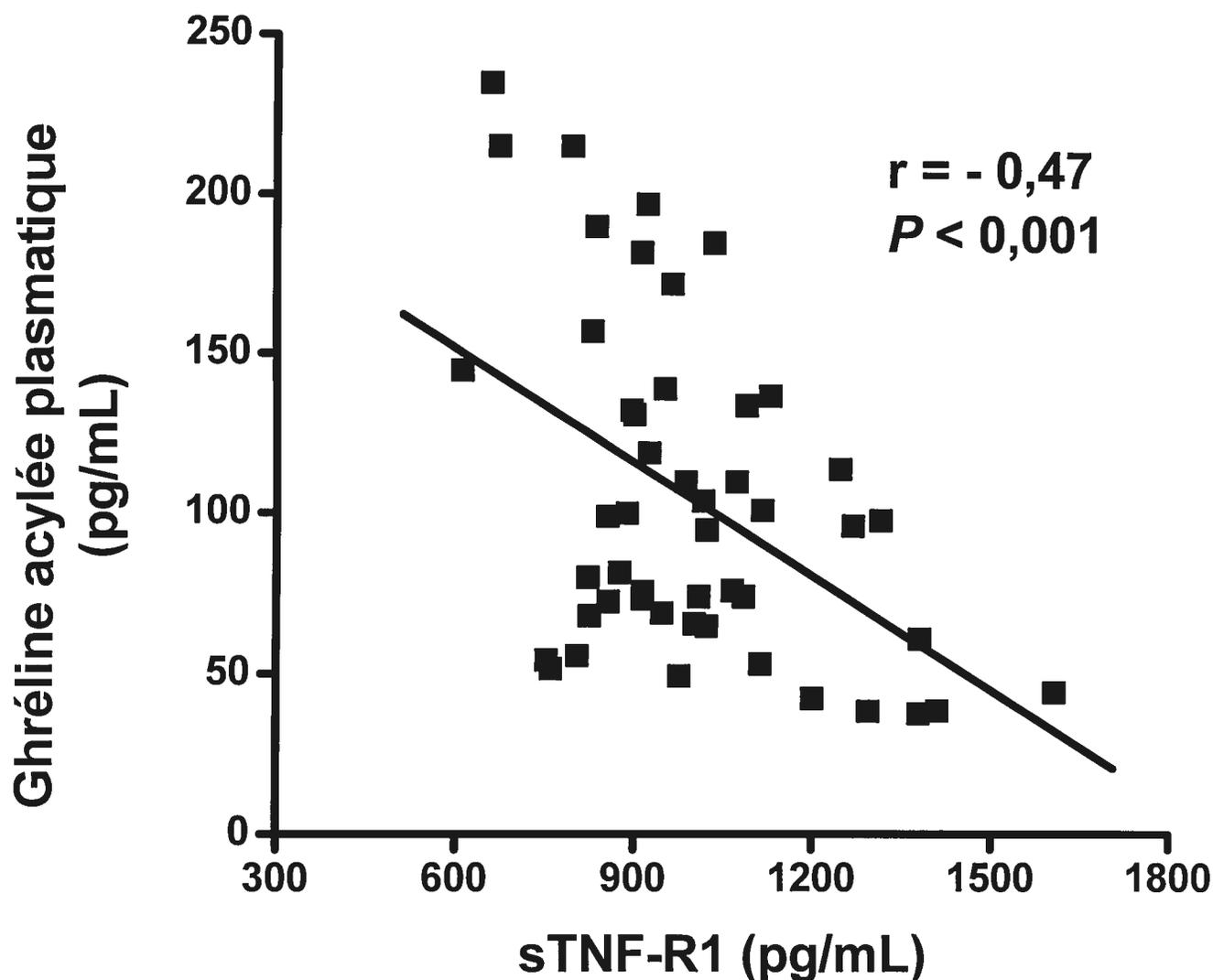


Figure 6. Corrélation entre les taux plasmatiques basaux de ghréline acylée et sTNF-R1. Les carrés noirs représentent chacune des valeurs de ghréline acylée et de sTNF-R1 des femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids. La corrélation est représentée par la pente de la droite. L'analyse de corrélations partielles avec la masse adipeuse totale n'influence pas la signification de l'association des taux de ghréline acylée de base avec sTNF-R1 ($r = -0,38$; $P = 0,008$).

Enfin, tel que présenté dans le **Tableau 20**, l'analyse de régression par étapes montre que les taux de base de ghréline acylée, le LDL et l'insuline à jeun expliquent jusqu'à 48% (22%, 17% et 9%) de la variation des taux de sTNF-R1.

Tableau 20. Modèle d'analyse de régression par étape visant à examiner les prédicteurs indépendants de la variation des taux plasmatiques de sTNF-R1 chez les sujets ayant participé à l'Étude 4

Variable dépendante	Étape	Variables indépendantes	Direction	r ² partiel	r ² Cumulatif	Valeur P
sTNF-R1 ^a	1	Ghréline acylée de base	-	0,22	0,22	< 0,001
	2	LDL	-	0,17	0,39	< 0,001
	3	Insuline à jeun	+	0,09	0,48	0,005

^a Variables indépendantes utilisées dans ce modèle: ghréline acylée de base, LDL de base, insuline à jeun et MAT.

6 DISCUSSION

ÉTUDE DES COMPOSANTES DE LA BALANCE ÉNERGÉTIQUE

Les Études 1 et 2 visaient premièrement à examiner les relations pouvant exister entre le niveau de ghréline totale, déterminé chez des femmes, et les différentes composantes du métabolisme énergétique. Le second objectif de ces études était de fournir des informations quantitatives permettant d'expliquer la variation des taux de ghréline totale, d'adiponectine et de leptine chez des jeunes femmes non-obèses de 18 à 35 ans, en fonction des composantes de leur métabolisme énergétique, de leur forme physique et de leurs habitudes de vie.

6.1 ASSOCIATIONS DES TAUX DE GHRÉLINE ET DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE (ÉTUDE 1)

Durant la phase d'expérimentation du présent projet, deux différents groupes de recherche ont rapporté une relation inverse entre les taux de ghréline acylée et totale et le métabolisme de base (MB) chez des sujets humains normaux, obèses (397) et hyperthyroïdiens (398). Ces données venaient confirmer les résultats obtenus par Tschöp (249) chez les rongeurs et permettaient de supposer que les effets biologiques de la ghréline puissent s'étendre à la régulation de la satiété et à l'oxydation des substrats, en plus d'être utilisés, éventuellement, comme biomarqueurs de l'efficacité énergétique (abaissement de la dépense énergétique). Nos résultats viennent confirmer ces observations. L'évaluation de l'association de la ghréline totale avec MB, l'oxydation des substrats, les mesures de l'activité physique et les habitudes alimentaires dans une large cohorte bien caractérisée de jeunes femmes non-obèses et en santé nous permettent d'apporter des éléments nouveaux à l'état actuel des connaissances.

Le modèle expérimental que nous avons utilisé a permis de minimiser l'interférence de facteurs confondants, tel les conditions de surpoids ou d'obésité, en ciblant une population homogène, non-obèse, de même sexe et d'étendue d'âge restreint. Ainsi, nous avons pu observer une relation inverse entre la ghréline totale et le MB ($r = -0,35$; $P = 0,004$), alors que la valeur de dépense énergétique était exprimée en valeur absolue (non-ajustée pour la composition corporelle). Les relations de la ghréline totale et du MB avec la composition corporelle (298, 300, 399-403), les taux d'insuline (404) et les apports énergétiques quotidiens (256) avaient déjà été rapportées. Toutefois, des analyses de corrélations partielles nous ont permis de vérifier si la relation entre la ghréline totale et le MB est indépendante des effets de fluctuation de la composition corporelle, des taux d'insuline et des apports caloriques quotidiens. Le coefficient de corrélation partielle entre la ghréline totale et le MB est légèrement abaissé, tout en demeurant significatif, suite au contrôle de l'effet de la masse adipeuse et de la masse non-adipeuse ($r = -0,28$; $P = 0,02$), de l'insuline ($r = -0,26$; $P < 0,05$) et de l'apport calorique quotidien ($r = -0,34$; $P = 0,006$). Tout compte fait, les résultats que nous rapportons ici tendent à démontrer que la relation entre la

ghréline totale et le MB est indépendante des variations de composition corporelle, des taux d'insuline et des apports caloriques quotidiens.

Tel que d'autres auteurs l'avaient suggéré auparavant, nous avons examiné tout d'abord la possibilité que la ghréline acylée ou totale puisse être inversement associée au quotient respiratoire (QR) à jeun (249, 271). La relation entre la ghréline totale et le QR n'étant pas significative ($r = -0,002$; NS), nos données ne supportent pas les conclusions de Tschöp et coll. (249) et Wortley et coll. (271). Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces divergences. Premièrement, les effets de la ghréline acylée ou totale sur le QR pourraient être spécifiques à l'espèce (249, 271, 395) et donc, indécélables chez l'humain. Deuxièmement, l'administration chronique de ghréline acylée chez les rats ou la délétion du gène de la ghréline chez la souris pourraient donner lieu à des modifications du rapport ghréline acylée/non-acylée, et ainsi induire des effets physiologiques différents de ceux qu'induisent normalement les concentrations circulantes endogènes. Finalement, les effets centraux résultant de l'administration de ghréline totale ou de la délétion du gène de la ghréline pourraient être différents des effets périphériques et centraux combinés, qui sont observés lors de la sécrétion de ghréline endogène dans l'estomac.

Nos résultats ne permettant pas, toutefois, d'établir de relation entre la ghréline totale et les variables de la composition corporelle, ils divergent des conclusions tirées par Marzullo et coll. (397). Plus spécifiquement, contrairement à ces auteurs, nous n'avons pu établir, avec le groupe de sujets utilisé ici, aucune relation significative entre les taux de ghréline totale et le pourcentage d'adiposité ou l'indice de masse corporelle (IMC). Cette absence de corrélation dans le cas de notre étude pourrait résulter de l'homogénéité de l'échantillon de population (jeunes femmes non-obèses) que nous avons utilisé, alors que la cohorte utilisée par Marzullo et coll. était plus disparate, comprenant tout aussi bien des hommes que des femmes, de poids normal ou obèses.

Puisque la ghréline est déjà identifiée comme étant un facteur orexigénique chez les rongeurs (249) et chez l'humain (256), nous avons voulu vérifier si les taux de ghréline totale étaient reliés aux apports énergétiques quotidiens et aux comportements alimentaires. Nous avons observé une corrélation négative entre les apports énergétiques quotidiens et les

taux de ghréline totale ($r = -0,27$; $P < 0,03$). De puissants effets orexigéniques avaient déjà été associés à l'administration de ghréline acylée par différents auteurs (249, 256); cependant, il est étonnant de constater ici que les taux de ghréline totale sont reliés inversement à l'apport énergétique. Il est toutefois important de se rappeler que, aux fins de l'Étude 1, nous avons évalué les taux de ghréline totale ou la combinaison des taux de ghréline acylée et non-acylée, alors que Tschöp et coll. ont administré seulement la ghréline acylée (249). À l'opposé de l'effet de l'administration de ghréline acylée, nous avons pu observer récemment que, chez le rongeur, l'injection centrale de ghréline non-acylée ne semble pas stimuler l'activité neuronale du noyau arqué de l'hypothalamus, un centre important du contrôle de l'appétit (257). Donc, en nous basant sur les résultats de l'Étude 1 ainsi que ceux d'autres auteurs, nous proposons que la ghréline pourrait influencer l'homéostasie énergétique de façon aiguë (effets orexigéniques), mais aussi chronique (régulation du MB). Toutefois, nous n'avons pu détecter aucune influence aiguë ou chronique des taux de ghréline totale sur les comportements alimentaires dans notre cohorte de jeunes femmes non-obèses et en santé.

Il faut se rappeler que l'Étude 1 comporte certaines limitations. D'abord, de par sa nature corrélative, une relation de cause à effet ne peut être assumée entre les taux de ghréline totale et ceux du MB. De plus, nous tenons à préciser que les résultats que nous tirons de l'Étude 1 sont limités à une population de jeunes femmes non-obèses et en santé : alors, leur extrapolation à d'autres segments de la population n'est pas nécessairement valable et exigerait des études supplémentaires. De plus, il devrait être considéré que la sous-évaluation des apports caloriques qui résulte de l'utilisation de rappels de 24 h est un fait documenté chez des jeunes femmes non-obèses (405). En raison de l'étroite relation qui existe entre la prise alimentaire, la ghréline acylée et la nature épisodique de sa sécrétion, l'Étude 1 ne permet donc pas de déterminer si la relation entre la ghréline acylée et la dépense énergétique persiste au cours de l'état postprandial. De plus, avec le protocole utilisé pour l'Étude 1, nous avons uniquement mesuré les taux de ghréline totale (acylée + non-acylée) dans la circulation, alors que la détermination des profils individuels de ghréline acylée, non-acylée ou totale aurait pu permettre d'obtenir un portrait plus précis des effets physiologiques de la ghréline chez cette cohorte.

6.2 HABITUDES DE VIE ET COMPOSANTES DE LA BALANCE ÉNERGÉTIQUE EN TANT QUE PRÉDICTEURS DE LA VARIATION DES TAUX DE GHRÉLINE, D'ADIPONECTINE ET DE LEPTINE (ÉTUDE 2)

Un grand nombre d'études ont tenté d'établir un lien entre les effets des hormones dérivées du tractus gastro-intestinal (GI) et des tissus adipeux et la régulation du profil métabolique. Ainsi, un portrait d'ensemble a été défini pour les hormones ghréline, adiponectine et leptine, tel que l'indiquent plusieurs revues récentes (104, 406, 407). Tout comme la diminution des concentrations circulantes de ghréline totale, la modulation à la baisse des taux d'adiponectine, combinée à une élévation des taux de leptine, est associée de plus en plus à l'apparition et au développement de dysfonctions métaboliques. Plusieurs auteurs ont donc examiné les associations de ces hormones avec les facteurs métaboliques (104). Toutefois, ils ont recueilli peu d'indices qui puissent permettre de mieux définir les facteurs qui influencent la modulation des taux de ghréline totale, d'adiponectine et de leptine chez des sujets normaux ou souffrant de troubles reliés à l'obésité. L'Étude 2 visait donc à évaluer l'influence des composantes de la dépense énergétique, des habitudes de vie et des mesures de l'activité physique sur la variation des taux de ghréline totale, d'adiponectine et de leptine. Notre objectif ultime était donc, une fois ces liens établis, de proposer l'adoption de certaines habitudes de vie qui permettraient d'établir et de maintenir un profil métabolique favorable chez les individus.

Les résultats que nous avons obtenus pour l'Étude 2 étaient comparables à ceux de l'Étude 1 en ce qui regarde les relations qui existent entre les taux de ghréline totale et les composantes de la balance énergétique. La ghréline totale semble donc être associée de façon négative aux apports alimentaires quotidiens et également au MB (de façon indépendante à la masse corporelle) chez des femmes non-obèses (395). Il pourrait en résulter que, chez des sujets obèses, les taux réduits de ghréline totale ne seraient pas seulement influencés par une balance énergétique positive, mais également par l'augmentation du MB.

Nous rapportons ici que les taux de HDL (11%) et le MB (7%) sont des facteurs indépendants permettant d'expliquer jusqu'à 18% de la variation des taux de ghréline totale. D'après nos résultats, nous croyons qu'il serait possible à chaque individu d'exercer un certain contrôle sur ses propres taux circulants de ghréline totale, en modifiant certaines de ses habitudes de vie. Par exemple, l'augmentation des taux de HDL pourrait être favorisée par une intervention nutritionnelle, alors que l'adhésion à un programme d'entraînement incluant des exercices aérobiques et de résistance personnalisés pourrait stimuler chez chacun une augmentation du MB (voir revue (408)).

L'association entre les taux de ghréline totale et de HDL a été rapportée précédemment par le groupe de Purnell et coll. (409). Cependant, aucune information qui pourrait expliquer la relation entre les concentrations de ghréline totale et celles de ces lipoprotéines n'est présentement disponible. La présence d'un acide gras (octanoyl) sur la chaîne latérale de Ser³ de la ghréline pourrait donc lui permettre d'exercer certaines interactions avec des molécules lipophiles, tel le HDL. Une étude indépendante a d'ailleurs rapporté que, dans la circulation, les interactions entre le HDL et la ghréline acylée pourraient donner lieu à la désacylation du peptide (240). Il est proposé que cette désacylation pourrait être associée à l'activité enzymatique estérase de la paraoxonase (239). Ainsi, la perte du groupe octanoyl de la ghréline acylée pourrait favoriser l'accumulation de ghréline non-acylée au détriment de la forme acylée. Comme il s'agit là encore d'hypothèses et que le phénomène est important du point de vue physiologique, cela justifie que les interactions entre la ghréline acylée et non-acylée et le HDL fassent l'objet d'études plus poussées dans l'avenir.

Jusqu'à maintenant, une seule étude a évalué l'impact de l'exercice aérobique (intervention de 12 mois) sur la perte de poids et les fluctuations des taux de ghréline totale chez des femmes post-ménopausées en surpoids et sédentaires (308). Il a ainsi été observé par Foster-Schubert et coll. que les taux de ghréline totale évalués n'avaient subi aucune fluctuation indépendante de l'effet de perte de poids au cours de cette intervention. Ces auteurs n'ont cependant pas rapporté l'effet de l'intervention sur les mesures de composition corporelle ou de MB. D'autre part, l'hypothèse que nous avons énoncée précédemment est renforcée par les observations de Cummings et coll. (288) et Hansen et

coll. (300), qui rapportent que la perte de poids entraîne une diminution des valeurs de MB et une augmentation des concentrations sanguines de ghréline totale. Toutefois, il est important de distinguer l'effet de la perte de poids par restriction calorique de celle induite par chirurgie bariatrique. Cette dernière intervention semble favoriser une suppression des taux de ghréline totale (288, 313), possiblement consécutive à la réduction de la taille de l'estomac, qui est le site principal de sécrétion de ghréline totale (153). La relation entre MB et les taux de ghréline totale n'est cependant pas indépendante des changements de masse corporelle dans ces études.

Enfin, nous avons observé que la dépense énergétique associée à l'activité physique (DÉAP) n'est pas reliée de façon significative aux valeurs de ghréline totale ou de MB. Afin de ne pas influencer le MB, nous avons calculé le DÉAP en fonction de l'activité physique quotidienne totale, et non au moyen d'un programme d'entraînement. Des études supplémentaires pourraient donc évaluer si les taux de ghréline sont modulés lors de fluctuations du MB, et ce plus particulièrement chez des individus avec une masse et une composition corporelle constantes.

Bien que l'adiponectine et la leptine soient deux hormones dérivées des tissus adipeux, nos résultats semblent indiquer ici que les taux de ces hormones sont soumis à des mécanismes de régulation différents. Ici, le contrôle statistique de l'effet de la masse adipeuse totale ne semble pas affecter les relations entre l'adiponectine et les composantes de la balance énergétique (apport calorique quotidien et DÉAP). À notre connaissance, nous sommes ainsi les premiers à rapporter que 36% de la variation des taux d'adiponectine peut être justifiée par les apports énergétiques et l'activité physique (indépendamment de la masse adipeuse totale ou centrale). Cette observation inédite nous permet de proposer que, chez tout individu, les concentrations d'adiponectine pourraient être augmentées volontairement en diminuant les apports énergétiques et/ou en augmentant le niveau d'activité physique quotidien. Des concentrations élevées d'adiponectine sont associées à l'augmentation du degré de sensibilité à l'insuline (410, 411) ainsi qu'à l'amélioration du profil lipidique (412) et à la stabilisation des taux de marqueurs inflammatoires (115, 413). De plus, des études prospectives qui avaient été menées chez des adultes (414, 415) et des enfants (416) avaient indiqué que les concentrations sanguines d'adiponectine sont réduites chez des

sujets prédisposés à développer le diabète. Toutes ces observations apportent un argument supplémentaire en faveur de la mise en place de mesures permettant de contrôler les apports énergétiques et d'augmenter l'activité physique afin de favoriser les effets anti-athérogènes et anti-diabétogènes de taux élevés d'adiponectine, particulièrement chez les enfants et les jeunes adultes.

Les concentrations de leptine sont corrélées avec le MB, la forme physique ($VO_2 \text{ max}$) et la désinhibition alimentaire. Toutefois, la relation entre la leptine et les autres composantes de la balance énergétique s'annule, une fois pris en considération l'effet de la masse adipeuse totale ou centrale. L'Étude 2 révèle que la masse adipeuse totale est le seul facteur indépendant permettant d'expliquer 53% de la variation des taux de leptine. Ceci suggère que la perte de masse adipeuse pourrait être le seul facteur physiologique capable d'influencer les taux de leptine de façon indépendante. Dans des conditions normales, la leptine agit au niveau de l'hypothalamus pour signaler l'augmentation de la masse adipeuse, limiter l'apport énergétique, augmenter le MB et, ultimement, permettre de diminuer la masse corporelle. Conséquemment, les effets de la leptine pourraient favoriser l'utilisation du glucose et la sensibilité à l'insuline (417-421). Cependant, chez les sujets obèses, l'hyperleptinémie est associée à l'hyperphagie, la résistance à l'insuline, l'hyperlipidémie et l'hypertension (418). À l'image de la résistance à l'insuline, l'hyperleptinémie pourrait être associée à une réduction de l'activité biologique du peptide, engendrant par le fait même la résistance à la leptine (422). La résistance à la leptine pourrait être engendrée par une signalisation déficiente lors de la liaison de l'adipokine à son récepteur, une dégradation protéolytique accrue du peptide, ou aux interactions moléculaires accompagnant l'expression de récepteurs solubles spécifiques. Bien qu'aucun sujet ayant participé à l'Étude 2 ne soit obèse, on observe que les taux élevés de leptine sont associés à la résistance à l'insuline, combinée à une capacité physique/aérobique réduite. Les résultats obtenus ici suggèrent donc que, même chez des sujets non-obèses, l'augmentation de la masse adipeuse qui précède généralement l'obésité chez un individu pourrait engendrer une diminution progressive de sa sensibilité à la leptine.

Une certaine prudence doit cependant être exercée dans l'analyse des présents résultats. Le design transversal, ainsi que la nature corrélative de l'Étude 2 ne permettent pas de définir

la nature des mécanismes physiologiques impliqués, ni d'expliquer les relations de cause à effet entre les hormones et les composantes de la dépense énergétique. Comme précédemment, on doit aussi considérer que la sous-évaluation des apports énergétiques qui résulte des rappels de 24 h est un fait documenté chez des jeunes femmes non-obèses (405). En raison de la relation étroite entre la prise alimentaire et le caractère pulsatile de la sécrétion de ghréline totale, il faut concéder que l'Étude 2 ne permet pas de déterminer non plus si la relation avec la dépense énergétique persiste dans des conditions post-prandiales. Des proportions différentes de ghréline acylée et non-acylée sont observées dans la circulation. L'Étude 2 évalue les taux combinés de ghréline acylée et non-acylée, sans pouvoir discerner entre une forme ou l'autre de ghréline, puisque la trousse RIA utilisée ne pouvait faire la distinction entre la ghréline acylée et non-acylée. Également, la présence ou l'absence de multimères d'adiponectine ou le nombre d'unités comprises dans ces multimères n'a pas été considérée dans cette étude. Dans le futur, des études complémentaires devraient permettre de mieux définir les mécanismes d'expression et les rôles physiologiques respectifs de la ghréline et de l'adiponectine dans des groupes de sujets obèses insulino-sensibles et insulino-résistants et, éventuellement, dans d'autres groupes d'étude, en vue d'arriver à une compréhension plus globale des interactions entre ces hormones et les composantes de la balance énergétique.

Suite à l'Étude 2, nous proposons qu'un MB peu élevé pourrait permettre d'expliquer un profil de ghréline totale abaissé, alors que des apports caloriques élevés et la sédentarité justifieraient la prédiction de taux réduits d'adiponectine, du moins pour la catégorie de sujets étudiés. À longue échéance, ce profil hormonal défavorable amènerait une augmentation de l'appétit et des apports caloriques, favorisant ainsi le développement prématuré de dysfonctions métaboliques, et même le diabète de type 2. Des études plus exhaustives devraient donc examiner si les taux de ghréline et d'adiponectine peuvent être influencés volontairement en modifiant certaines habitudes de vie et, par le fait même, favoriser l'amélioration du profil métabolique, indépendamment des fluctuations de masse corporelle. Afin d'établir un modèle plus complet des interactions entre les différentes hormones ayant un impact sur le métabolisme énergétique, il serait pertinent de tenir également compte, lors d'études futures (dans un contexte semblable à celui de l'Étude 2),

de la variation de l'expression et des taux circulants du peptide apeline (107, 108), une adipokine retrouvée en quantité plus importante chez les obèses hyperinsulinémiques (109).

6.3 ÉTUDE DES PROFILS PLASMATIQUES DE GHRÉLINE ACYLÉE ET NON-ACYLÉE CHEZ DES FEMMES POST-MÉNOPAUSÉES INSULINO-SENSIBLES OU INSULINO-RÉSISTANTES, OBÈSES OU EN SURPLUS DE POIDS (ÉTUDE 3)

Les Études 3 et 4 visaient à établir le profil de ghréline acylée, non-acylée et totale pendant le clamp euglycémique/hyperinsulinémique (CEH). Bien que les taux d'insuline y soient supraphysiologiques, ce modèle représente tout de même une simulation réaliste de l'hyperinsulinémie post-prandiale. Plus spécifiquement, le CEH permet d'évaluer les fluctuations des taux aigus de ghréline acylée, non-acylée et totale pendant qu'un état d'hyperinsulinémie est artificiellement maintenu. Au moyen du CEH, nous avons donc pu examiner et comparer lors de ces deux études les effets aigus et chroniques d'une hyperinsulinémie simulée sur les profils de ghréline acylée, non-acylée et totale, chez des sujets insulino-sensibles ou insulino-résistants, obèses ou avec surplus de poids (désignés par les acronymes ISOS ou IROS, respectivement). Aussi, le CEH nous a permis d'étudier l'association des profils individuels de ghréline acylée, non-acylée et totale avec les taux de marqueurs de l'inflammation chronique, chez les sujets avec surpoids ou obèses utilisés lors de ces études.

L'Étude 3 a permis d'évaluer l'effet d'un état prolongé d'hyperinsulinémie simulée sur les profils de ghréline acylée, non-acylée et totale chez des individus insulino-sensibles et insulino-résistants, obèses ou avec surpoids (ISOS ou IROS). Constatation étonnante, nous avons pu noter que la valeur du rapport ghréline acylée/non-acylée obtenue en conditions basales chez les sujets de l'Étude 3 est significativement plus élevée chez les IROS que chez les ISOS ($P < 0,05$). À notre connaissance, il s'agit là d'une observation originale qui vient justifier de façon convaincante la pertinence physiologique de mesurer les taux de

ghréline acylée et le rapport ghréline acylée/non-acylée, du moins chez le groupe de sujets utilisés ici. De nombreuses études effectuées dans différents laboratoires avaient déjà proposé l'existence d'une relation étroite entre les taux de ghréline totale et la résistance à l'insuline (326, 423); toutefois, il semble que les auteurs de ces études n'aient pas considéré l'intérêt d'évaluer la pertinence physiologique de la régulation des taux de ghréline acylée vs. non-acylée. L'existence de rapports ghréline acylée/non-acylée différents chez les insulino-sensibles et les insulino-résistants ne pouvait être révélée qu'en état d'hyperinsulinémie. Pour ce faire, les taux de ghréline acylée et non-acylée pouvaient être déterminés en condition post-prandiale ou lors de l'administration prolongée d'insuline. La technique du CEH a été retenue puisqu'elle permet de maintenir des conditions hyperinsulinémiques standardisées pendant une période de temps répondant aux exigences de l'expérience chez les femmes participant à l'Étude 3.

Nous avons constaté aussi que les taux de ghréline totale à jeun tendent à être plus élevés chez les individus ISOS ($P = 0,08$) que chez les IROS. Cette observation est appuyée par les résultats d'études précédentes qui montraient que les taux de ghréline totale à jeun sont abaissés chez les obèses insulino-résistants par rapport à des sujets insulino-sensibles (327, 424). Ce phénomène pourrait s'expliquer d'au moins deux façons. D'abord, par une activité protéolytique envers la ghréline qui serait augmentée chez les IROS, comparativement aux ISOS. Or, les travaux de Tolle et coll. indiquent que la demi-vie de la ghréline en circulation, du moins chez le rat, est relativement longue (30 min), comparativement à d'autres peptides (425). D'autre part, l'expression de la ghréline totale pourrait être influencée négativement par les taux élevés d'insuline observés chez les ISOS, plutôt que par l'augmentation de sa dégradation par les protéases.

Aussi bien chez les sujets ISOS et IROS utilisés lors de l'Étude 3, les taux de ghréline non-acylée et totale observés ont conservé une valeur réduite tout au long du CEH ($P < 0,05$). Cependant, les taux de ghréline acylée, pour leur part, n'étaient significativement abaissés que chez les sujets ISOS. D'autre part, l'administration prolongée d'insuline favorise une légère hausse ($P > 0,05$) des taux de ghréline acylée chez les individus IROS. Par le fait même, ces résultats nous incitent à proposer que l'insuline puisse agir comme un modulateur physiologique de la suppression des taux de ghréline chez l'individu insulino-

sensible (426). À la lumière de cette observation originale que les taux de ghréline sont réduits de façon plus importante chez les individus ISOS pendant le CEH, nous pouvons avancer que l'hyperinsulinémie pourrait provoquer une réduction accrue/prolongée des taux de ghréline acylée et totale chez les individus obèses, mais normaux, représentés ici par les sujets ISOS. Il est intéressant de noter également que ces valeurs de réduction maximale de ghréline acylée et totale sont positivement corrélées à l'indice de sensibilité à l'insuline du CEH. Nos résultats sont appuyés par l'observation d'auteurs précédents qu'une moins grande capacité de réduction des taux de ghréline totale est observée, pendant un état hyperinsulinémique, chez des sujets insulino-résistants ou diabétiques de type 2 que chez des individus normaux (319, 321, 327, 398, 427, 428).

Le CEH permettrait donc d'examiner les divergences de régulation des taux de ghréline chez différents groupes d'individus. L'exemple des femmes post-ménopausées ISOS et IROS décrit précédemment est éloquent. Chez les sujets ayant participé à notre étude, la réduction maximale des taux de ghréline acylée et totale est observée entre les temps 60 et 180 min du CEH. Nos analyses statistiques ne nous ont pas permis cependant de déterminer un temps unique qui correspondrait à la valeur d'inhibition maximale chez l'ensemble de nos sujets. Par conséquent, nous avons défini la valeur de réduction maximale à partir des concentrations de base de ghréline qui sont les plus réduites par le CEH. Une valeur de réduction maximale a donc été attribuée à chaque sujet de l'étude. Nous pouvons ainsi émettre une seconde proposition, à l'effet que les sujets ISOS présentent une capacité de réduction maximale supérieure à celle des IROS pendant le CEH. En se basant sur les résultats de l'Étude 3, l'analyse d'un seul échantillon sanguin prélevé chez les sujets à jeun ne permettrait pas de définir exhaustivement les effets physiologiques de la ghréline. Avec le CEH qui permet de détecter des fluctuations des taux de ghréline chez des sujets en état d'hyperinsulinémie pendant une période déterminée, l'utilisation des valeurs de base (0 min), terminales (180 min), d'abaissement maximal et d'AUC dans les calculs semble nécessaire pour permettre d'évaluer de façon réaliste les modulations des taux de ghréline pendant cette même période. L'Étude 3, ainsi que des travaux publiés ultérieurement par d'autres auteurs (200, 327, 329, 332) indiquent que, non seulement les taux de ghréline totale, mais aussi ceux de ghréline acylée puissent exercer des effets significatifs, sinon déterminants, sur la régulation de l'homéostasie métabolique. Ces résultats révèlent

l'importance de calculer un rapport dérivé des taux de ghréline acylée/totale pour quantifier le niveau de résistance à l'insuline lors de l'étude suivante, l'Étude 4, soit chez des femmes obèses post-ménopausées.

Comparativement aux sujets IROS, nous observons que les individus ISOS présentent des valeurs inférieures d'AUC du rapport ghréline acylée/non-acylée et de ghréline acylée ($P < 0,05$). Ces derniers résultats suggèrent que le rapport ghréline acylée/non-acylée est soumis à une régulation différente chez les individus ISOS et IROS pendant le CEH. Conséquemment, nous formulons ici l'hypothèse que l'élévation soutenue des profils de sécrétion de ghréline acylée pourrait être associée au développement de la résistance à l'insuline chez les obèses. Nos données s'appuient sur la théorie voulant que des taux élevés de ghréline acylée puissent engendrer des effets diabétogéniques chez les sujets obèses ou avec surpoids. Cette théorie a été émise suite à l'observation d'une détérioration de la sensibilité à l'insuline lors d'administrations de ghréline acylée, alors que des effets insulino-sensibilisants sont associés à l'injection conjointe de ghréline acylée et non-acylée (200, 332). Somme toute, tel que suggéré antérieurement par McLaughlin et coll. (424) pour les valeurs basales de ghréline totale, nous rapportons que les profils de ghréline sont significativement différents chez les ISOS et les IROS pendant le CEH. Dans l'état actuel des connaissances, nous sommes les premiers à rapporter l'observation d'un profil «favorable» de ghréline acylée et totale pendant l'état hyperinsulinémique chez les individus ISOS.

Nos résultats suggèrent que l'évaluation d'un seul échantillon de ghréline totale à jeun ne fournit pas toute l'information permettant de définir la physiologie de la régulation de la ghréline. Conséquemment, nous proposons que les études ultérieures prennent en considération la complexité de la pulsativité de la régulation de ghréline acylée, non-acylée et totale. Un profil complet de ghréline comprenant la cinétique de la modulation hormonale ainsi que les valeurs d'AUC, d'inhibition maximale et de rapport ghréline acylée/non-acylée dans des conditions post-prandiales ou hyperinsulinémiques devrait permettre de tenir compte de ce phénomène. De plus, il serait important d'élucider les mécanismes enzymatiques responsables de la variation des rapports ghréline acylée/non-acylée.

L'Étude 3 comporte toutefois certaines limitations. Tout d'abord, la cohorte utilisée pour cette étude n'est composée que de femmes post-ménopausées sédentaires, obèses ou avec surpoids. Par conséquent, la validité de nos observations se limite à ce groupe d'individus et pourrait ne pas s'étendre à des modèles masculins ou à des groupes d'âge différents. Aussi, le design transversal de notre étude ne permet pas d'établir si les taux de ghréline sont modulés directement ou non par l'administration d'insuline. De plus, l'hyperinsulinémie peut induire la régulation d'autres facteurs métaboliques agissant comme régulateurs primaires ou secondaires des taux de ghréline. En dépit de ces limitations, notre étude est renforcée par l'utilisation de techniques considérées comme standards de référence pour l'évaluation de différents phénotypes associés aux dysfonctions métaboliques, appliquées à une cohorte relativement importante et caractérisée de façon exhaustive.

6.4 ÉTUDE DE LA RELATION POSSIBLE ENTRE LES TAUX PLASMATIQUES DE GHRÉLINE ACYLÉE ET LES MARQUEURS CHRONIQUES DE L'INFLAMMATION CHEZ DES FEMMES POST-MÉNOPAUSÉES, OBÈSES OU EN SURPOIDS (ÉTUDE 4)

Les troubles reliés à l'obésité sont couramment associés à des taux chroniques élevés de certains marqueurs reconnus de l'inflammation. Plus spécifiquement, la présence de taux élevés de CRP (429) et du système TNF- α (430) a été reliée au développement de résistance à l'insuline chez des sujets obèses. D'autres auteurs proposent que le récepteur soluble du TNF, sTNF-R1, est un meilleur marqueur de l'inflammation chronique que le TNF- α (431).

L'hypothèse voulant que la ghréline puisse exercer des effets anti-inflammatoires en réduisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires a été formulée récemment (217, 347, 432-434). Bien qu'un nombre croissant de données expérimentales supportent une telle hypothèse, certains auteurs expriment l'opinion contraire (435, 436). Ainsi, la ghréline totale est corrélée négativement au CRP et au TNF- α chez des patients souffrant de maladie pulmonaire obstructive chronique (351), mais positivement au TNF- α chez des sujets atteints d'insuffisance cardiaque (303). Toutefois, nous n'avons pas relevé dans la littérature de travaux visant à établir et évaluer les relations possibles pouvant exister entre les taux de ghréline et ceux de marqueurs de l'inflammation chronique chez des sujets souffrant d'obésité ou de surpoids.

De plus en plus de rapports soulignent l'existence de relations étroites entre le dérèglement du niveau des hormones dérivées du tractus gastro-intestinal (GI) et l'élévation des marqueurs de l'inflammation chronique lors du développement de pathologies reliées à l'obésité. Dans l'état des connaissances actuelles, notre étude est la première à tenter d'établir une corrélation entre les profils de ghréline correspondant à des conditions hyperinsulinémiques provoquées par le CEH et les taux de base de hsCRP, hsTNF- α et sTNF-R1, dans une population d'individus obèses ou avec surpoids.

La cohorte de femmes post-ménopausées utilisée dans l'Étude 4 présentait un large spectre de profils d'âge, de composition corporelle, de bilan lipidique et de sensibilité à l'insuline. L'intérêt de ce modèle inclut donc sa diversité importante de profils métaboliques, ainsi que sa susceptibilité accrue à développer des dysfonctions associées à l'obésité.

Plusieurs auteurs ont rapporté que les taux de hsCRP, hsTNF- α et de sTNF-R1 ne fluctuent pas de façon importante pendant l'hyperinsulinémie post-prandiale (437-442). Ces différents rapports justifient donc encore plus la validité de notre modèle et soulignent l'intérêt de vérifier si des profils complets des taux de ghréline acylée et totale pendant le CEH sont associés aux taux de base des facteurs inflammatoires.

À notre connaissance, nous sommes les premiers à rapporter l'existence d'une relation entre les taux de ghréline et ceux de hsCRP chez des sujets obèses ou en surpoids. Bien que la relation entre la réduction maximale de ghréline totale et de hsCRP ne soit pas indépendante de l'effet de l'adiposité totale, nos résultats reproduisent les observations précédentes de Luo et coll. chez des patients atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique (351). Plusieurs études ont d'ailleurs rapporté le lien qui existe entre les taux élevés de CRP et le développement de troubles métaboliques (443-448). De même façon, d'autres auteurs ont observé chez des sujets atteints de certaines dysfonctions métaboliques, telles la résistance à l'insuline et le diabète de type 2, qu'en état d'hyperinsulinémie aiguë, la réduction des taux de ghréline est moins importante que chez des individus normaux (298, 427). Nos résultats suggèrent donc que des taux élevés de hsCRP et une moins grande capacité de réduction des taux de ghréline totale pourraient servir d'indicateurs au développement de dysfonctions métaboliques telles la résistance à l'insuline et le diabète de type 2, du moins chez des femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids.

Le système TNF- α (incluant hsTNF- α et ses récepteurs solubles: sTNF-R1 et sTNF-R2) est reconnu comme un marqueur inflammatoire du développement de troubles métaboliques et cardiovasculaires chez les patients obèses (449-451). Les données de la présente étude indiquent que sTNF-R1 est associé positivement à la masse corporelle, la masse adipeuse totale, l'adiposité viscérale, l'insulinémie à jeun et au HOMA, mais négativement au cholestérol total et au LDL, tel que publié récemment par Faraj et coll. (452). De plus, suite

à un traitement visant à réduire la masse corporelle, l'amplitude de réduction des taux de sTNF-R1 est un facteur indépendant qui permet de prédire l'amélioration du degré de sensibilité à l'insuline (453, 454). Donc, nos résultats confirment des observations précédentes qui indiquaient que sTNF-R1 serait un meilleur prédicteur de la résistance à l'insuline et des dysfonctions métaboliques que hsTNF- α (431).

Dans l'Étude 4, les taux de hsTNF- α partagent une relation positive, indépendante de l'effet de l'adiposité totale, avec le rapport d'AUC de ghréline acylée/totale ($P < 0,05$). L'existence d'une relation entre la ghréline et TNF- α est présentement débattue. Nos données ne vont pas dans le même sens que celle d'un autre groupe, qui suggère plutôt que les taux de ghréline totale sont inversement reliés aux concentrations de TNF- α chez des patients souffrant de maladie pulmonaire obstructive chronique (351). D'autres auteurs rapportent également que l'administration ou la surexpression de ghréline pourraient conférer des effets anti-inflammatoires et, par conséquent, réduire les taux de TNF- α *in vitro* et *in vivo* (217, 347, 432-434). Toutefois, nos résultats sont soutenus par les observations d'autres auteurs qui avaient proposé que les taux de ghréline totale sont positivement corrélés au hsTNF- α chez des patients souffrant de la maladie du côlon irritable, de septicémie post-opératoire ou d'insuffisance cardiaque (303, 435, 436). Toutefois, nos résultats présents indiquent que les valeurs de ghréline acylée/totale sont corrélées avec le système TNF- α chez des individus obèses ou en surpoids.

Contrairement à nos résultats pour hsTNF- α , les concentrations de sTNF-R1 sont négativement associées aux valeurs basales de ghréline acylée et de réduction maximale de ghréline acylée. De plus, nous observons que les taux de base de ghréline acylée sont des facteurs indépendants permettant d'expliquer 22% de la variation des concentrations plasmatiques de sTNF-R1 dans la population de femmes post-ménopausées que nous avons étudiée. En ce sens, Pennica et coll. avaient postulé auparavant que le sTNF-R1 pourrait inhiber l'activité immunitaire soutenue par l'activation du TNF- α (455). La relation directe avec le hsTNF- α et inverse avec le sTNF- α que nous obtenons ici suggère pour la ghréline acylée un rôle de médiateur bi-directionnel sur l'activation du système TNF- α . Nous proposons donc que des taux/proportions élevées de ghréline acylée puissent être associés à

une activité accrue du système TNF- α , et donc au développement de pathologies reliées à l'obésité, du moins chez des femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids.

L'Étude 4 comporte toutefois certaines limitations. Tout d'abord, la cohorte de sujets utilisés ne comprenait que des femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids. Nos observations ne sont donc valables que pour un tel groupe d'individus et ne peuvent donc être automatiquement extrapolées pour inclure, par exemple, des sujets mâles ou d'âge différent. De plus, la nature transversale de l'Étude 4 ne nous permet pas d'établir un lien de cause à effet pour les associations entre les marqueurs inflammatoires et les profils de ghréline dans cette cohorte. Toutefois, cette étude est validée par l'utilisation du CEH, une technique considérée comme standard de référence, dans une cohorte relativement large et exhaustivement caractérisée.

7 CONCLUSIONS

7.1 LA GHRELIN: ÉTUDES CHEZ DES POPULATIONS HUMAINES

Les travaux de recherche qui sont présentés ici visaient, entre autre, à reproduire le plus exactement possible des états critiques du développement de dysfonctions métaboliques telles que l'obésité, la résistance à l'insuline, la dyslipidémie, l'hypertension, la modification des taux hormonaux et l'inflammation chronique. Les installations uniques de l'Unité Métabolique du département de nutrition de l'Université de Montréal permettent un phénotypage exhaustif des sujets impliqués dans nos différentes études.

Notre première étude a été réalisée chez des jeunes femmes adultes (âgées de 18 à 35 ans) et sensibles à l'insuline. Cette tranche de population comprend des individus terminant leur formation académique et entrant sur le marché du travail. En raisons d'importants changements d'habitudes de vie (travail, loisirs plus restreints, fatigue causée par le travail et sédentarité), ce modèle permet d'évaluer les taux de ghréline totale pendant une période particulièrement propice à l'augmentation de la masse corporelle et, subséquentement, au développement de dysfonctions métaboliques chez la plupart des adultes, particulièrement les professionnels.

Pour notre second modèle d'étude, nous avons évalué les taux de ghréline chez des femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids. Suite à la cessation du cycle menstruel, les femmes semblent devenir plus susceptibles à développer des troubles métaboliques. Dans la cohorte utilisée, à la lumière d'études précédentes par Brochu et coll. (62) et Karelis et coll. (429, 456, 457), nous avons pu identifier deux sous-groupes de femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids: les sujets insulino-sensibles obèses ou en surpoids (ISOS) et insulino-résistants obèses ou en surpoids (IROS). On reconnaît généralement qu'environ 30% des individus obèses présentent une sensibilité normale à l'insuline et, conséquemment, de moindres risques de développer le diabète de type 2 (62, 429, 456-459). Ce modèle nous a donc permis d'évaluer les profils de ghréline totale, non-acylée et acylée chez des individus présentant un degré d'adiposité semblable, mais avec des taux différents de sensibilité à l'insuline.

7.2 LA GHRÉLINE: RELATIONS AVEC LE PROFIL MÉTABOLIQUE

Alors que le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires font partie des causes les plus importantes de décès chez les adultes de la population canadienne (460), il devient urgent de mieux comprendre les voies de régulation des fonctions métaboliques chez des sujets normaux, ainsi que chez des individus qui sont en voie de développer ou qui souffrent de complications reliées à l'obésité. De plus en plus d'informations permettent de croire que les hormones dérivées du tractus gastro-intestinal et des tissus adipeux pourraient influencer la régulation de l'homéostasie énergétique (tel que revu par Meier et Gressner (104)). Qui plus est, un nombre important d'études laissent entrevoir que le dérèglement de l'expression de ces facteurs hormonaux (ou de leur récepteurs) pourrait être associé à la détérioration du profil métabolique. Pour les besoins de la présentation de ces travaux de recherche, l'emphase porte principalement sur l'étude des relations entre la ghréline et les composantes du profil métabolique.

L'isolation de la ghréline en 1999 a suscité un intérêt important (153). Les premiers effets biologiques de ce peptide ont été associés à la stimulation de la libération de GH hypophysaire. Toutefois, en raison de son origine principalement gastro-intestinale, plusieurs groupes ont examiné les associations entre la ghréline et des facteurs de régulation de l'homéostasie énergétique. Plus spécifiquement, différentes études ont rapporté que la ghréline provoque de potentiels effets orexigéniques lors d'administrations aiguës. De plus, les taux de ghréline sont négativement associés aux valeurs de facteurs métaboliques tels l'adiposité, la résistance à l'insuline et la dépense énergétique (voir articles de revue (461-463)). Des interactions entre la ghréline et le système immunitaire (tel que revu par Dixit et Taub (464)) permettent également d'entrevoir le rôle important qu'exerce cette hormone dans le maintien de l'équilibre des fonctions vitales. De telles informations laissent présager que le dérèglement des taux de ghréline puisse être associé au développement de pathologies métaboliques. Toutefois, la nature exacte des interactions entre la ghréline et les mécanismes de régulation de ces dysfonctions reste à définir plus précisément.

7.3 LA GHRÉLINE ET LE MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE

Les premières indications suggérant que la ghréline puisse être associée négativement au métabolisme énergétique ont été fournies par le groupe du Tschöp et coll. (249). En effet, dans une étude effectuée chez un modèle de rongeurs, les auteurs ont observé que l'administration de ghréline acylée engendrait une diminution de la dépense énergétique aiguë (à l'intérieur de 3 heures) et une augmentation prolongée du quotient respiratoire (QR) chez les rats. En d'autres termes, la ghréline acylée semblait non seulement influencer à la baisse la dépense énergétique, mais favoriser en plus l'oxydation des substrats énergétiques de nature glucidiques, au détriment de ceux provenant des molécules lipidiques.

Chez une cohorte de jeunes femmes ne souffrant pas de désordres métaboliques particuliers, nous avons observé une corrélation significative inverse entre les taux de ghréline totale et le métabolisme basal (395, 396). Nous sommes les premiers à avoir rapporté que cette association est indépendante des effets de la composition corporelle (de la masse adipeuse et de la masse maigre) et de l'insuline. Ces observations indiquent que la ghréline totale pourrait agir comme marqueur évolutif favorisant l'homéostasie énergétique. En d'autres termes, un bilan énergétique négatif favoriserait l'élévation des taux de ghréline totale et la réduction de la dépense énergétique; toutefois un bilan énergétique positif serait associé à la diminution de ghréline totale en circulation et à l'augmentation du métabolisme. Cette hypothèse est renforcée par l'observation de taux de ghréline totale moins élevés chez des individus obèses que chez des sujets de taille normale (324). En conclusion, nos résultats suggèrent que les fluctuations des taux de ghréline totale pourraient contribuer à maintenir l'équilibre d'homéostasie énergétique et, par le fait même, la masse corporelle, du moins chez les jeunes femmes non-obèses en santé que nous avons étudiées.

7.4 LE MODÈLE DU CLAMP EUGLYCÉMIQUE/HYPERINSULINÉMIQUE

Les taux de ghréline totale sont inhibés à la suite d'une prise alimentaire. Plusieurs études ont tenté, avec peu de succès, de déterminer les facteurs nutritionnels ou hormonaux responsables de l'inhibition des taux post-prandiaux de ghréline (236, 295, 426, 465-473). Toutefois, les fluctuations aiguës et/ou chroniques des taux d'insuline semblent être associées négativement aux concentrations de ghréline totale. En d'autres termes, les taux de ghréline pourraient être modulés négativement, à la fois par l'augmentation des taux post-prandiaux d'insuline et par la résistance à l'insuline. Le CEH permet d'augmenter, chez les sujets de l'étude, les taux circulants d'insuline pendant une période de 180 min. Bien qu'il n'y ait aucun apport nutritionnel impliqué et que l'hyperinsulinémie soit maintenue plus longtemps que lors d'une prise alimentaire, le CEH permet d'obtenir un profil complet des taux de ghréline. Ce profil comprend tout d'abord des taux à jeun, ainsi qu'une cinétique, une valeur d'AUC et une valeur d'inhibition maximale des taux de ghréline pendant l'hyperinsulinémie. Nos résultats indiquent clairement que la simple mesure d'une valeur de ghréline à jeun, telle qu'utilisée dans plusieurs études cliniques précédentes par différents auteurs, ne peut vraiment être représentative de la physiologie de l'hormone. Conséquemment, nous recommandons que les études futures devraient se baser, à notre exemple, sur les relations entre les facteurs métaboliques et des profils complets de ghréline obtenus pendant le CEH ou en conditions post-prandiales, pour donner lieu à des résultats plus informatifs.

7.5 GHRÉLINE ACYLÉE vs. GHRÉLINE NON-ACYLÉE

Deux formes de ghréline ont été initialement isolées de l'estomac de rat par l'équipe de Kojima (153): acylée et non-acylée. La ghréline est acylée de façon post-traductionnelle par l'estérification du groupe hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine en position 3 par l'acide octanoïque. L'administration de doses pharmacologiques de ghréline acylée, par opposition à la ghréline non-acylée, est capable de stimuler la libération de GH et de promouvoir la prise alimentaire de façon aiguë. Cependant, on connaît encore très peu l'impact de la régulation du rapport ghréline acylée/non-acylée sur les fonctions métaboliques. Les résultats de travaux précédents suggèrent que le dérèglement du rapport ghréline acylée/non-acylée puisse engendrer, entre autre, des désordres métaboliques telle la résistance à l'insuline (200, 332). Les résultats des Études 3 et 4 vont dans ce sens et soulignent l'importance de considérer la ghréline acylée et la ghréline non-acylée comme deux hormones gastro-intestinales avec des effets et des rôles physiologiques distincts. Bien que nos résultats suggèrent fortement que les niveaux de ghréline totale, plus particulièrement ceux de ghréline acylée, puissent avoir une influence sur la résistance à l'insuline, des études plus poussées devront élucider les mécanismes physiologiques impliqués. Ces études pourraient inclure l'administration aiguë ou prolongée de ghréline acylée et non-acylée afin d'évaluer l'expression génique (au moyen de puces d'ADN) dans les tissus musculaires et adipeux de sujets ISOS et IROS. De plus, tout semble indiquer que l'atteinte et la conservation d'un équilibre, encore indéfini, de ghréline acylée/non-acylée ou encore de ghréline acylée/totale, pourrait jouer un rôle important dans le maintien de l'homéostasie métabolique. Ainsi, il serait important de déterminer les mécanismes enzymatiques intra- ou extra-cellulaires responsables de l'acylation et de la désacylation, afin d'en arriver à une meilleure compréhension de la physiologie de la ghréline. En résumé, nos observations suggèrent la pertinence d'établir le profil de sécrétion de ghréline en tenant compte, à la fois, de la pulsatilité et des mécanismes enzymatiques régulateurs des taux de ghréline acylée et non-acylée pendant l'hyperinsulinémie aiguë ou chronique.

7.6 PROFILS PLASMATIQUES DE SÉCRÉTION DE GHRÉLINE CHEZ DES FEMMES POST-MÉNOPAUSÉES INSULINO-SENSIBLES OU INSULINO-RÉSISTANTES, OBÈSES OU EN SURPOIDS

Les concentrations de ghréline sont négativement affectées par l'obésité (298) et certaines conditions métaboliques, dont la résistance à l'insuline (474). Cette étude avait pour but d'éliminer l'effet confondant de l'adiposité pour évaluer si les profils complets (à jeun et en état d'hyperinsulinémie) de ghréline acylée, non-acylée et totale sont corrélés au niveau de sensibilité à l'insuline.

Dans le cadre d'une étude en cours à l'Unité Métabolique du département de Nutrition, nous avons effectué un phénotypage complet de femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids. Cette caractérisation nous a entre autre permis d'observer l'existence de deux sous-groupes distincts de sujets: les insulino-sensibles (ISOS) et les insulino-résistants (IROS). Bien que ces sujets présentent un profil métabolique opposé, aucune différence significative d'adiposité ne peut y être détectée.

Nos présents résultats soulignent l'intérêt d'évaluer les concentrations de ghréline acylée, non-acylée et/ou totale en condition d'hyperinsulinémie aiguë ou chronique. À notre connaissance, cette étude est la première à rapporter que l'élévation des taux physiologiques de ghréline acylée est associée à la résistance à l'insuline chez des sujets obèses ou en surpoids. De plus, nos données soulignent la pertinence de considérer les profils de ghréline acylée, non-acylée et totale comme marqueurs de la sensibilité à l'insuline pendant le CEH ou en conditions d'hyperinsulinémie en général. Finalement, nous constatons que la régulation des profils de ghréline, plus particulièrement ceux de ghréline acylée, sont modulés de façon différente et indépendante de l'adiposité, pendant une hyperinsulinémie maintenue chez les individus ISOS et IROS.

7.7 PROFILS PLASMATIQUES DE GHRÉLINE ET MARQUEURS INFLAMMATOIRES CHRONIQUES

Chez des populations obèses, la résistance à l'insuline est associée à des taux abaissés de ghréline (366, 475-477) et des taux élevés de marqueurs inflammatoires chroniques (126, 478). Certains auteurs ont rapporté que, chez des patients souffrant de maladie pulmonaire obstructive chronique ou de d'insuffisance cardiaque, les concentrations de ghréline totale sont associées à la CRP et au TNF- α (303, 351). À notre connaissance, nous sommes les premiers à établir un lien entre les profils complets de ghréline acylée et totale et hsCRP, hsTNF- α et sTNF-R1 chez des individus obèses ou en supoids.

Nos résultats fournissent de nouveaux arguments en faveur de l'existence d'une relation entre les profils de ghréline acylée et les facteurs inflammatoires chroniques. Plus spécifiquement, nous observons que les taux de ghréline acylée sont corrélés positivement avec le hsTNF- α et négativement avec le sTNF-R1. Nous observons que le sTNF-R1 est un meilleur marqueur de dysfonctions métaboliques que le hsTNF- α . Donc, des taux élevés de hsTNF- α et de ghréline acylée combinés à des concentrations basses de sTNF-R1 pourraient être considérés comme facteurs de prédiction du développement de troubles métaboliques chez des femmes post-ménopausées obèses ou en surpoids.

7.8 ÉTUDES FUTURES

Bien que nos résultats puissent contribuer à augmenter le niveau des connaissances des associations entre la ghréline et le profil métabolique, certains autres aspects méritent d'être examinés plus en profondeur. Tout d'abord, vu la nature corrélative de nos études, il serait pertinent de développer des études d'intervention clinique qui permettraient d'examiner de façon plus approfondie les effets de la modulation des taux de ghréline acylée, non-acylée et/ou totale sur le profil métabolique. Pour ce faire, des sujets normaux et/ou souffrant de dysfonctions métaboliques pourraient être étudiés lors d'administration de ghréline acylée, non-acylée ou totale afin de pouvoir mesurer directement les paramètres métaboliques ou marqueurs inflammatoires d'intérêt. De plus, des biopsies de tissus adipeux et musculaires pourraient permettre l'étude de la variation d'expression génique lors de l'administration de ghréline exogène.

Bien que ce présent projet de recherche n'ait pas inclus d'études de réceptologie, les nouvelles avancées permettent de croire que la ghréline acylée, et plus particulièrement la ghréline non-acylée, pourraient induire l'activité d'un récepteur qui reste à être identifié. La technique du CEH chez des individus ISOS et IROS pourrait être couplé à la collecte de tissus musculaires et adipeux par biopsie en conditions basales et hyperinsulinémiques. De telles techniques pourraient, entre autre, permettre l'évaluation de la variation de l'expression de récepteurs (autres que GHS-R1a) candidats pouvant induire les effets métaboliques associés à la ghréline non-acylée.

Afin de mieux comprendre l'effet aigu et chronique de l'insuline sur les taux de ghréline acylée, non-acylée et/ou totale, il serait également intéressant de prélever des tissus gastriques d'individus ISOS et IROS au cours d'une chirurgie bariatrique. Après leur isolation, l'incubation de ces cellules en présence de macronutriments ou de facteurs hormonaux pourrait permettre d'évaluer l'expression génique et le niveau de sécrétion de ghréline acylée, non-acylée et/ou totale chez des individus ISOS ou IROS.

Pour tenter d'établir des relations entre les profils de ghréline et les taux de marqueurs inflammatoires, des modèles cellulaires, animaux et humains permettant d'évaluer les effets de l'administration de TNF- α et de sTNF-R1 sur les profils de ghréline pourraient être développés. Lors de ces études chez des modèles animaux, la collecte de tissus musculaires et adipeux par biopsie devrait permettre de caractériser l'expression génique (par puces à ADN), et donc de relier l'activation ou la suppression de certains gènes lors de fluctuations des taux de ghréline. Aussi, la physiologie de l'association entre les taux de ghréline et ceux du système TNF- α pourrait être étudiée à partir de modèles avec ou sans dysfonctions métaboliques spécifiques.

Enfin, le développement et l'étude de modèles *in vitro* et *in vivo* permettant d'évaluer les interactions entre les différents facteurs hormonaux dérivés du tractus GI (plus particulièrement CCK, PYY₃₋₃₆, GLP-1 et OXM) devraient donner lieu à une meilleure compréhension de leurs rôles respectifs. Ce secteur de recherche représente un champ d'activités ouvert et fertile, qui s'alimente chaque année de la découverte d'autres facteurs, tels les peptides obestatine et apeline, qui sont venus récemment, après la ghréline, compliquer encore plus l'élucidation des mécanismes de l'homéostasie postprandiale et de l'établissement de la balance énergétique. Ces nouveaux peptides s'ajoutent à d'autres, connus depuis longtemps, isolés du GI par Viktor Mutt et d'autres chercheurs, comme la sécrétine, la motiline, la CCK, le NPY, le PYY, l'OXM, la galanine, la sorbine, le GRP (*gastrin releasing peptide*), le GIP (*gastric inhibitory polypeptide*), le PP (*pancreatic polypeptide*) ainsi que des dizaines d'autres produits de l'expression de gènes encore mal connus ou inconnus, dont la découverte est à venir suite à la caractérisation du génome humain.

8 SOURCES DOCUMENTAIRES

1. **Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP** 2001 The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *Jama* 286:1195-1200.
2. **King H, Aubert RE, Herman WH** 1998 Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21:1414-1431.
3. 2004 Prevalence of overweight and obesity among adults with diagnosed diabetes--United States, 1988-1994 and 1999-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 53:1066-1068.
4. **Kissebah AH, Vydelingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, Adams PW** 1982 Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 54:254-260.
5. **Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L** 2001 Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24:683-689.
6. **Reaven GM** 1988 Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-1607.
7. **Gibney MJ, Wolever TM** 1997 Periodicity of eating and human health: present perspective and future directions. *Br J Nutr* 77 Suppl 1:S3-5.
8. **Blundell J** 1991 Pharmacological approaches to appetite suppression. *Trends Pharmacol Sci* 12:147-157.
9. **Blundell JE, Lawton CL, Cotton JR, Macdiarmid JI** 1996 Control of human appetite: implications for the intake of dietary fat. *Annu Rev Nutr* 16:285-319.
10. **Booth DA, Mather P, Fuller J** 1982 Starch content of ordinary foods associatively conditions human appetite and satiation, indexed by intake and eating pleasantness of starch-paired flavours. *Appetite* 3:163-184.
11. **Woods SC** 1991 The eating paradox: how we tolerate food. *Psychol Rev* 98:488-505.
12. **Birch LL, McPhee L, Sullivan S, Johnson S** 1989 Conditioned meal initiation in young children. *Appetite* 13:105-113.
13. **Flint A, Raben A, Blundell JE, Astrup A** 2000 Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:38-48.

14. **de Graaf C** 1993 The validity of appetite ratings. *Appetite* 21:156-160.
15. **Stubbs RJ, Hughes DA, Johnstone AM, Rowley E, Reid C, Elia M, Stratton R, Delargy H, King N, Blundell JE** 2000 The use of visual analogue scales to assess motivation to eat in human subjects: a review of their reliability and validity with an evaluation of new hand-held computerized systems for temporal tracking of appetite ratings. *Br J Nutr* 84:405-415.
16. **Berridge KC** 1996 Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neurosci Biobehav Rev* 20:1-25.
17. **Mattes R** 1990 Hunger ratings are not a valid proxy measure of reported food intake in humans. *Appetite* 15:103-113.
18. **Rogers PJ, Blundell JE** 1979 Effect of anorexic drugs on food intake and the micro-structure of eating in human subjects. *Psychopharmacology (Berl)* 66:159-165.
19. **de Vries JH, Zock PL, Mensink RP, Katan MB** 1994 Underestimation of energy intake by 3-d records compared with energy intake to maintain body weight in 269 nonobese adults. *Am J Clin Nutr* 60:855-860.
20. **Goris AH, Westerterp-Plantenga MS, Westerterp KR** 2000 Undereating and underrecording of habitual food intake in obese men: selective underreporting of fat intake. *Am J Clin Nutr* 71:130-134.
21. **Harris JA, Benedict FG** 1918 A Biometric Study of Human Basal Metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 4:370-373.
22. **Schutz Y, Jequier E** 1994 *Energy needs: assessment and requirements*. 9th ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
23. **Schoeller DA, Ravussin E, Schutz Y, Acheson KJ, Baertschi P, Jequier E** 1986 Energy expenditure by doubly labeled water: validation in humans and proposed calculation. *Am J Physiol* 250:R823-830.
24. **Lifson N, Little WS, Levitt DG, Henderson RM** 1975 $H_2^{18}O$ (deuterium oxide) method for CO_2 output in small mammals and economic feasibility in man. *J Appl Physiol* 39:657-664.
25. **Ravussin E, Kozak LP** 2004 *Pharmacotherapy of Obesity, Options and Alternatives*. CRC Press, London, UK.

26. **Avogaro P, Crepaldi G, Enzi G, Tiengo A** 1965 [Metabolic aspects of essential obesity]. *Epatologia* 11:226-238.
27. **Haller H** 1977 [Epidemiology and associated risk factors of hyperlipoproteinemia]. *Z Gesamte Inn Med* 32:124-128.
28. **Zimmet P, Alberti KG, Shaw J** 2001 Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787.
29. 2001 Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama* 285:2486-2497.
30. **Alberti KG, Zimmet PZ** 1998 Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15:539-553.
31. **Einhorn D, Reaven GM, Cobin RH, Ford E, Ganda OP, Handelsman Y, Hellman R, Jellinger PS, Kendall D, Krauss RM, Neufeld ND, Petak SM, Rodbard HW, Seibel JA, Smith DA, Wilson PW** 2003 American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocr Pract* 9:237-252.
32. **Grimaldi A, Heurtier A** 1999 [Epidemiology of cardio-vascular complications of diabetes]. *Diabetes Metab* 25 Suppl 3:12-20.
33. **Diabetes IFo** 2005 The IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome Berlin, pp 1-7
34. **Ford ES, Giles WH, Dietz WH** 2002 Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama* 287:356-359.
35. **Vague J** 1956 The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr* 4:20-34.
36. **Voss LD, Kirkby J, Metcalf BS, Jeffery AN, O'Riordan C, Murphy MJ, Wilkin TJ** 2003 Preventable factors in childhood that lead to insulin resistance, diabetes mellitus and the metabolic syndrome: the EarlyBird diabetes study 1. *J Pediatr Endocrinol Metab* 16:1211-1224.

37. **Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Benussi C, De Simone L, Genazzani AR** 1999 Climacteric modifications in body weight and fat tissue distribution. *Climacteric* 2:37-44.
38. **Kelley DE, Thaete FL, Troost F, Huwe T, Goodpaster BH** 2000 Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E941-948.
39. **Goodpaster BH, Thaete FL, Simoneau JA, Kelley DE** 1997 Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes* 46:1579-1585.
40. **Sites CK, Calles-Escandon J, Brochu M, Butterfield M, Ashikaga T, Poehlman ET** 2000 Relation of regional fat distribution to insulin sensitivity in postmenopausal women. *Fertil Steril* 73:61-65.
41. **Brochu M, Starling RD, Tchernof A, Matthews DE, Garcia-Rubi E, Poehlman ET** 2000 Visceral adipose tissue is an independent correlate of glucose disposal in older obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2378-2384.
42. **Raji A, Seely EW, Arky RA, Simonson DC** 2001 Body fat distribution and insulin resistance in healthy Asian Indians and Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5366-5371.
43. **Rendell M, Hulthen UL, Tornquist C, Groop L, Mattiasson I** 2001 Relationship between abdominal fat compartments and glucose and lipid metabolism in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 86:744-749.
44. **Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, Wajcberg E, Mandarino LJ, DeFronzo RA** 2002 Abdominal fat distribution and peripheral and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E1135-1143.
45. **Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA** 1963 The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785-789.
46. **Basu A, Basu R, Shah P, Vella A, Rizza RA, Jensen MD** 2001 Systemic and regional free fatty acid metabolism in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E1000-1006.
47. **Guo Z, Hensrud DD, Johnson CM, Jensen MD** 1999 Regional postprandial fatty acid metabolism in different obesity phenotypes. *Diabetes* 48:1586-1592.

48. **Peiris AN, Hennes MI, Evans DJ, Wilson CR, Lee MB, Kissebah AH** 1988 Relationship of anthropometric measurements of body fat distribution to metabolic profile in premenopausal women. *Acta Med Scand Suppl* 723:179-188.
49. **Peiris AN, Struve MF, Kissebah AH** 1987 Relationship of body fat distribution to the metabolic clearance of insulin in premenopausal women. *Int J Obes* 11:581-589.
50. **Pouliot MC, Despres JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C, Tremblay A, Nadeau A, Lupien PJ** 1994 Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol* 73:460-468.
51. **Banerji MA, Lebowitz J, Chaiken RL, Gordon D, Kral JG, Lebovitz HE** 1997 Relationship of visceral adipose tissue and glucose disposal is independent of sex in black NIDDM subjects. *Am J Physiol* 273:E425-432.
52. **Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S** 1987 Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism* 36:54-59.
53. **Peiris AN, Struve MF, Mueller RA, Lee MB, Kissebah AH** 1988 Glucose metabolism in obesity: influence of body fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 67:760-767.
54. **Ross R, Aru J, Freeman J, Hudson R, Janssen I** 2002 Abdominal adiposity and insulin resistance in obese men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E657-663.
55. **Ross R, Freeman J, Hudson R, Janssen I** 2002 Abdominal obesity, muscle composition, and insulin resistance in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5044-5051.
56. **Ohlson LO, Larsson B, Svardsudd K, Welin L, Eriksson H, Wilhelmsen L, Bjorntorp P, Tibblin G** 1985 The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes* 34:1055-1058.
57. **Casassus P, Fontbonne A, Thibault N, Ducimetiere P, Richard JL, Claude JR, Warnet JM, Rosselin G, Eschwege E** 1992 Upper-body fat distribution: a hyperinsulinemia-independent predictor of coronary heart disease mortality. The Paris Prospective Study. *Arterioscler Thromb* 12:1387-1392.

58. **Donahue RP, Abbott RD** 1987 Central obesity and coronary heart disease in men. *Lancet* 2:1215.
59. **Ducimetiere P, Richard J, Cambien F** 1986 The pattern of subcutaneous fat distribution in middle-aged men and the risk of coronary heart disease: the Paris Prospective Study. *Int J Obes* 10:229-240.
60. **Lapidus L, Bengtsson C, Larsson B, Pennert K, Rybo E, Sjostrom L** 1984 Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *Br Med J (Clin Res Ed)* 289:1257-1261.
61. **Peiris AN, Sothmann MS, Hoffmann RG, Hennes MI, Wilson CR, Gustafson AB, Kissebah AH** 1989 Adiposity, fat distribution, and cardiovascular risk. *Ann Intern Med* 110:867-872.
62. **Brochu M, Tchernof A, Dionne IJ, Sites CK, Eltabbakh GH, Sims EA, Poehlman ET** 2001 What are the physical characteristics associated with a normal metabolic profile despite a high level of obesity in postmenopausal women? *J Clin Endocrinol Metab* 86:1020-1025.
63. **Meigs JB, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW, Cupples LA, Nathan DM, Singer DE** 1997 Risk variable clustering in the insulin resistance syndrome. The Framingham Offspring Study. *Diabetes* 46:1594-1600.
64. **Hanley AJ, Karter AJ, Festa A, D'Agostino R, Jr., Wagenknecht LE, Savage P, Tracy RP, Saad MF, Haffner S** 2002 Factor analysis of metabolic syndrome using directly measured insulin sensitivity: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* 51:2642-2647.
65. **Anderson JW, Kendall CW, Jenkins DJ** 2003 Importance of weight management in type 2 diabetes: review with meta-analysis of clinical studies. *J Am Coll Nutr* 22:331-339.
66. 2003 Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26 Suppl 1:S33-50.
67. **Hanley AJ, Williams K, Stern MP, Haffner SM** 2002 Homeostasis model assessment of insulin resistance in relation to the incidence of cardiovascular disease: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 25:1177-1184.

68. **Howard G, Bergman R, Wagenknecht LE, Haffner SM, Savage PJ, Saad MF, Laws A, D'Agostino RB, Jr.** 1998 Ability of alternative indices of insulin sensitivity to predict cardiovascular risk: comparison with the "minimal model". Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators. *Ann Epidemiol* 8:358-369.
69. **Gregg EW, Cadwell BL, Cheng YJ, Cowie CC, Williams DE, Geiss L, Engelgau MM, Vinicor F** 2004 Trends in the prevalence and ratio of diagnosed to undiagnosed diabetes according to obesity levels in the U.S. *Diabetes Care* 27:2806-2812.
70. **Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM** 2003 NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes* 52:1210-1214.
71. **Abbasi F, Brown BW, Jr., Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM** 2002 Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *J Am Coll Cardiol* 40:937-943.
72. **Bogardus C, Lillioja S, Mott DM, Hollenbeck C, Reaven G** 1985 Relationship between degree of obesity and in vivo insulin action in man. *Am J Physiol* 248:E286-291.
73. **Chang SA, Kim HS, Yoon KH, Ko SH, Kwon HS, Kim SR, Lee WC, Yoo SJ, Son HS, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK** 2004 Body mass index is the most important determining factor for the degree of insulin resistance in non-obese type 2 diabetic patients in Korea. *Metabolism* 53:142-146.
74. **Haffner SM, D'Agostino R, Saad MF, Rewers M, Mykkanen L, Selby J, Howard G, Savage PJ, Hamman RF, Wagenknecht LE, et al.** 1996 Increased insulin resistance and insulin secretion in nondiabetic African-Americans and Hispanics compared with non-Hispanic whites. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* 45:742-748.
75. **Vaag A, Henriksen JE, Madsbad S, Holm N, Beck-Nielsen H** 1995 Insulin secretion, insulin action, and hepatic glucose production in identical twins discordant for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 95:690-698.
76. **Bergman RN, Finegood DT, Ader M** 1985 Assessment of insulin sensitivity in vivo. *Endocr Rev* 6:45-86.

77. **DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R** 1979 Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237:E214-223.
78. **Arner P** 1988 Control of lipolysis and its relevance to development of obesity in man. *Diabetes Metab Rev* 4:507-515.
79. **Ferland M, Despres JP, Nadeau A, Moorjani S, Tremblay A, Lupien PJ, Theriault G, Bouchard C** 1991 Contribution of glucose tolerance and plasma insulin levels to the relationships between body fat distribution and plasma lipoprotein levels in women. *Int J Obes* 15:677-688.
80. **Marsh JB** 2003 Lipoprotein metabolism in obesity and diabetes: insights from stable isotope kinetic studies in humans. *Nutr Rev* 61:363-375.
81. **Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G** 1998 Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* 139:205-222.
82. **Kwiterovich PO, Jr.** 2002 Clinical relevance of the biochemical, metabolic, and genetic factors that influence low-density lipoprotein heterogeneity. *Am J Cardiol* 90:30i-47i.
83. **McNamara JR, Campos H, Ordovas JM, Peterson J, Wilson PW, Schaefer EJ** 1987 Effect of gender, age, and lipid status on low density lipoprotein subfraction distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis* 7:483-490.
84. **Swinkels DW, Demacker PN, Hendriks JC, van 't Laar A** 1989 Low density lipoprotein subfractions and relationship to other risk factors for coronary artery disease in healthy individuals. *Arteriosclerosis* 9:604-613.
85. **Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM** 1988 Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *Jama* 260:1917-1921.
86. **Stampfer MJ, Krauss RM, Ma J, Blanche PJ, Holl LG, Sacks FM, Hennekens CH** 1996 A prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter, and risk of myocardial infarction. *Jama* 276:882-888.
87. **Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP** 1997 Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the

- risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* 95:69-75.
88. **Tornvall P, Karpe F, Carlson LA, Hamsten A** 1991 Relationships of low density lipoprotein subfractions to angiographically defined coronary artery disease in young survivors of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 90:67-80.
 89. **Campos H, Genest JJ, Jr., Blijlevens E, McNamara JR, Jenner JL, Ordovas JM, Wilson PW, Schaefer EJ** 1992 Low density lipoprotein particle size and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 12:187-195.
 90. **Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM** 1996 Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *Jama* 276:875-881.
 91. **Hurt-Camejo E, Camejo G, Rosengren B, Lopez F, Wiklund O, Bondjers G** 1990 Differential uptake of proteoglycan-selected subfractions of low density lipoprotein by human macrophages. *J Lipid Res* 31:1387-1398.
 92. **Chait A, Brazg RL, Tribble DL, Krauss RM** 1993 Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am J Med* 94:350-356.
 93. **Tribble DL, Rizzo M, Chait A, Lewis DM, Blanche PJ, Krauss RM** 2001 Enhanced oxidative susceptibility and reduced antioxidant content of metabolic precursors of small, dense low-density lipoproteins. *Am J Med* 110:103-110.
 94. **Santamarina-Fojo S, Haudenschild C, Amar M** 1998 The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 9:211-219.
 95. **Jin W, Marchadier D, Rader DJ** 2002 Lipases and HDL metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13:174-178.
 96. **Sacks FM, Alaupovic P, Moye LA, Cole TG, Sussex B, Stampfer MJ, Pfeffer MA, Braunwald E** 2000 VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation* 102:1886-1892.
 97. **Luc G, Fievet C, Arveiler D, Evans AE, Bard JM, Cambien F, Fruchart JC, Ducimetiere P** 1996 Apolipoproteins C-III and E in apoB- and non-apoB-containing lipoproteins in two populations at contrasting risk for myocardial

- infarction: the ECTIM study. Etude Cas Temoins sur 'Infarctus du Myocarde. *J Lipid Res* 37:508-517.
98. **Luc G, Bard JM, Arveiler D, Ferrieres J, Evans A, Amouyel P, Fruchart JC, Ducimetiere P** 2002 Lipoprotein (a) as a predictor of coronary heart disease: the PRIME Study. *Atherosclerosis* 163:377-384.
 99. **Craig WY, Neveux LM, Palomaki GE, Cleveland MM, Haddow JE** 1998 Lipoprotein(a) as a risk factor for ischemic heart disease: metaanalysis of prospective studies. *Clin Chem* 44:2301-2306.
 100. **Schaefer EJ, McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Ordovas JM, Wilson PW** 2002 Elevated remnant-like particle cholesterol and triglyceride levels in diabetic men and women in the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* 25:989-994.
 101. **Kershaw EE, Flier JS** 2004 Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556.
 102. **Pantanetti P, Garrapa GG, Mantero F, Boscaro M, Faloi E, Venarucci D** 2004 Adipose tissue as an endocrine organ? A review of recent data related to cardiovascular complications of endocrine dysfunctions. *Clin Exp Hypertens* 26:387-398.
 103. **Correia ML, Haynes WG** 2004 Leptin, obesity and cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13:215-223.
 104. **Meier U, Gressner AM** 2004 Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 50:1511-1525.
 105. **Martin LJ, Cianflone K, Zakarian R, Nagrani G, Almasy L, Rainwater DL, Cole S, Hixson JE, MacCluer JW, Blangero J, Comuzzie AG** 2004 Bivariate linkage between acylation-stimulating protein and BMI and high-density lipoproteins. *Obes Res* 12:669-678.
 106. **Lacquemant C, Vasseur F, Lepretre F, Froguel P** 2003 [Adipocytokins, obesity and development of type 2 diabetes]. *Med Sci (Paris)* 19:809-817.
 107. **Habata Y, Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Hinuma S, Kitada C, Nishizawa N, Murosaki S, Kurokawa T, Onda H, Tatemoto K, Fujino M** 1999

- Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim Biophys Acta* 1452:25-35.
108. **Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M** 1998 Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 251:471-476.
 109. **Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigne C, Mazzucotelli A, Castan-Laurell I, Tack I, Knibiehler B, Carpene C, Audigier Y, Saulnier-Blache JS, Valet P** 2005 Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146:1764-1771.
 110. **Park KG, Park KS, Kim MJ, Kim HS, Suh YS, Ahn JD, Park KK, Chang YC, Lee IK** 2004 Relationship between serum adiponectin and leptin concentrations and body fat distribution. *Diabetes Res Clin Pract* 63:135-142.
 111. **Diez JJ, Iglesias P** 2003 The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 148:293-300.
 112. **Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y** 1999 Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83.
 113. **Stefan N, Bunt JC, Salbe AD, Funahashi T, Matsuzawa Y, Tataranni PA** 2002 Plasma adiponectin concentrations in children: relationships with obesity and insulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4652-4656.
 114. **Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF** 2001 Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2005-2010.
 115. **Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y** 2001 Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103:1057-1063.

116. **Yang WS, Jeng CY, Wu TJ, Tanaka S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Wang JP, Chen CL, Tai TY, Chuang LM** 2002 Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 25:376-380.
117. **Hirose H, Kawai T, Yamamoto Y, Taniyama M, Tomita M, Matsubara K, Okazaki Y, Ishii T, Oguma Y, Takei I, Saruta T** 2002 Effects of pioglitazone on metabolic parameters, body fat distribution, and serum adiponectin levels in Japanese male patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 51:314-317.
118. **Koh KK, Han SH, Quon MJ** 2005 Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol* 46:1978-1985.
119. **Trayhurn P, Wood IS** 2005 Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans* 33:1078-1081.
120. **Aldhahi W, Hamdy O** 2003 Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. *Curr Diab Rep* 3:293-298.
121. **Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Kavouras S, Stefanadis C** 2005 The associations between physical activity, inflammation, and coagulation markers, in people with metabolic syndrome: the ATTICA study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 12:151-158.
122. **Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Hulten LM, Hiukka A, Taskinen MR** 2003 Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 166:387-394.
123. **Bermudez EA, Rifai N, Buring J, Manson JE, Ridker PM** 2002 Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1668-1673.
124. **McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Liang L, Reaven G, Schaaf P, Reaven P** 2002 Differentiation between obesity and insulin resistance in the association with C-reactive protein. *Circulation* 106:2908-2912.
125. **Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F, Molinari AM, Giugliano D** 2002 Reduction of inflammatory cytokine

- concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* 105:804-809.
126. **Corica F, Allegra A, Corsonello A, Buemi M, Calapai G, Ruello A, Nicita Mauro V, Ceruso D** 1999 Relationship between plasma leptin levels and the tumor necrosis factor-alpha system in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:355-360.
 127. **Aggarwal BB, Shishodia S, Takada Y, Jackson-Bernitsas D, Ahn KS, Sethi G, Ichikawa H** 2006 TNF blockade: an inflammatory issue. *Ernst Schering Res Found Workshop* 161-186.
 128. **Vettor R, Milan G, Rossato M, Federspil G** 2005 Review article: adipocytokines and insulin resistance. *Aliment Pharmacol Ther* 22 Suppl 2:3-10.
 129. **Kobayashi K** 2005 Adipokines: therapeutic targets for metabolic syndrome. *Curr Drug Targets* 6:525-529.
 130. **Nakanishi N, Yoshida H, Nakamura K, Suzuki K, Tatara K** 2001 Predictors for development of hyperuricemia: an 8-year longitudinal study in middle-aged Japanese men. *Metabolism* 50:621-626.
 131. **Ter Maaten JC, Voorburg A, Heine RJ, Ter Wee PM, Donker AJ, Gans RO** 1997 Renal handling of urate and sodium during acute physiological hyperinsulinaemia in healthy subjects. *Clin Sci (Lond)* 92:51-58.
 132. **Alderman MH, Cohen H, Madhavan S, Kivlighn S** 1999 Serum uric acid and cardiovascular events in successfully treated hypertensive patients. *Hypertension* 34:144-150.
 133. **Vambergue A, Rugeri L, Gaveriaux V, Devos P, Martin A, Fermon C, Fontaine P, Jude B** 2001 Factor VII, tissue factor pathway inhibitor, and monocyte tissue factor in diabetes mellitus: influence of type of diabetes, obesity index, and age. *Thromb Res* 101:367-375.
 134. **Melinek J, Livingston E, Cortina G, Fishbein MC** 2002 Autopsy findings following gastric bypass surgery for morbid obesity. *Arch Pathol Lab Med* 126:1091-1095.
 135. **Kohler HP** 2002 Insulin resistance syndrome: interaction with coagulation and fibrinolysis. *Swiss Med Wkly* 132:241-252.

136. **Franz IW, Van Der Meyden J, Tonnesmann U, Muller JF, Rucker L, Hopfenmuller W** 2002 [Blood coagulation in normotensives and hypertensives in relation to their body mass index]. *Dtsch Med Wochenschr* 127:2374-2378.
137. **Mertens I, Van Gaal LF** 2002 Obesity, haemostasis and the fibrinolytic system. *Obes Rev* 3:85-101.
138. **Rissanen P, Vahtera E, Krusius T, Uusitupa M, Rissanen A** 2001 Weight change and blood coagulability and fibrinolysis in healthy obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:212-218.
139. **Nesto RW** 2004 Correlation between cardiovascular disease and diabetes mellitus: current concepts. *Am J Med* 116 Suppl 5A:11S-22S.
140. **Laight DW, Carrier MJ, Anggard EE** 2000 Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res* 47:457-464.
141. **Taniyama Y, Griendling KK** 2003 Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42:1075-1081.
142. **Shah AM, Channon KM** 2004 Free radicals and redox signalling in cardiovascular disease. *Heart* 90:486-487.
143. **Young JB, Landsberg L** 1977 Stimulation of the sympathetic nervous system during sucrose feeding. *Nature* 269:615-617.
144. **Landsberg L** 1986 Diet, obesity and hypertension: an hypothesis involving insulin, the sympathetic nervous system, and adaptive thermogenesis. *Q J Med* 61:1081-1090.
145. **Webb DJ** 1997 Endothelin: from molecule to man. *Br J Clin Pharmacol* 44:9-20.
146. **Christ M, Klima T, Maisch B** 2003 [Arterial hypertension and metabolic syndrome]. *Herz* 28:674-685.
147. **Sowers JR** 2004 Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H1597-1602.
148. **Sowers JR, Stump CS** 2004 Insights into the biology of diabetic vascular disease: what's new? *Am J Hypertens* 17:2S-6S; quiz A2-4.
149. **Schiffrin EL** 2004 Vascular stiffening and arterial compliance: implications for systolic blood pressure. *Am J Hypertens* 17:39S-48S.
150. **Tham DM, Martin-McNulty B, Wang YX, Wilson DW, Vergona R, Sullivan ME, Dole W, Rutledge JC** 2002 Angiotensin II is associated with activation of

- NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs. *Physiol Genomics* 11:21-30.
151. **Bowers CY, Reynolds GA, Durham D, Barrera CM, Pezzoli SS, Thorner MO** 1990 Growth hormone (GH)-releasing peptide stimulates GH release in normal men and acts synergistically with GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 70:975-982.
 152. **Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH** 1996 A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974-977.
 153. **Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K** 1999 Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660.
 154. **Bowers CY, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Chang K, Momany F** 1981 A study on the regulation of growth hormone release from the pituitaries of rats in vitro. *Endocrinology* 108:1071-1080.
 155. **Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA, Hong A** 1984 On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology* 114:1537-1545.
 156. **Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Hong A, Newlander K** 1984 Conformational energy studies and in vitro and in vivo activity data on growth hormone-releasing peptides. *Endocrinology* 114:1531-1536.
 157. **Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ, Wyvratt MJ, Jr., Fisher MH, Nargund RP, Patchett AA** 1997 Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 18:621-645.
 158. **McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD** 1997 Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol* 11:415-423.

159. **Feighner SD, Howard AD, Prendergast K, Palyha OC, Hreniuk DL, Nargund R, Underwood D, Tata JR, Dean DC, Tan CP, McKee KK, Woods JW, Patchett AA, Smith RG, Van der Ploeg LH** 1998 Structural requirements for the activation of the human growth hormone secretagogue receptor by peptide and nonpeptide secretagogues. *Mol Endocrinol* 12:137-145.
160. **Yang L, Morriello G, Prendergast K, Cheng K, Jacks T, Chan WW, Schleim KD, Smith RG, Patchett AA** 1998 Potent 3-spiropiperidine growth hormone secretagogues. *Bioorg Med Chem Lett* 8:107-112.
161. **Dean DC, Nargund RP, Pong SS, Chaung LY, Griffin P, Melillo DG, Ellsworth RL, Van der Ploeg LH, Patchett AA, Smith RG** 1996 Development of a high specific activity sulfur-35-labeled sulfonamide radioligand that allowed the identification of a new growth hormone secretagogue receptor. *J Med Chem* 39:1767-1770.
162. **Tannenbaum GS, Lapointe M, Beaudet A, Howard AD** 1998 Expression of growth hormone secretagogue-receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 139:4420-4423.
163. **Papotti M, Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G** 2000 Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3803-3807.
164. **Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M** 2002 The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2988.
165. **Katugampola SD, Pallikaros Z, Davenport AP** 2001 [125I-His(9)]-ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue: up-regulation of receptors with atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 134:143-149.
166. **Yokote R, Sato M, Matsubara S, Ohye H, Niimi M, Murao K, Takahara J** 1998 Molecular cloning and gene expression of growth hormone-releasing peptide receptor in rat tissues. *Peptides* 19:15-20.
167. **Petersenn S, Rasch AC, Penschorn M, Beil FU, Schulte HM** 2001 Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 142:2649-2659.

168. **Peng XD, Park S, Gadelha MR, Coschigano KT, Kopchick JJ, Frohman LA, Kineman RD** 2001 The growth hormone (GH)-axis of GH receptor/binding protein gene-disrupted and metallothionein-human GH-releasing hormone transgenic mice: hypothalamic neuropeptide and pituitary receptor expression in the absence and presence of GH feedback. *Endocrinology* 142:1117-1123.
169. **Kineman RD, Kamegai J, Frohman LA** 1999 Growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) and the GH secretagogue (GHS), L692,585, differentially modulate rat pituitary GHS receptor and GHRH receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 140:3581-3586.
170. **Bennett PA, Thomas GB, Howard AD, Feighner SD, van der Ploeg LH, Smith RG, Robinson IC** 1997 Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology* 138:4552-4557.
171. **Nass R, Gilrain J, Anderson S, Gaylinn B, Dalkin A, Day R, Peruggia M, Thorner MO** 2000 High plasma growth hormone (GH) levels inhibit expression of GH secretagogue receptor messenger ribonucleic acid levels in the rat pituitary. *Endocrinology* 141:2084-2089.
172. **Kaji H, Kishimoto M, Kirimura T, Iguchi G, Murata M, Yoshioka S, Iida K, Okimura Y, Yoshimoto Y, Chihara K** 2001 Hormonal regulation of the human ghrelin receptor gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 284:660-666.
173. **Garcia A, Alvarez CV, Smith RG, Dieguez C** 2001 Regulation of Pit-1 expression by ghrelin and GHRP-6 through the GH secretagogue receptor. *Mol Endocrinol* 15:1484-1495.
174. **Herrington J, Hille B** 1994 Growth hormone-releasing hexapeptide elevates intracellular calcium in rat somatotropes by two mechanisms. *Endocrinology* 135:1100-1108.
175. **Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, Hayashi Y, Kangawa K** 2001 Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R1483-1487.
176. **Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K** 2002 Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem* 277:5667-5674.

177. **Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, Malan D, Baj G, Granata R, Broglio F, Papotti M, Surico N, Bussolino F, Isgaard J, Deghenghi R, Sinigaglia F, Prat M, Muccioli G, Ghigo E, Graziani A** 2002 Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 159:1029-1037.
178. **Muccioli G, Tschop M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M, Ghigo E** 2002 Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol* 440:235-254.
179. **Bowers CY, Momany F, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Chang K** 1980 Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology* 106:663-667.
180. **Wajnrajch MP, Ten, I.S., Gertner, J.M. and Leibel, R.L.** 2000 Genomic Organization of the human GHRELIN gene. *J. Endocr. Genet.* 1:231-233
181. **Tanaka M, Hayashida, Y., Iguchi, T., Nakao, N., Nakai, N. and Nakashima, K.** 2001 Organization of mouse ghrelin gene: AB060078. Non-publié (Genbank)
182. **Richards MP, Poch SM, McMurtry JP** 2006 Characterization of turkey and chicken ghrelin genes, and regulation of ghrelin and ghrelin receptor mRNA levels in broiler chickens. *Gen Comp Endocrinol* 145:298-310.
183. **Angeloni SV, Glynn N, Ambrosini G, Garant MJ, Higley JD, Suomi S, Hansen BC** 2004 Characterization of the rhesus monkey ghrelin gene and factors influencing ghrelin gene expression and fasting plasma levels. *Endocrinology* 145:2197-2205.
184. **Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K** 2000 Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem* 275:21995-22000.
185. **Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Koda A, Yamamoto K, Kitajima Y, Matsumoto M, Minamitake Y, Kikuyama S, Kangawa K** 2001 Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue. *J Biol Chem* 276:40441-40448.
186. **Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, Warren VA, Howard AD, Van Der Ploeg LH, Heck JV** 2000 Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of

- ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem* 43:4370-4376.
187. **Matsumoto M, Kitajima Y, Iwanami T, Hayashi Y, Tanaka S, Minamitake Y, Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K** 2001 Structural similarity of ghrelin derivatives to peptidyl growth hormone secretagogues. *Biochem Biophys Res Commun* 284:655-659.
188. **Matsumoto M, Hosoda H, Kitajima Y, Morozumi N, Minamitake Y, Tanaka S, Matsuo H, Kojima M, Hayashi Y, Kangawa K** 2001 Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 287:142-146.
189. **Silva Elipe MV, Bednarek MA, Gao YD** 2001 1H NMR structural analysis of human ghrelin and its six truncated analogs. *Biopolymers* 59:489-501.
190. **Zhang W, Zhao L, Lin TR, Chai B, Fan Y, Gantz I, Mulholland MW** 2004 Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Mol Biol Cell* 15:2484-2491.
191. **Delhanty PJ, van der Eerden BC, van der Velde M, Gauna C, Pols HA, Jahr H, Chiba H, van der Lely AJ, van Leeuwen JP** 2006 Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways in the absence of GHS-R1a. *J Endocrinol* 188:37-47.
192. **Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T, Date Y, Mondal MS, Shimbara T, Kawagoe T, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Nakazato M** 2006 Des-acyl Ghrelin Induces Food Intake by a Mechanism Independent of the Growth Hormone Secretagogue Receptor. *Endocrinology* (in press)
193. **Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M** 2005 Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* 54:18-24.
194. **Bedendi I, Alloatti G, Marcantoni A, Malan D, Catapano F, Ghe C, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G** 2003 Cardiac effects of ghrelin and its endogenous derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln14-ghrelin. *Eur J Pharmacol* 476:87-95.

195. **Muccioli G, Pons N, Ghe C, Catapano F, Granata R, Ghigo E** 2004 Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol* 498:27-35.
196. **Chen CY, Chao Y, Chang FY, Chien EJ, Lee SD, Doong ML** 2005 Intracisternal des-acyl ghrelin inhibits food intake and non-nutrient gastric emptying in conscious rats. *Int J Mol Med* 16:695-699.
197. **Chen CY, Inui A, Asakawa A, Fujino K, Kato I, Chen CC, Ueno N, Fujimiya M** 2005 Des-acyl ghrelin acts by CRF type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in conscious rats. *Gastroenterology* 129:8-25.
198. **Tsubota Y, Owada-Makabe K, Yukawa K, Maeda M** 2005 Hypotensive effect of des-acyl ghrelin at nucleus tractus solitarii of rat. *Neuroreport* 16:163-166.
199. **Broglia F, Benso A, Gottero C, Prodam F, Gauna C, Filtri L, Arvat E, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E** 2003 Non-acylated ghrelin does not possess the pituitary and pancreatic endocrine activity of acylated ghrelin in humans. *J Endocrinol Invest* 26:192-196.
200. **Gauna C, Delhanty PJ, Hofland LJ, Janssen JA, Broglia F, Ross RJ, Ghigo E, van der Lely AJ** 2005 Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1055-1060.
201. **Smith RG, Griffin PR, Xu Y, Smith AG, Liu K, Calacay J, Feighner SD, Pong C, Leong D, Pomes A, Cheng K, Van der Ploeg LH, Howard AD, Schaeffer J, Leonard RJ** 2000 Adenosine: A partial agonist of the growth hormone secretagogue receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 276:1306-1313.
202. **Tullin S, Hansen BS, Ankersen M, Moller J, Von Cappelen KA, Thim L** 2000 Adenosine is an agonist of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 141:3397-3402.
203. **Broglia F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Prodam F, Grottoli S, Papotti M, Muccioli G, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E** 2002 Endocrine activities of cortistatin-14 and its interaction with GHRH and ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3783-3790.
204. **Broglia F, Koetsveld P, Benso A, Gottero C, Prodam F, Papotti M, Muccioli G, Gauna C, Hofland L, Deghenghi R, Arvat E, Van Der Lely AJ, Ghigo E**

- 2002 Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4829-4832.
205. **Deghenghi R, Papotti M, Ghigo E, Muccioli G** 2001 Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J Endocrinol Invest* 24:RC1-3.
206. **Muccioli G, Papotti M, Locatelli V, Ghigo E, Deghenghi R** 2001 Binding of ¹²⁵I-labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland. *J Endocrinol Invest* 24:RC7-9.
207. **Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M** 2000 Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141:4255-4261.
208. **Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasu H, Yahata K, Mukoyama M, Sugawara A, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2000 Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett* 486:213-216.
209. **Dornonville de la Cour C, Bjorkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, Hakanson R** 2001 A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept* 99:141-150.
210. **Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2001 Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4753-4758.
211. **Krsek M, Rosicka M, Haluzik M, Svobodova J, Kotrlikova E, Justova V, Lacinova Z, Jarkovska Z** 2002 Plasma ghrelin levels in patients with short bowel syndrome. *Endocr Res* 28:27-33.
212. **Krsek M, Rosicka M, Papezova H, Krizova J, Kotrlikova E, Haluz'k M, Justova V, Lacinova Z, Jarkovska Z** 2003 Plasma ghrelin levels and malnutrition: a comparison of two etiologies. *Eat Weight Disord* 8:207-211.
213. **Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T** 2002 Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 23:531-536.

214. **Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL** 2003 The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37:649-661.
215. **Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, Kangawa K, Grossman AB** 2001 The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86:881-887.
216. **Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M** 2003 Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 144:1506-1512.
217. **Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, Lillard JW, Jr., Taub DD** 2004 Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest* 114:57-66.
218. **Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C** 2001 GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4284-4291.
219. **Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Papotti M** 2002 Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. *J Histochem Cytochem* 50:1013-1021.
220. **Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F** 2001 Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 142:788-794.
221. **Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M** 2003 Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 88:879-887.

222. **Camino JE, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C** 2003 Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 144:1594-1602.
223. **Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E, Papotti M** 2002 Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1300-1308.
224. **Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S** 2002 Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51:124-129.
225. **Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L** 2004 Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2924-2929.
226. **Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F** 2002 The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 107:63-69.
227. **Iwakura H, Hosoda K, Doi R, Komoto I, Nishimura H, Son C, Fujikura J, Tomita T, Takaya K, Ogawa Y, Hayashi T, Inoue G, Akamizu T, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Imamura M, Nakao K** 2002 Ghrelin expression in islet cell tumors: augmented expression of ghrelin in a case of glucagonoma with multiple endocrine neoplasm type I. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4885-4888.
228. **Kanamoto N, Akamizu T, Hosoda H, Hataya Y, Ariyasu H, Takaya K, Hosoda K, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2001 Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4984-4990.
229. **Korbonits M, Kojima M, Kangawa K, Grossman AB** 2001 Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* 14:101-104.
230. **Papotti M, Cassoni P, Volante M, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E** 2001 Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5052-5059.

231. **Rindi G, Savio A, Torsello A, Zoli M, Locatelli V, Cocchi D, Paolotti D, Solcia E** 2002 Ghrelin expression in gut endocrine growths. *Histochem Cell Biol* 117:521-525.
232. **Volante M, Allia E, Fulcheri E, Cassoni P, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M** 2003 Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor growth. *Am J Pathol* 162:645-654.
233. **Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, Gaytan F, Zhang FP, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E** 2002 Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143:717-725.
234. **Tanaka M, Hayashida Y, Nakao N, Nakai N, Nakashima K** 2001 Testis-specific and developmentally induced expression of a ghrelin gene-derived transcript that encodes a novel polypeptide in the mouse. *Biochim Biophys Acta* 1522:62-65.
235. **Gualillo O, Caminos JE, Kojima M, Kangawa K, Arvat E, Ghigo E, Casanueva FF, Dieguez C** 2001 Gender and gonadal influences on ghrelin mRNA levels in rat stomach. *Eur J Endocrinol* 144:687-690.
236. **Erdmann J, Lippl F, Schusdziarra V** 2003 Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul Pept* 116:101-107.
237. **Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K** 2000 Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 279:909-913.
238. **Shanado Y, Kometani M, Uchiyama H, Koizumi S, Teno N** 2004 Lysophospholipase I identified as a ghrelin deacylation enzyme in rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun* 325:1487-1494.
239. **De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, Waelbroeck M, Robberecht P, Delporte C** 2004 Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* 145:4997-5005.
240. **Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM, Ramesh BS, Byrne DJ, MacColl GS, Keen JN, Bouloux PM, Mikhailidis DP, Bruckdorfer KR, Vanderpump MP, Srai KS** 2003 Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem* 278:8877-8880.

241. **Okada K, Ishii S, Minami S, Sugihara H, Shibasaki T, Wakabayashi I** 1996 Intracerebroventricular administration of the growth hormone-releasing peptide KP-102 increases food intake in free-feeding rats. *Endocrinology* 137:5155-5158.
242. **Kuriyama H, Hotta M, Wakabayashi I, Shibasaki T** 2000 A 6-day intracerebroventricular infusion of the growth hormone-releasing peptide KP-102 stimulates food intake in both non-stressed and intermittently-stressed rats. *Neurosci Lett* 282:109-112.
243. **Torsello A, Locatelli V, Melis MR, Succu S, Spano MS, Deghenghi R, Muller EE, Argiolas A** 2000 Differential orexigenic effects of hexarelin and its analogs in the rat hypothalamus: indication for multiple growth hormone secretagogue receptor subtypes. *Neuroendocrinology* 72:327-332.
244. **Lall S, Tung LY, Ohlsson C, Jansson JO, Dickson SL** 2001 Growth hormone (GH)-independent stimulation of adiposity by GH secretagogues. *Biochem Biophys Res Commun* 280:132-138.
245. **Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM, Luckman SM** 2002 Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology* 143:155-162.
246. **Shuto Y, Shibasaki T, Otagiri A, Kuriyama H, Ohata H, Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I** 2002 Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest* 109:1429-1436.
247. **Tschop M, Statnick MA, Suter TM, Heiman ML** 2002 GH-releasing peptide-2 increases fat mass in mice lacking NPY: indication for a crucial mediating role of hypothalamic agouti-related protein. *Endocrinology* 143:558-568.
248. **Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I** 2000 Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology* 141:4797-4800.
249. **Tschop M, Smiley DL, Heiman ML** 2000 Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-913.
250. **Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR** 2000 The novel

- hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141:4325-4328.
251. **Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Niiijima A, Fujino MA, Kasuga M** 2001 Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120:337-345.
252. **Hayashida T, Murakami K, Mogi K, Nishihara M, Nakazato M, Mondal MS, Horii Y, Kojima M, Kangawa K, Murakami N** 2001 Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. *Domest Anim Endocrinol* 21:17-24.
253. **Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S** 2001 A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409:194-198.
254. **Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillon WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR** 2001 Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50:2540-2547.
255. **Furuse M, Tachibana T, Ohgushi A, Ando R, Yoshimatsu T, Denbow DM** 2001 Intracerebroventricular injection of ghrelin and growth hormone releasing factor inhibits food intake in neonatal chicks. *Neurosci Lett* 301:123-126.
256. **Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillon WS, Ghatei MA, Bloom SR** 2001 Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5992.
257. **Wang L, Saint-Pierre DH, Tache Y** 2002 Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 325:47-51.
258. **Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I** 2001 Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 50:2438-2443.
259. **Hewson AK, Dickson SL** 2000 Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 12:1047-1049.

260. **Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S** 2001 Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 280:904-907.
261. **Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2001 Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50:227-232.
262. **Traebert M, Riediger T, Whitebread S, Scharrer E, Schmid HA** 2002 Ghrelin acts on leptin-responsive neurones in the rat arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol* 14:580-586.
263. **Tamura H, Kamegai J, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Oikawa S** 2002 Ghrelin stimulates GH but not food intake in arcuate nucleus ablated rats. *Endocrinology* 143:3268-3275.
264. **Hewson AK, Tung LY, Connell DW, Tookman L, Dickson SL** 2002 The rat arcuate nucleus integrates peripheral signals provided by leptin, insulin, and a ghrelin mimetic. *Diabetes* 51:3412-3419.
265. **Bagnasco M, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP** 2002 Evidence for the existence of distinct central appetite, energy expenditure, and ghrelin stimulation pathways as revealed by hypothalamic site-specific leptin gene therapy. *Endocrinology* 143:4409-4421.
266. **Bagnasco M, Tulipano G, Melis MR, Argiolas A, Cocchi D, Muller EE** 2003 Endogenous ghrelin is an orexigenic peptide acting in the arcuate nucleus in response to fasting. *Regul Pept* 111:161-167.
267. **Seoane LM, Lopez M, Tovar S, Casanueva FF, Senaris R, Dieguez C** 2003 Agouti-related peptide, neuropeptide Y, and somatostatin-producing neurons are targets for ghrelin actions in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 144:544-551.
268. **Kohno D, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, Yada T** 2003 Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* 52:948-956.

269. **Riediger T, Traebert M, Schmid HA, Scheel C, Lutz TA, Scharrer E** 2003 Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 341:151-155.
270. **Guan JL, Wang QP, Kageyama H, Takenoya F, Kita T, Matsuoka T, Funahashi H, Shioda S** 2003 Synaptic interactions between ghrelin- and neuropeptide Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Peptides* 24:1921-1928.
271. **Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R, Moncrieffe M, Thabet K, Cox HJ, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW** 2004 Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8227-8232.
272. **Riediger T, Bothe C, Becskei C, Lutz TA** 2004 Peptide YY directly inhibits ghrelin-activated neurons of the arcuate nucleus and reverses fasting-induced c-Fos expression. *Neuroendocrinology* 79:317-326.
273. **Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Stengel A, Bae HG, Andresen V, van der Voort IR, Veh RW, Werner CR, Klapp BF, Wiedenmann B, Wang L, Tache Y, Monnikes H** 2005 CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R751-758.
274. **Holm AM, Johansen PB, Ahnfelt-Ronne I, Romer J** 2004 Adipogenic and orexigenic effects of the ghrelin-receptor ligand tabimorelin are diminished in leptin-signalling-deficient ZDF rats. *Eur J Endocrinol* 150:893-904.
275. **Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R, Chapelot D** 2004 Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E297-304.
276. **Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S** 2003 Hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway activated by a reduction in circulating leptin, but not by an increase in circulating ghrelin, contributes to hyperphagia associated with triiodothyronine-induced thyrotoxicosis. *Neuroendocrinology* 78:321-330.
277. **Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Oikawa S** 2001 Regulation of the ghrelin gene: growth hormone-releasing hormone upregulates ghrelin mRNA in the pituitary. *Endocrinology* 142:4154-4157.

278. **Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S** 2001 Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* 281:1220-1225.
279. **Meier JJ, Gallwitz B, Schmidt WE, Nauck MA** 2002 Glucagon-like peptide 1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol* 440:269-279.
280. **Dakin CL, Small CJ, Batterham RL, Neary NM, Cohen MA, Patterson M, Ghatei MA, Bloom SR** 2004 Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats. *Endocrinology* 145:2687-2695.
281. **Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Batterham RL, Park A, Patterson M, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR** 2003 Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4696-4701.
282. **Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR** 2003 Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med* 349:941-948.
283. **Wang L, Martinez V, Rivier JE, Tache Y** 2001 Peripheral urocortin inhibits gastric emptying and food intake in mice: differential role of CRF receptor 2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:R1401-1410.
284. **Davis ME, Pemberton CJ, Yandle TG, Lainchbury JG, Rademaker MT, Nicholls MG, Frampton CM, Richards AM** 2004 Urocortin-1 infusion in normal humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1402-1409.
285. **Morley JE, Alshaher MM, Farr SA, Flood JF, Kumar VB** 1999 Leptin and neuropeptide Y (NPY) modulate nitric oxide synthase: further evidence for a role of nitric oxide in feeding. *Peptides* 20:595-600.
286. **Gaskin FS, Farr SA, Banks WA, Kumar VB, Morley JE** 2003 Ghrelin-induced feeding is dependent on nitric oxide. *Peptides* 24:913-918.
287. **Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS** 2001 A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714-1719.

288. **Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ** 2002 Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 346:1623-1630.
289. **Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C** 2001 Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24:RC19-21.
290. **Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, Weigle DS** 2004 Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1319-1324.
291. **Beck B, Musse N, Stricker-Krongrad A** 2002 Ghrelin, macronutrient intake and dietary preferences in long-evans rats. *Biochem Biophys Res Commun* 292:1031-1035.
292. **Muller AF, Lamberts SW, Janssen JA, Hofland LJ, Koetsveld PV, Bidlingmaier M, Strasburger CJ, Ghigo E, Van der Lely AJ** 2002 Ghrelin drives GH secretion during fasting in man. *Eur J Endocrinol* 146:203-207.
293. **Williams DL, Grill HJ, Cummings DE, Kaplan JM** 2003 Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology* 144:5184-5187.
294. **Overduin J, Frayo RS, Grill HJ, Kaplan JM, Cummings DE** 2005 Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation. *Endocrinology* 146:845-850.
295. **Greenman Y, Golani N, Gilad S, Yaron M, Limor R, Stern N** 2004 Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60:382-388.
296. **Havel PJ** 2005 Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev* 63:133-157.
297. **Torsello A, Scibona B, Leo G, Bresciani E, Avallone R, Bulgarelli I, Luoni M, Zoli M, Rindi G, Cocchi D, Locatelli V** 2003 Ontogeny and tissue-specific regulation of ghrelin mRNA expression suggest that ghrelin is primarily involved in the control of extraendocrine functions in the rat. *Neuroendocrinology* 77:91-99.

298. **Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML** 2001 Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50:707-709.
299. **Chan JL, Bullen J, Lee JH, Yiannakouris N, Mantzoros CS** 2004 Ghrelin levels are not regulated by recombinant leptin administration and/or three days of fasting in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 89:335-343.
300. **Hansen TK, Dall R, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Christiansen JS, Jorgensen JO** 2002 Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 56:203-206.
301. **Ravussin E, Tschop M, Morales S, Bouchard C, Heiman ML** 2001 Plasma ghrelin concentration and energy balance: overfeeding and negative energy balance studies in twins. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4547-4551.
302. **Wisse BE, Frayo RS, Schwartz MW, Cummings DE** 2001 Reversal of cancer anorexia by blockade of central melanocortin receptors in rats. *Endocrinology* 142:3292-3301.
303. **Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Date Y, Nakazato M, Okumura H, Hosoda H, Shimizu W, Yamagishi M, Oya H, Koh H, Yutani C, Kangawa K** 2001 Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation* 104:2034-2038.
304. **Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, Tschop M** 2001 Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 145:669-673.
305. **Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T, Imazu M, Okumura H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Kohno N** 2003 Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res* 9:774-778.
306. **Tacke F, Brabant G, Kruck E, Horn R, Schoffski P, Hecker H, Manns MP, Trautwein C** 2003 Ghrelin in chronic liver disease. *J Hepatol* 38:447-454.
307. **Leidy HJ, Gardner JK, Frye BR, Snook ML, Schuchert MK, Richard EL, Williams NI** 2004 Circulating ghrelin is sensitive to changes in body weight during

- a diet and exercise program in normal-weight young women. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2659-2664.
308. **Foster-Schubert KE, McTiernan A, Frayo RS, Schwartz RS, Rajan KB, Yasui Y, Tworoger SS, Cummings DE** 2005 Human plasma ghrelin levels increase during a one-year exercise program. *J Clin Endocrinol Metab* 90:820-825.
 309. **Fruhbeck G, Diez Caballero A, Gil MJ** 2004 Fundus functionality and ghrelin concentrations after bariatric surgery. *N Engl J Med* 350:308-309.
 310. **Geloneze B, Tambascia MA, Pilla VF, Geloneze SR, Repetto EM, Pareja JC** 2003 Ghrelin: a gut-brain hormone: effect of gastric bypass surgery. *Obes Surg* 13:17-22.
 311. **Leonetti F, Silecchia G, Iacobellis G, Ribaud MC, Zappaterreno A, Tiberti C, Iannucci CV, Perrotta N, Bacci V, Basso MS, Basso N, Di Mario U** 2003 Different plasma ghrelin levels after laparoscopic gastric bypass and adjustable gastric banding in morbid obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4227-4231.
 312. **Tritos NA, Mun E, Bertkau A, Grayson R, Maratos-Flier E, Goldfine A** 2003 Serum ghrelin levels in response to glucose load in obese subjects post-gastric bypass surgery. *Obes Res* 11:919-924.
 313. **Faraj M, Havel PJ, Phelis S, Blank D, Sniderman AD, Cianflone K** 2003 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* 88:1594-1602.
 314. **Stoekli R, Chanda R, Langer I, Keller U** 2004 Changes of body weight and plasma ghrelin levels after gastric banding and gastric bypass. *Obes Res* 12:346-350.
 315. **Holdstock C, Engstrom BE, Ohrvall M, Lind L, Sundbom M, Karlsson FA** 2003 Ghrelin and adipose tissue regulatory peptides: effect of gastric bypass surgery in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3177-3183.
 316. **Robertson MD, Henderson RA, Vist GE, Rumsey RD** 2004 Plasma ghrelin response following a period of acute overfeeding in normal weight men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:727-733.

317. **Moesgaard SG, Ahren B, Carr RD, Gram DX, Brand CL, Sundler F** 2004 Effects of high-fat feeding and fasting on ghrelin expression in the mouse stomach. *Regul Pept* 120:261-267.
318. **Goldstone AP, Thomas EL, Brynes AE, Castroman G, Edwards R, Ghatei MA, Frost G, Holland AJ, Grossman AB, Korbonits M, Bloom SR, Bell JD** 2004 Elevated fasting plasma ghrelin in prader-willi syndrome adults is not solely explained by their reduced visceral adiposity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1718-1726.
319. **Flanagan DE, Evans ML, Monsod TP, Rife F, Heptulla RA, Tamborlane WV, Sherwin RS** 2003 The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E313-316.
320. **McCowen KC, Maykel JA, Bistrrian BR, Ling PR** 2002 Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *J Endocrinol* 175:R7-11.
321. **Mohlig M, Spranger J, Otto B, Ristow M, Tschop M, Pfeiffer AF** 2002 Euglycemic hyperinsulinemia, but not lipid infusion, decreases circulating ghrelin levels in humans. *J Endocrinol Invest* 25:RC36-38.
322. **Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E, Boyadjian R** 2002 Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3997-4000.
323. **Poykko S, Ukkola O, Kauma H, Savolainen MJ, Kesaniemi YA** 2003 Ghrelin Arg51Gln mutation is a risk factor for Type 2 diabetes and hypertension in a random sample of middle-aged subjects. *Diabetologia* 46:455-458.
324. **Shiia T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S** 2002 Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 87:240-244.
325. **Cappiello V, Ronchi C, Morpurgo PS, Epaminonda P, Arosio M, Beck-Peccoz P, Spada A** 2002 Circulating ghrelin levels in basal conditions and during glucose tolerance test in acromegalic patients. *Eur J Endocrinol* 147:189-194.

326. **Pagotto U, Gambineri A, Vicennati V, Heiman ML, Tschop M, Pasquali R** 2002 Plasma ghrelin, obesity, and the polycystic ovary syndrome: correlation with insulin resistance and androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5625-5629.
327. **le Roux CW, Patterson M, Vincent RP, Hunt C, Ghatei MA, Bloom SR** 2005 Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal calorie content in normal-weight but not obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1068-1071.
328. **Katsuki A, Urakawa H, Gabazza EC, Murashima S, Nakatani K, Togashi K, Yano Y, Adachi Y, Sumida Y** 2004 Circulating levels of active ghrelin is associated with abdominal adiposity, hyperinsulinemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 151:573-577.
329. **Paik KH, Choe YH, Park WH, Oh YJ, Kim AH, Chu SH, Kim SW, Kwon EK, Han SJ, Shon WY, Jin DK** 2006 Suppression of Acylated Ghrelin during Oral Glucose Tolerance Test Is Correlated with Whole-Body Insulin Sensitivity in Children with Prader-Willi Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1876-1881.
330. **Salehi A, Dornonville de la Cour C, Hakanson R, Lundquist I** 2004 Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. *Regul Pept* 118:143-150.
331. **van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E** 2004 Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25:426-457.
332. **Gauna C, Meyler FM, Janssen JA, Delhanty PJ, Aribat T, van Koetsveld P, Hofland LJ, Broglio F, Ghigo E, van der Lely AJ** 2004 Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5035-5042.
333. **Gruendel S, Garcia AL, Otto B, Mueller C, Steiniger J, Weickert MO, Speth M, Katz N, Koebnick C** 2006 Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fiber and polyphenols enhances lipid oxidation and lowers postprandial acylated ghrelin in humans. *J Nutr* 136:1533-1538.
334. **Paul DR, Kramer M, Rhodes DG, Rumpler WV** 2005 Preprandial ghrelin is not affected by macronutrient intake, energy intake or energy expenditure. *J Negat Results Biomed* 4:2.

335. **Wren AM, Small, C.J., Thomas, E.L., Abbott, C.R., Gaheti, M.A., Bell, J.D., Bloom S.R.** 2004 Continuous subcutaneous administration of ghrelin results in accumulation of adipose tissue, independent of hyperphagia or body weight gain. *Endocrine Abstracts Spring*. OC35:
336. **Kim MS, Yoon CY, Jang PG, Park YJ, Shin CS, Park HS, Ryu JW, Pak YK, Park JY, Lee KU, Kim SY, Lee HK, Kim YB, Park KS** 2004 The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 18:2291-2301.
337. **Choi K, Roh SG, Hong YH, Shrestha YB, Hishikawa D, Chen C, Kojima M, Kangawa K, Sasaki S** 2003 The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology* 144:754-759.
338. **Kola B, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, Garcia EA, Mitchell SE, Williams LM, Hawley SA, Hardie DG, Grossman AB, Korbonits M** 2005 Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280:25196-25201.
339. **Nanzer AM, Khalaf S, Mozdil AM, Fowkes RC, Patel MV, Burrin JM, Grossman AB, Korbonits M** 2004 Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Endocrinol* 151:233-240.
340. **Broglia F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E** 2001 Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5083-5086.
341. **Kelley KW, Bluthé RM, Dantzer R, Zhou JH, Shen WH, Johnson RW, Broussard SR** 2003 Cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun* 17 Suppl 1:S112-118.
342. **Xia Q, Pang W, Pan H, Zheng Y, Kang JS, Zhu SG** 2004 Effects of ghrelin on the proliferation and secretion of splenic T lymphocytes in mice. *Regul Pept* 122:173-178.
343. **Basa NR, Wang L, Arteaga JR, Heber D, Livingston EH, Tache Y** 2003 Bacterial lipopolysaccharide shifts fasted plasma ghrelin to postprandial levels in rats. *Neurosci Lett* 343:25-28.

344. **Chang L, Du JB, Gao LR, Pang YZ, Tang CS** 2003 Effect of ghrelin on septic shock in rats. *Acta Pharmacol Sin* 24:45-49.
345. **Chang L, Zhao J, Yang J, Zhang Z, Du J, Tang C** 2003 Therapeutic effects of ghrelin on endotoxic shock in rats. *Eur J Pharmacol* 473:171-176.
346. **De Winter BY, De Man JG, Seerden TC, Depoortere I, Herman AG, Peeters TL, Pelckmans PA** 2004 Effect of ghrelin and growth hormone-releasing peptide 6 on septic ileus in mice. *Neurogastroenterol Motil* 16:439-446.
347. **Li WG, Gavrilu D, Liu X, Wang L, Gunnlaugsson S, Stoll LL, McCormick ML, Sigmund CD, Tang C, Weintraub NL** 2004 Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation* 109:2221-2226.
348. **Granado M, Priego T, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A** 2005 Ghrelin receptor agonist GHRP-2 prevents arthritis-induced increase in E3 ubiquitin-ligating enzymes MuRF1 and MAFbx gene expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E1007-1014.
349. **Granado M, Priego T, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A** 2005 Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E486-492.
350. **Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H, Takeda S, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kangawa K, Nagata K, Kojima M** 2005 Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res* 20:790-798.
351. **Luo FM, Liu XJ, Li SQ, Wang ZL, Liu CT, Yuan YM** 2005 Circulating ghrelin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Nutrition* 21:793-798.
352. **Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, Rio MC, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT** 2001 In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 73:54-61.
353. **Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2000 Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4908-4911.

354. **Seoane LM, Tovar S, Baldelli R, Arvat E, Ghigo E, Casanueva FF, Dieguez C** 2000 Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats. *Eur J Endocrinol* 143:R7-9.
355. **Peino R, Baldelli R, Rodriguez-Garcia J, Rodriguez-Segade S, Kojima M, Kangawa K, Arvat E, Ghigo E, Dieguez C, Casanueva FF** 2000 Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *Eur J Endocrinol* 143:R11-14.
356. **Arvat E, Di Vito L, Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E** 2000 Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *J Endocrinol Invest* 23:493-495.
357. **Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E** 2001 Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1169-1174.
358. **Hataya Y, Akamizu T, Takaya K, Kanamoto N, Ariyasu H, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2001 A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4552.
359. **Badger TM, Millard WJ, McCormick GF, Bowers CY, Martin JB** 1984 The effects of growth hormone (GH)-releasing peptides on GH secretion in perfused pituitary cells of adult male rats. *Endocrinology* 115:1432-1438.
360. **Tomasetto C, Karam SM, Ribieras S, Masson R, Lefebvre O, Staub A, Alexander G, Chenard MP, Rio MC** 2000 Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: the motilin-related peptide. *Gastroenterology* 119:395-405.
361. **Binn M, Albert C, Gougeon A, Maerki H, Coulie B, Lemoyne M, Rabasa Lhoret R, Tomasetto C, Poitras P** 2006 Ghrelin gastrokinetic action in patients with neurogenic gastroparesis. *Peptides* 27:1603-1606.
362. **Poitras P, Polvino WJ, Rocheleau B** 2005 Gastrokinetic effect of ghrelin analog RC-1139 in the rat. Effect on post-operative and on morphine induced ileus. *Peptides* 26:1598-1601.

363. **Tomasetto C, Wendling C, Rio MC, Poitras P** 2001 Identification of cDNA encoding motilin related peptide/ghrelin precursor from dog fundus. *Peptides* 22:2055-2059.
364. **Trudel L, Bouin M, Tomasetto C, Eberling P, St-Pierre S, Bannon P, L'Heureux MC, Poitras P** 2003 Two new peptides to improve post-operative gastric ileus in dog. *Peptides* 24:531-534.
365. **Trudel L, Tomasetto C, Rio MC, Bouin M, Plourde V, Eberling P, Poitras P** 2002 Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G948-952.
366. **St-Pierre DH, Wang L, Tache Y** 2003 Ghrelin: a novel player in the gut-brain regulation of growth hormone and energy balance. *News Physiol Sci* 18:242-246.
367. **Inui A, Asakawa A, Bowers CY, Mantovani G, Laviano A, Meguid MM, Fujimiya M** 2004 Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *Faseb J* 18:439-456.
368. **Egido EM, Rodriguez-Gallardo J, Silvestre RA, Marco J** 2002 Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *Eur J Endocrinol* 146:241-244.
369. **Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH, Jr.** 2002 Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 143:185-190.
370. **Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Fujimiya M, Katsuura G, Makino S, Fujino MA, Kasuga M** 2001 A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. *Neuroendocrinology* 74:143-147.
371. **Nagaya N, Miyatake K, Uematsu M, Oya H, Shimizu W, Hosoda H, Kojima M, Nakanishi N, Mori H, Kangawa K** 2001 Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5854-5859.
372. **Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Ikeda Y, Yoshihara F, Shimizu W, Hosoda H, Hirota Y, Ishida H, Mori H, Kangawa K** 2001 Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 104:1430-1435.

373. **King MK, Gay DM, Pan LC, McElmurray JH, 3rd, Hendrick JW, Pirie C, Morrison A, Ding C, Mukherjee R, Spinale FG** 2001 Treatment with a growth hormone secretagogue in a model of developing heart failure: effects on ventricular and myocyte function. *Circulation* 103:308-313.
374. **Makino Y, Hosoda H, Shibata K, Makino I, Kojima M, Kangawa K, Kawarabayashi T** 2002 Alteration of plasma ghrelin levels associated with the blood pressure in pregnancy. *Hypertension* 39:781-784.
375. **Cummings DE, Foster-Schubert KE, Overduin J** 2005 Ghrelin and energy balance: focus on current controversies. *Curr Drug Targets* 6:153-169.
376. **Poppitt SD, Leahy FE, Keogh GF, Wang Y, Mulvey TB, Stojkovic M, Chan YK, Choong YS, McArdle BH, Cooper GJ** 2006 Effect of high-fat meals and fatty acid saturation on postprandial levels of the hormones ghrelin and leptin in healthy men. *Eur J Clin Nutr* 60:77-84.
377. **Kellokoski E, Poykko SM, Karjalainen AH, Ukkola O, Heikkinen J, Kesaniemi YA, Horkko S** 2005 Estrogen replacement therapy increases plasma ghrelin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2954-2963.
378. **Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al.** 1995 Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1:1155-1161.
379. **Ma Z, Gingerich RL, Santiago JV, Klein S, Smith CH, Landt M** 1996 Radioimmunoassay of leptin in human plasma. *Clin Chem* 42:942-946.
380. **Fernandez-Real JM, Pugeat M, Lopez-Bermejo A, Bornet H, Ricart W** 2005 Corticosteroid-binding globulin affects the relationship between circulating adiponectin and cortisol in men and women. *Metabolism* 54:584-589.
381. **Sapin R, Le Galudec V, Gasser F, Pinget M, Grucker D** 2001 Elecsys insulin assay: free insulin determination and the absence of cross-reactivity with insulin lispro. *Clin Chem* 47:602-605.
382. **Schechtman G, Patsches M, Sasse EA** 1996 Variability in cholesterol measurements: comparison of calculated and direct LDL cholesterol determinations. *Clin Chem* 42:732-737.

383. **Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC** 1985 Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-419.
384. **Dominici R, Luraschi P, Franzini C** 2004 Measurement of C-reactive protein: two high sensitivity methods compared. *J Clin Lab Anal* 18:280-284.
385. **Polyak SJ, Khabar KS, Rezeiq M, Gretch DR** 2001 Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. *J Virol* 75:6209-6211.
386. **Chu NF, Shen MH, Wu DM, Shieh SM** 2002 Plasma TNF-R1 and insulin concentrations in relation to leptin levels among normal and overweight children. *Clin Biochem* 35:287-292.
387. **Taylor HL, Jacobs DR, Jr., Schucker B, Knudsen J, Leon AS, Debacker G** 1978 A questionnaire for the assessment of leisure time physical activities. *J Chronic Dis* 31:741-755.
388. **Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC, Irwin ML, Swartz AM, Strath SJ, O'Brien WL, Bassett DR, Jr., Schmitz KH, Emplaincourt PO, Jacobs DR, Jr., Leon AS** 2000 Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med Sci Sports Exerc* 32:S498-504.
389. **Westerterp KR** 1999 Physical activity assessment with accelerometers. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 3:S45-49.
390. **Nichols JF, Morgan CG, Sarkin JA, Sallis JF, Calfas KJ** 1999 Validity, reliability, and calibration of the Tritrac accelerometer as a measure of physical activity. *Med Sci Sports Exerc* 31:908-912.
391. 2001b Canadian Nutrient File. Health Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
392. **Stunkard AJ, Messick S** 1985 The three-factor eating questionnaire to measure dietary restraint, disinhibition and hunger. *J Psychosom Res* 29:71-83.
393. **Laessle RG, Tuschl RJ, Kotthaus BC, Pirke KM** 1989 A comparison of the validity of three scales for the assessment of dietary restraint. *J Abnorm Psychol* 98:504-507.
394. **Weir JB** 1949 New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol* 109:1-9.

395. **St-Pierre DH, Karelis AD, Cianflone K, Conus F, Mignault D, Rabasa-Lhoret R, St-Onge M, Tremblay-Lebeau A, Poehlman ET** 2004 Relationship between ghrelin and energy expenditure in healthy young women. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5993-5997.
396. **St-Pierre DH, Faraj M, Karelis AD, Conus F, Henry JF, St-Onge M, Tremblay-Lebeau A, Cianflone K, Rabasa-Lhoret R** 2006 Lifestyle behaviours and components of energy balance as independent predictors of ghrelin and adiponectin in young non-obese women. *Diabetes Metab* 32:131-139.
397. **Marzullo P, Verti B, Savia G, Walker GE, Guzzaloni G, Tagliaferri M, Di Blasio A, Liuzzi A** 2004 The relationship between active ghrelin levels and human obesity involves alterations in resting energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab* 89:936-939.
398. **Riis AL, Hansen TK, Moller N, Weeke J, Jorgensen JO** 2003 Hyperthyroidism is associated with suppressed circulating ghrelin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 88:853-857.
399. **Rodriguez Ayala E, Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Lindholm B, Nordfors L, Stenvinkel P** 2004 Associations between plasma ghrelin levels and body composition in end-stage renal disease: a longitudinal study. *Nephrol Dial Transplant* 19:421-426.
400. **Malik IA, English PJ, Ghatgei MA, Bloom SR, MacFarlane IA, Wilding JP** 2004 The relationship of ghrelin to biochemical and anthropometric markers of adult growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60:137-141.
401. **Bunt JC, Salbe AD, Tschöp MH, DelParigi A, Daychild P, Tataranni PA** 2003 Cross-sectional and prospective relationships of fasting plasma ghrelin concentrations with anthropometric measures in pima Indian children. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3756-3761.
402. **Ravussin E** 1995 Low resting metabolic rate as a risk factor for weight gain: role of the sympathetic nervous system. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19 Suppl 7:S8-S9.
403. **Poehlman ET** 1993 Regulation of energy expenditure in aging humans. *J Am Geriatr Soc* 41:552-559.

404. **Armellini F, Zamboni M, Mino A, Bissoli L, Micciolo R, Bosello O** 2000 Postabsorptive resting metabolic rate and thermic effect of food in relation to body composition and adipose tissue distribution. *Metabolism* 49:6-10.
405. **Tran KM, Johnson RK, Soutanakis RP, Matthews DE** 2000 In-person vs telephone-administered multiple-pass 24-hour recalls in women: validation with doubly labeled water. *J Am Diet Assoc* 100:777-783.
406. **Gale SM, Castracane VD, Mantzoros CS** 2004 Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *J Nutr* 134:295-298.
407. **Havel PJ** 2001 Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)* 226:963-977.
408. **Speakman JR, Selman C** 2003 Physical activity and resting metabolic rate. *Proc Nutr Soc* 62:621-634.
409. **Purnell JQ, Weigle DS, Breen P, Cummings DE** 2003 Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5747-5752.
410. **Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, Youngren JF, Havel PJ, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA** 2002 Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 51:1884-1888.
411. **Pajvani UB, Scherer PE** 2003 Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Curr Diab Rep* 3:207-213.
412. **Matsubara M, Maruoka S, Katayose S** 2002 Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2764-2769.
413. **Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y** 2000 Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102:1296-1301.

414. **Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J** 2002 Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 360:57-58.
415. **Pellme F, Smith U, Funahashi T, Matsuzawa Y, Brekke H, Wiklund O, Taskinen MR, Jansson PA** 2003 Circulating adiponectin levels are reduced in nonobese but insulin-resistant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 52:1182-1186.
416. **Cruz M, Garcia-Macedo R, Garcia-Valerio Y, Gutierrez M, Medina-Navarro R, Duran G, Wachter N, Kumate J** 2004 Low adiponectin levels predict type 2 diabetes in Mexican children. *Diabetes Care* 27:1451-1453.
417. **Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S** 1999 Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 341:879-884.
418. **Ren J** 2004 Leptin and hyperleptinemia - from friend to foe for cardiovascular function. *J Endocrinol* 181:1-10.
419. **Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM** 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-546.
420. **Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ** 1997 Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389:374-377.
421. **Ceddia RB, William WN, Jr., Lima FB, Curi R** 1998 Leptin inhibits insulin-stimulated incorporation of glucose into lipids and stimulates glucose decarboxylation in isolated rat adipocytes. *J Endocrinol* 158:R7-9.
422. **Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV** 1996 Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 45:1455-1462.
423. **Ikezaki A, Hosoda H, Ito K, Iwama S, Miura N, Matsuoka H, Kondo C, Kojima M, Kangawa K, Sugihara S** 2002 Fasting plasma ghrelin levels are negatively correlated with insulin resistance and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents. *Diabetes* 51:3408-3411.
424. **McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, Cummings DE** 2004 Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1630-1635.

425. **Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT** 2002 Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 143:1353-1361.
426. **Al Awar R, Obeid O, Hwalla N, Azar S** 2005 Postprandial acylated ghrelin status following fat and protein manipulation of meals in healthy young women. *Clin Sci (Lond)* 109:405-411.
427. **Anderwald C, Brabant G, Bernroider E, Horn R, Brehm A, Waldhausl W, Roden M** 2003 Insulin-dependent modulation of plasma ghrelin and leptin concentrations is less pronounced in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 52:1792-1798.
428. **Leonetti F, Iacobellis G, Ribaud MC, Zappaterreno A, Tiberti C, Iannucci CV, Vecci E, Di Mario U** 2004 Acute insulin infusion decreases plasma ghrelin levels in uncomplicated obesity. *Regul Pept* 122:179-183.
429. **Karelis AD, Faraj M, Bastard JP, St-Pierre DH, Brochu M, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R** 2005 The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4145-4150.
430. **Borst SE** 2004 The role of TNF-alpha in insulin resistance. *Endocrine* 23:177-182.
431. **Vigouroux C, Maachi M, Nguyen TH, Coussieu C, Gharakhanian S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Shimomura I, Rozenbaum W, Capeau J, Bastard JP** 2003 Serum adipocytokines are related to lipodystrophy and metabolic disorders in HIV-infected men under antiretroviral therapy. *Aids* 17:1503-1511.
432. **Konturek PC, Brzozowski T, Pajdo R, Nikiforuk A, Kwiecien S, Harsch I, Drozdowicz D, Hahn EG, Konturek SJ** 2004 Ghrelin-a new gastroprotective factor in gastric mucosa. *J Physiol Pharmacol* 55:325-336.
433. **Konturek PC, Brzozowski T, Walter B, Burnat G, Hess T, Hahn EG, Konturek SJ** 2006 Ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury involves an activation of sensory afferent nerves and hyperemia mediated by nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 536:171-181.
434. **Wu R, Dong W, Zhou M, Cui X, Hank Simms H, Wang P** 2005 Ghrelin improves tissue perfusion in severe sepsis via downregulation of endothelin-1. *Cardiovasc Res* 68:318-326.

435. **Maruna P, Gurlich R, Frasko R, Rosicka M** 2005 Ghrelin and leptin elevation in postoperative intra-abdominal sepsis. *Eur Surg Res* 37:354-359.
436. **Peracchi M, Bardella MT, Caprioli F, Massironi S, Conte D, Valenti L, Ronchi C, Beck-Peccoz P, Arosio M, Piodi L** 2006 Circulating ghrelin levels in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 55:432-433.
437. **Charuruks N, Laohajinda B, Rujiwanitgun S, Chaiworaporn M** 2005 Reference value for C-reactive protein and its distribution pattern in thai adults. *Circ J* 69:339-344.
438. **Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, Price N, Dinges DF, Mullington JM** 2001 Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects. *Clin Chem* 47:426-430.
439. **Johansson A, Ahren B, Forsberg H, Olsson T** 2002 Testosterone and diurnal rhythmicity of leptin, TNF-alpha and TNF-II receptor in insulin-resistant myotonic dystrophy patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:1386-1392.
440. **Jellema A, Plat J, Mensink RP** 2004 Weight reduction, but not a moderate intake of fish oil, lowers concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state. *Eur J Clin Invest* 34:766-773.
441. **Twickler TB, Dallinga-Thie GM, Visseren FL, de Vries WR, Erkelens DW, Koppeschaar HP** 2003 Induction of postprandial inflammatory response in adult onset growth hormone deficiency is related to plasma remnant-like particle-cholesterol concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1228-1233.
442. **Nappo F, Esposito K, Cioffi M, Giugliano G, Molinari AM, Paolisso G, Marfella R, Giugliano D** 2002 Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *J Am Coll Cardiol* 39:1145-1150.
443. **Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N** 2003 C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 107:391-397.
444. **Tracy RP, Lemaitre RN, Psaty BM, Ives DG, Evans RW, Cushman M, Meilahn EN, Kuller LH** 1997 Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly. Results from the Cardiovascular Health Study

- and the Rural Health Promotion Project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1121-1127.
445. **Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, Hutchinson WL, Pepys MB** 1999 C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 99:237-242.
446. **Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Gallimore JR, Pepys MB** 2000 Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *Bmj* 321:199-204.
447. **Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM** 2001 C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama* 286:327-334.
448. **Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, Gaw A, Ford I, Lowe GD, O'Reilly DS, Packard CJ, Sattar N** 2002 C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes* 51:1596-1600.
449. **Halle M, Berg A, Northoff H, Keul J** 1998 Importance of TNF-alpha and leptin in obesity and insulin resistance: a hypothesis on the impact of physical exercise. *Exerc Immunol Rev* 4:77-94.
450. **Winkler G, Lakatos P, Salamon F, Nagy Z, Speer G, Kovacs M, Harnos G, Dworak O, Cseh K** 1999 Elevated serum TNF-alpha level as a link between endothelial dysfunction and insulin resistance in normotensive obese patients. *Diabet Med* 16:207-211.
451. **Chu NF, Spiegelman D, Hotamisligil GS, Rifai N, Stampfer M, Rimm EB** 2001 Plasma insulin, leptin, and soluble TNF receptors levels in relation to obesity-related atherogenic and thrombogenic cardiovascular disease risk factors among men. *Atherosclerosis* 157:495-503.
452. **Faraj M, Messier L, Bastard JP, Tardif A, Godbout A, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R** 2006 Apolipoprotein B: a predictor of inflammatory status in postmenopausal overweight and obese women. *Diabetologia* 49:1637-1646.

453. **Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Vidal H, Hainque B** 2000 Variations in plasma soluble tumour necrosis factor receptors after diet-induced weight loss in obesity. *Diabetes Obes Metab* 2:323-325.
454. **Ryan AS, Nicklas BJ** 2004 Reductions in plasma cytokine levels with weight loss improve insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *Diabetes Care* 27:1699-1705.
455. **Pennica D, Kohr WJ, Fendly BM, Shire SJ, Raab HE, Borchardt PE, Lewis M, Goeddel DV** 1992 Characterization of a recombinant extracellular domain of the type 1 tumor necrosis factor receptor: evidence for tumor necrosis factor-alpha induced receptor aggregation. *Biochemistry* 31:1134-1141.
456. **Karelis AD, Brochu M, Rabasa-Lhoret R** 2004 Can we identify metabolically healthy but obese individuals (MHO)? *Diabetes Metab* 30:569-572.
457. **Karelis AD, St-Pierre DH, Conus F, Rabasa-Lhoret R, Poehlman ET** 2004 Metabolic and body composition factors in subgroups of obesity: what do we know? *J Clin Endocrinol Metab* 89:2569-2575.
458. **Iacobellis G, Ribaud MC, Zappaterreno A, Iannucci CV, Leonetti F** 2005 Prevalence of uncomplicated obesity in an Italian obese population. *Obes Res* 13:1116-1122.
459. **Dvorak RV, DeNino WF, Ades PA, Poehlman ET** 1999 Phenotypic characteristics associated with insulin resistance in metabolically obese but normal-weight young women. *Diabetes* 48:2210-2214.
460. **Filate WA, Johansen HL, Kennedy CC, Tu JV** 2003 Regional variations in cardiovascular mortality in Canada. *Can J Cardiol* 19:1241-1248.
461. **Ukkola O** 2005 Ghrelin and the metabolic balance. *J Endocrinol Invest* 28:849-852.
462. **Broglio F, Prodam F, Me E, Riganti F, Lucatello B, Granata R, Benso A, Muccioli G, Ghigo E** 2005 Ghrelin: endocrine, metabolic and cardiovascular actions. *J Endocrinol Invest* 28:23-25.
463. **Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB** 2004 Ghrelin--a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 25:27-68.
464. **Dixit VD, Taub DD** 2005 Ghrelin and immunity: a young player in an old field. *Exp Gerontol* 40:900-910.

465. **Pekic S, Pesko P, Djurovic M, Miljic D, Doknic M, Glodic J, Dieguez C, Casanueva FF, Popovic V** 2006 Plasma ghrelin levels of gastrectomized and vagotomized patients are not affected by glucose administration. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64:684-688.
466. **Tannous Dit El Khoury D, Obeid O, Azar ST, Hwalla N** 2006 Variations in Postprandial Ghrelin Status following Ingestion of High-Carbohydrate, High-Fat, and High-Protein Meals in Males. *Ann Nutr Metab* 50:260-269.
467. **Blom WA, Lluch A, Stafleu A, Vinoy S, Holst JJ, Schaafsma G, Hendriks HF** 2006 Effect of a high-protein breakfast on the postprandial ghrelin response. *Am J Clin Nutr* 83:211-220.
468. **Moran LJ, Luscombe-Marsh ND, Noakes M, Wittert GA, Keogh JB, Clifton PM** 2005 The satiating effect of dietary protein is unrelated to postprandial ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5205-5211.
469. **Blom WA, Stafleu A, de Graaf C, Kok FJ, Schaafsma G, Hendriks HF** 2005 Ghrelin response to carbohydrate-enriched breakfast is related to insulin. *Am J Clin Nutr* 81:367-375.
470. **Schaller G, Schmidt A, Pleiner J, Woloszczuk W, Wolzt M, Luger A** 2003 Plasma ghrelin concentrations are not regulated by glucose or insulin: a double-blind, placebo-controlled crossover clamp study. *Diabetes* 52:16-20.
471. **Erdmann J, Leibl M, Wagenpfeil S, Lippl F, Schusdziarra V** 2006 Ghrelin response to protein and carbohydrate meals in relation to food intake and glycerol levels in obese subjects. *Regul Pept* 135:23-29.
472. **Erdmann J, Lippl F, Wagenpfeil S, Schusdziarra V** 2005 Differential association of basal and postprandial plasma ghrelin with leptin, insulin, and type 2 diabetes. *Diabetes* 54:1371-1378.
473. **Heath RB, Jones R, Frayn KN, Robertson MD** 2004 Vagal stimulation exaggerates the inhibitory ghrelin response to oral fat in humans. *J Endocrinol* 180:273-281.
474. **Poykko SM, Kellokoski E, Horkko S, Kauma H, Kesaniemi YA, Ukkola O** 2003 Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* 52:2546-2553.

475. **Ghigo E, Broglio F, Arvat E, Maccario M, Papotti M, Muccioli G** 2005 Ghrelin: more than a natural GH secretagogue and/or an orexigenic factor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 62:1-17.
476. **Kojima M, Kangawa K** 2005 Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 85:495-522.
477. **Williams DL, Cummings DE** 2005 Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states. *J Nutr* 135:1320-1325.
478. **Behre CJ, Fagerberg B, Hulten LM, Hulthe J** 2005 The reciprocal association of adipocytokines with insulin resistance and C-reactive protein in clinically healthy men. *Metabolism* 54:439-444.

ANNEXE

PUBLICATIONS ACCEPTÉES

- 1- **DH St-Pierre**, V George, R Rabasa-Lhoret et ET Poehlman. GENETIC VARIATION AND STATISTICAL CONSIDERATIONS IN RELATION TO OVERFEEDING AND UNDERFEEDING IN HUMANS. *Nutrition*, 20: 145-54, 2004.
- 2- AD Karelis, **DH St-Pierre**, F Conus, R Rabasa-Lhoret et ET Poehlman. METABOLIC AND BODY COMPOSITION FACTORS IN SUBGROUPS OF OBESITY: WHAT DO WE KNOW? *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 2569-75, 2004.
- 3- F Conus, DB Allison, R Rabasa-Lhoret, M St-Onge, **DH St-Pierre**, A Tremblay-Lebeau et ET Poehlman. METABOLIC AND BEHAVIORAL CHARACTERISTICS OF METABOLICALLY OBESE, BUT NORMAL WEIGHT (MONW) WOMEN. *J Clin Endocrinol Metab*, 89; 5013-20, 2004.
- 4- **DH St-Pierre**, AD Karelis, K Cianflone, F Conus, D Mignault, R Rabasa-Lhoret, M St-Onge, A Tremblay-Lebeau et ET Poehlman. RELATIONSHIP BETWEEN GHRELIN AND ENERGY EXPENDITURE IN HEALTHY YOUNG WOMEN. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 5993-7, 2004.
- 5- AD Karelis, JF Henry, MF Malita, **DH St-Pierre**, I Vigneault, ET Poehlman et R Rabasa-Lhoret. COMPARISON OF INSULIN SENSITIVITY VALUES USING THE HYPERINSULINEMIC EUGLYCEMIC CLAMP: 2 VS. 3 HOURS. *Diabetes & Metabolism, Diabetes Metab*, 30: 413-4, 2004.
- 6- AD Karelis, M Faraj, JP Bastard, **DH St-Pierre**, M Brochu, D Prud'homme et R Rabasa-Lhoret. THE METABOLICALLY HEALTHY BUT OBESE INDIVIDUAL PRESENTS A FAVORABLE INFLAMMATION PROFILE. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 4145-50, 2005.

- 7- AD Karelis, JF Henry, MF Malita, **DH St-Pierre**, ET Poehlman et R Rabasa-Lhoret. DEGRADATION IN INSULIN SENSITIVITY WITH INCREASING SEVERITY OF THE METABOLIC SYNDROME. *Diabetes Obes Metab*, 8: 336-41, 2006.
- 8- **DH St-Pierre**, M Faraj, AD Karelis, F Conus, A Tremblay-Lebeau, JF Henry, D Mignault, K Cianflone et R Rabasa-Lhoret. CARDIOVASCULAR RISK FACTORS AS PREDICTORS OF GHRELIN, ADIPONECTIN AND LEPTIN LEVELS IN YOUNG WOMEN. *Diabetes & Metabolism*, 32: 131-9, 2006.
- 9- MF Malita, AD Karelis, **DH St-Pierre**, D Garrel, JP Bastard, A Tardif, D Prud'homme et R Rabasa-Lhoret. SURROGATE INDEXES VS. EUGLYCEMIC-HYPERINSULINEMIC CLAMP AS AN INDICATOR OF INSULIN RESISTANCE AND CARDIOVASCULAR RISK FACTORS IN OVERWEIGHT AND OBESE POSTMENOPAUSAL WOMEN. *Dabetes & Metabolism*, 32: 251-5, 2006.
- 10- AD Karelis, **DH St-Pierre**, JP Bastard et R Rabasa-Lhoret. LA CARACTÉRISATION DES INDIVIDUS OBÈSES MAIS MÉTABOLIQUEMENT NORMAUX: OU EN SOMMES NOUS? *STV*, 18: 23-7, 2006.
- 11- **DH St-Pierre**, AD Karelis, JF Henry, MF Malita, J Fontaine, D Mignault, M Brochu, JP Bastard, E Doucet, K Cianflone et R Rabasa-Lhoret. HORMONAL PROFILE ASSOCIATED WITH THE INSULIN SENSITIVE OVERWEIGHT AND OBESE SUBJECTS. *J Clin Endo Metab* (accepted).

PUBLICATIONS SOUMISES

- 1- JF Henry, J Fontaine, F Conus, AD Karelis, M St-Onge, **DH St-Pierre**, A Tremblay-Lebeau et R Rabasa-Lhoret. METABOLIC AND BEHAVIORAL CHARACTERISTICS OF LARGE AND SMALL EATERS. Applied Physiology, Nutrition and Metabolism (soumis).

- 2- **DH St-Pierre**, JP Bastard, M Brochu, AD Karelis, ME Lavoie, MF Malita, J Fontaine, D Mignault, P Imbeault, E Doucet, K Cianflone et R Rabasa-Lhoret. ASSOCIATION OF GHRELIN WITH CRP AND THE TNF-A SYSTEM IN OVERWEIGHT AND OBESE POSTMENOPAUSAL WOMEN. Clinical Endocrinology (soumis).

- 3- AD Karelis, SM Pasternyk, L Messier, **DH St-Pierre**, JM Lavoie et R Rabasa-Lhoret. DEGRADATION IN INSULIN SENSITIVITY WITH INCREASING SEVERITY OF THE TRIGLYCERIDE/HDL-RATIO IN OVERWEIGHT AND OBESE POSTMENOPAUSAL WOMEN. Diabetes, Obesity and Metabolism (soumis).

- 4- AD Karelis, B Tousignant, J Nantel, M Label-Proteau, **DH St-Pierre**, MF Malita, E Doucet, M Brochu et R Rabasa-Lhoret. ASSOCIATION OF INSULIN SENSITIVITY AND MUSCLE STRENGTH IN OVERWEIGHT AND OBESE POSTMENOPAUSAL WOMEN. Applied Physiology, Nutrition and Metabolism (soumis).

PUBLICATIONS PAR AFFICHE

1- **DH St-Pierre**, AD Karelis, K Cianflone, Conus F, D Mignault, R Rabasa-Lhoret, St-Onge M, Tremblay-Lebeau A et ET Poehlman. RELATIONSHIP BETWEEN GHRELIN AND ENERGY EXPENDITURE IN HEALTHY YOUNG WOMEN. Peptide Receptors, Montréal, Canada, August 2004.

2- **DH St-Pierre**, M Faraj, Conus F, St-Onge M, Tremblay-Lebeau A, K Cianflone, AD Karelis et R Rabasa-Lhoret. COMPOSANTES DE LA BALANCE ÉNERGÉTIQUE EN TANT QUE PRÉDICTEURS DES NIVEAUX DE GHRÉLINE ET D'ADIPONECTINE CHEZ DE JEUNES FEMMES NON-OBÈSES. Congrès de l'ALFÉDIAM, Lyon, France, March 2005.

3- AD Karelis, Henry JF, **DH St-Pierre**, Prud'homme D and R Rabasa-Lhoret. DEGRADATION IN INSULIN SENSITIVITY WITH INCREASING SEVERITY OF THE METABOLIC SYNDROME IN OBESE POSTMENOPAUSAL WOMEN. Prediabetes and Metabolic Syndrome, Berlin, Germany, April 2005.

4- E Doucet, P Imbeault, **DH St-Pierre**, M Brochu, Prud'homme D and R Rabasa-Lhoret. PYY LEVELS ARE DECREASED DURING A HYPERINSULINEMIC-EUGLYCEMIC CLAMP BEFORE AND AFTER WEIGHT LOSS IN POSTMENOPAUSAL WOMEN. NAASO, Vancouver, Canada, October 2005.

5- **DH St-Pierre**, AD Karelis, K Cianflone, JF Henry, MF Malita, J Fontaine, D Mignault, M Brochu, JP Bastard, E Doucet, P Imbeault and R Rabasa-Lhoret. HORMONAL PROFILE ASSOCIATED WITH THE INSULIN SENSITIVE OVERWEIGHT AND OBESE SUBJECTS. European Endocrinology, Glasgow, Scotland, April 2006.