



**HAL**  
open science

# Résistance à l'action des catécholamines, de la leptine et de l'insuline au cours de l'obésité: étude de la réactivité du système nerveux autonome "in vivo" et de la lipolyse "in vitro"

Didier Quilliot

## ► To cite this version:

Didier Quilliot. Résistance à l'action des catécholamines, de la leptine et de l'insuline au cours de l'obésité: étude de la réactivité du système nerveux autonome "in vivo" et de la lipolyse "in vitro". Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2002. Français. NNT: 2002NAN10252. tel-01747405

**HAL Id: tel-01747405**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747405>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

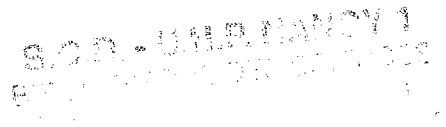
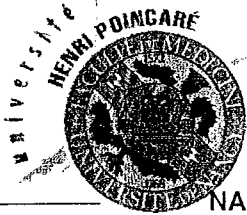
## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



NANCY 1  
FACULTES DES SCIENCES & TECHNIQUES

UFR : Sciences & Techniques Biologiques  
Ecole Doctorale Biologie Santé & Environnement

## THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de  
**Docteur de l'université Henri Poincaré, Nancy I**  
En Physiologie - Nutrition par :

**Didier QUILLIOT**

### RESISTANCE A L'ACTION DES CATECHOLAMINES, DE LA LEPTINE ET DE L'INSULINE AU COURS DE L'OBESITE


Etude de la réactivité du système nerveux autonome *in vivo* et de la  
lipolyse *in vitro*

Soutenance publique le 27 novembre 2002

Thèse réalisée au  
Laboratoire de nutrition et de maladies métaboliques (EA 34 36)  
& Centre d'Investigation Clinique CHU - INSERM de Nancy

sous la direction du Professeur Olivier ZIEGLER

## JURY

Professeur Michel DAUÇA  
Professeur Paul VALENSI  
Professeur BIBLIOTHEQUE SCIENCES NANCY 1  
Professeur  
Professeur  
D  095 155481 6

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur

# **RESISTANCE A L'ACTION DES CATECHOLAMINES, DE LA LEPTINE ET DE L'INSULINE AU COURS DE L'OBESITE**

Etude de la réactivité du système nerveux autonome  
*in vivo* et de la lipolyse *in vitro*

**Didier QUILLIOT**

A Nathalie, Célia, Lucas et Evan....

## REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur Olivier Ziegler pour son soutien en qualité de directeur de recherche. Je dois l'orientation de ce travail à sa constante volonté de développer à la fois la recherche clinique et la recherche de laboratoire. J'ai pu apprécier au cours des années son enthousiasme communicatif et sa culture scientifique. J'espère rester digne de la confiance qu'il m'a témoignée.

Je remercie le Professeur Faiez Zannad, qui m'a toujours encouragé dans mes travaux de recherche clinique. J'ai pu apprécier sa disponibilité, sa compétence et la rigueur de sa démarche scientifique. Son analyse critique et constructive a été une aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

Je remercie le Professeur Philippe Valet pour le privilège qu'il me fait de juger ce travail. Ses conseils avisés ont été indispensables à l'orientation de mon travail de laboratoire. Qu'il trouve ici le témoignage de mon respect et de ma gratitude.

Je remercie le Professeur Jean-Luc Elghozi d'avoir accepté de juger et de rapporter ce travail. Son expertise dans l'exploration du système nerveux autonome cardio-vasculaire nous rend attentif à ses critiques.

J'exprime ma profonde gratitude au Professeur Paul Valensi qui me fait l'honneur d'être rapporteur et de juger cette thèse. Sa qualité de nutritionniste, ses travaux sur le système nerveux autonome et sur la membrane font de lui un interlocuteur privilégié.

Je remercie le Professeur Michel Dauça d'avoir accepté de juger ce travail. Il m'a ouvert les portes de son laboratoire où a été réalisée une partie de ces travaux ; sa gentillesse et son soutien ont été essentiels dans la réalisation du travail de laboratoire.

Je remercie Madame Mireille Donner qui m'a quotidiennement assuré de son assistance. Nos échanges scientifiques ont toujours été constructifs.

Je remercie mon collègue et ami, Norman Al-Makdissy, qui m'a formé avec patience et bienveillance à la culture cellulaire et qui m'a été d'une aide précieuse dans tout le travail mené au laboratoire.

Je remercie Madame Dugail et le Professeur Ferré de m'avoir permis de réaliser les analyses en PCR quantitative au sein de leur laboratoire et pour leur accueil chaleureux

Je remercie le docteur Françoise Barbé pour sa constante disponibilité et le Professeur Nicolas d'avoir permis la réalisation des dosages dans son laboratoire.

Je remercie Laurence Fluckiger qui m'a initié à l'exploration du système nerveux autonome.

Je remercie mes collègues de travail du service de Diabétologie, Maladies métaboliques et Nutrition de m'avoir permis de m'échapper de l'hôpital pour rejoindre mes cellules et Mohamed Younsi pour son aide au laboratoire.

Les études cliniques n'auraient pas été possibles sans l'aide de tout le personnel du Centre d'Investigation Clinique et des volontaires qui ont accepté de se soumettre à nos recherches.

A la mémoire du Professeur Pierre Drouin. J'aurais aimé qu'il fût de ce Jury.

# Liste des publications

## Travaux relatifs au sujet de thèse d'université

### Articles scientifiques

Quilliot D, Fluckiger L, Zannad F, Drouin P, Ziegler O. Impaired autonomic control of heart rate and blood pressure in obesity: role of age and of insulin-resistance. *Clin Auton Res* 2001; 11(2):79-86.

Fluckiger L, Boivin JM, Quilliot D, Jeandel C, Zannad F. Differential effects of aging on heart rate variability and blood pressure variability. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1999; 54(5):B219-24.

Younsi M, Quilliot D, Al-Makdissy N, Ziegler O. Erythrocyte membrane phospholipide composition is related to hyperinsulinemia in obese non diabetic women: effect of weight loss. *Metabolism* 2002; 51 : 1261-1268

### Abstracts et congrès à comité de lecture

Quilliot D, Fluckiger L, Ziegler O, Zannad F, Drouin P. XVI<sup>es</sup> Journées de l'Hypertension Artérielle, 12/96. Résumé O69, Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux, 1996, 89; p24. Diminution de la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle au cours de l'obésité.

Quilliot D, Fluckiger, Drouin P, Zannad F, Ziegler O. Obesity and insulin resistance alters the autonomic nervous system control of heart rate and blood pressure. American Diabetes Association's 57th Annual Meeting and Scientific Sessions, June 1997.

### Revue nationale à comité de lecture

Ziegler O, Quilliot D, Guerci B, Drouin P. Macronutriments, masse grasse, acides gras et sensibilité à l'insuline. *Diabetes Metab* 27:261-70, 2000

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique - BP 11  
54601 VILLERS-LES-NANCY Cédex

# SOMMAIRE



# INTRODUCTION

## PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>1. L'ORGANISATION ET LES METHODES DE MESURE DE L'ACTIVITE DU SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE (SNS) .....</b>	<b>19</b>
1.1. DESCRIPTION.....	19
1.2. SPECIFICITE DE LA REGULATION VEGETATIVE DU SYSTEME CARDIO-VASCULAIRE .....	22
1.2.1. <i>La régulation de la fréquence cardiaque .....</i>	<i>23</i>
1.2.2. <i>La régulation de la pression artérielle et le système nerveux autonome ...</i>	<i>24</i>
1.2.3. <i>La régulation de la vasomotricité par le système nerveux autonome .....</i>	<i>24</i>
1.2.4. <i>La régulation réflexe de la pression artérielle: rôle du baroréflexe .....</i>	<i>25</i>
1.2.5. <i>Le mode de fonctionnement du baroréflexe .....</i>	<i>27</i>
1.3. METHODES D'ETUDE .....	27
1.3.1. <i>La microneurographie.....</i>	<i>28</i>
1.3.2. <i>L'analyse des concentrations sanguines, urinaires ou plaquettaires des catécholamines.....</i>	<i>29</i>
1.3.3. <i>La mesure du flux de noradrénaline libéré par les tissus dans le plasma..</i>	<i>29</i>
1.3.4. <i>La mesure de la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle.....</i>	<i>30</i>
<b>2. LA PLACE DU SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'OBESITE : LES MODELES ANIMAUX .....</b>	<b>43</b>
2.1. MODELES EXPERIMENTAUX D'OBESITE HYPOTHALAMIQUE .....	43
2.2. ROLE DE L'HYPERINSULINISME DANS LE MODELE D'OBESITE HYPOTHALAMIQUE .....	44
2.3. ACTION DES MOLECULES ANOREXIGENES SUR LE SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE .	45
<b>3. SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE, PRISE DE POIDS ET OBESITE : LES DONNEES CHEZ L'HOMME.....</b>	<b>46</b>
3.1. ROLE DU SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE DANS LES OBESITES HYPOTHALAMIQUES CHEZ L'HOMME .....	47
3.2. SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE ET REGULATION DE LA PRISE ALIMENTAIRE .....	47
3.3. SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE ET DEPENSE ENERGETIQUE.....	48
3.3.1. <i>Le métabolisme de base et la prise de poids .....</i>	<i>49</i>
3.3.2. <i>La thermogenèse post-prandiale et la prise de poids.....</i>	<i>51</i>
3.3.3. <i>Le système nerveux sympathique et l'activité physique spontanée.....</i>	<i>52</i>
3.3.4. <i>Le système nerveux sympathique et l'exercice physique .....</i>	<i>52</i>
3.3.5. <i>Le système nerveux sympathique nerveux sympathique et l'oxydation des acides gras .....</i>	<i>53</i>
3.4. PREDISPOSITION GENETIQUE ET PRISE DE POIDS : POLYMORPHISME DES GENES IMPLIQUES DANS LA REPONSE ADRENERGIQUE .....	53
3.5. ACTIVITE DU SNS AU COURS DE L'OBESITE .....	55
3.6. BAISSSE DU TONUS SYMPATHIQUE, FACTEUR DE PRISE DE POIDS : UNE CONDITION NI NECESSAIRE NI SUFFISANTE .....	57
<b>4. SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE, L'INSULINE ET L'INSULINO RESISTANCE.....</b>	<b>58</b>
4.1. EFFETS DE L'INSULINE SUR LE TONUS SYMPATHIQUE .....	58
4.2. DE LA SELECTIVITE DE LA STIMULATION .....	58
4.3. MECANISMES DE CETTE STIMULATION: ACTION CENTRALE DE L'INSULINE .....	59
4.3.1. <i>Les effets de l'insuline sur la stimulation du SNS chez le sujet obèse.....</i>	<i>60</i>

4.3.2.	<i>Les facteurs génétiques</i> .....	61
4.4.	CONSEQUENCE DE L'HYPERTONIE SYMPATHIQUE SUR LA SENSIBILITE A L'INSULINE ...	61
4.5.	EFFETS DE L'INSULINE SUR LA VASCULARISATION PERIPHERIQUE .....	63
4.5.1.	<i>L'effet vasodilatateur de l'insuline</i> .....	63
4.5.2.	<i>Les effets de l'insuline sur la vasomotricité chez le sujet obèse</i> .....	64
4.5.3.	<i>L'hyperinsulinisme et l'hypertonie sympathique : les répercussions sur le contrôle tensionnel</i> .....	65
4.6.	LES EFFETS DE L'INSULINE SUR LA VARIABILITE DE LA FREQUENCE CARDIAQUE .....	66
<b>5.</b>	<b>LE SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE ET LA LEPTINE</b> .....	<b>67</b>
5.1.	REGULATION DE LA PRISE ALIMENTAIRE A LONG TERME: INTERACTION ENTRE SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE ET LEPTINE .....	67
5.2.	ACTION DE LA LEPTINE SUR LE SNS ET RESISTANCE A LA LEPTINE .....	70
5.2.1.	<i>La leptine et le système nerveux sympathique</i> .....	70
5.2.2.	<i>Une résistance sélective à la leptine</i> .....	71
5.2.3.	<i>Une résistance globale</i> .....	71
5.3.	RESISTANCE A LA LEPTINE CHEZ L'HOMME .....	72
5.4.	INTERACTION LEPTINE/INSULINE .....	73
5.5.	EFFET DU SNS SUR LA SYNTHESE DE LA LEPTINE .....	73
5.6.	SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE, LEPTINE ET AXE CORTICOTROPE .....	74
<b>6.</b>	<b>LA DYSFONCTION SYMPATHIQUE DANS L'OBESITE : UNE HYPOTHESE MEMBRANAIRE DE LA RESISTANCE AUX CATECHOLAMINES</b> .....	<b>76</b>
6.1.	RESISTANCE AUX CATECHOLAMINES ET SYSTEME CARDIO-VASCULAIRE .....	76
6.2.	RESISTANCE AUX CATECHOLAMINES ET TISSU ADIPEUX .....	76
6.2.1.	<i>Rappels</i> .....	76
6.2.2.	<i>La résistance à l'action des catécholamines au cours de l'obésité</i> .....	79
6.2.3.	<i>La sensibilité aux catécholamines et les effets de l'amaigrissement</i> .....	82
6.3.	LA DESENSIBILISATION DES RECEPTEURS .....	82
6.4.	RESISTANCE A L'ACTION DES CATECHOLAMINES : HYPOTHESE MEMBRANAIRE .....	84
6.4.1.	<i>Le rôle des acides gras membranaires</i> .....	84
6.4.2.	<i>Le rôle des phospholipides</i> .....	85
6.5.	LA LOCALISATION MEMBRANAIRE DES RECEPTEURS ADRENERGIQUES: LES CAVEOLES	87
6.6.	ROLE DE LA SPHINGOMYELINE DANS LES CAVEOLES .....	89
6.6.1.	<i>La sphingomyéline : structure et propriétés</i> .....	89
6.6.2.	<i>La sphingomyéline et les cavéoles</i> .....	97
6.7.	SPHINGOMYELINE ET LIPOPROTEINES .....	97
6.7.1.	<i>La sphingomyéline dans l'alimentation</i> .....	97
6.7.2.	<i>Composition des lipoprotéines en sphingomyéline</i> .....	98
6.8.	ROLE DES METABOLITES DE LA SPHINGOMYELINE DANS LA SIGNALISATION CELLULAIRE .....	100
<b>7.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>101</b>

## **DEUXIEME PARTIE :**

# **ETUDE DU SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE AU COURS DE L'OBESITE : RELATION AVEC LA RESISTANCE A L'INSULINE ET LA LEPTINE**

### **PREMIERE ETUDE CLINIQUE : Effets de l'âge et de l'obésité sur la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle**

1. AVANT PROPOS .....	104
2. INTRODUCTION .....	105
3. SUJETS ET METHODES .....	105
3.1. SUJETS .....	105
3.2. METHODES .....	106
3.2.1. <i>Enregistrement de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque ...</i>	106
3.2.2. <i>Acquisition et traitement des données.....</i>	107
3.2.3. <i>Expression des résultats de l'analyse spectrale .....</i>	107
3.2.4. <i>Déroulement de l'étude .....</i>	108
3.2.5. <i>Sensibilité à l'insuline.....</i>	109
3.2.6. <i>Analyse statistique.....</i>	109
4. RESULTATS .....	110
4.1. DESCRIPTION DES SUJETS ET PARAMETRES DE VARIABILITE DE LA FC ET DE LA PA.	110
4.2. CORRELATIONS AVEC L'IMC, L'AGE ET LE HOMA .....	116
4.3. ETUDE DE LA SENSIBILITE DU BAROREFLEXE .....	119
5. DISCUSSION .....	119

### **DEUXIEME ETUDE CLINIQUE : Etude de la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle au cours d'une charge orale en glucose chez les sujets obèses normotendus**

1. INTRODUCTION .....	124
2. SUJETS ET METHODES .....	124
2.1. RECRUTEMENT DES SUJETS .....	124
2.2. METHODES .....	125
5.1.1. <i>Méthode d'enregistrement.....</i>	125
5.1.2. <i>Analyse statistique.....</i>	126
5.1.3. <i>Protocole d'étude.....</i>	126
6. RESULTATS .....	127
6.1. DESCRIPTION DES SUJETS .....	127
6.2. VARIATIONS DES MF, DES HF ET DU RATIO MF/HF AU REPOS ET EN ORTHOSTATISME .....	127
6.3. VARIATIONS DE LA FC ET DE LA PRESSION ARTERIELLE APRES LA CHARGE GLUCOSEE ..	130
6.4. VARIATIONS DES MF ET DU RATIO MF/HF APRES LA CHARGE GLUCOSEE.....	132

6.5.	VALEURS DES HAUTES FREQUENCES EN RESPIRATION IMPOSEE ET AU COURS DE LA CHARGE GLUCOSEE.....	137
6.6.	BASSES FREQUENCES (BF).....	138
6.7.	ANALYSE SPECTRALE CROISEE.....	139
6.8.	DISCUSSION .....	142

### **TROISIEME ETUDE CLINIQUE : Relation entre le système nerveux sympathique et la leptine : effets de la restriction calorique et de l'amaigrissement**

1.	INTRODUCTION .....	146
2.	SUJETS ET METHODES .....	147
2.1.	SUJETS .....	147
2.2.	METHODES .....	148
2.2.1.	<i>Principes de l'analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque sur 24 heures.....</i>	148
2.2.2.	<i>La mesure de composition corporelle.....</i>	151
2.3.	PROTOCOLE .....	152
2.4.	ANALYSE STATISTIQUE.....	152
3.	RESULTATS .....	153
3.1.	PARAMETRES ANTHROPOMETRIQUES ET BIOLOGIQUES .....	153
3.1.1.	<i>Description.....</i>	153
3.1.2.	<i>Paramètres corrélés à la leptine.....</i>	153
3.2.	PRESSION ARTERIELLE ET PARAMETRES DE VARIABILITE .....	155
3.2.1.	<i>Description.....</i>	155
3.2.2.	<i>Paramètres corrélés à la leptine.....</i>	155
4.	DISCUSSION .....	165
5.	CONCLUSION – PERSPECTIVES .....	171

## **TROISIEME PARTIE : L'HYPOTHESE MEMBRANAIRE DE LA RESISTANCE A L'ACTION DES CATECHOLAMINES**

### **ETUDE CLINIQUE PRELIMINAIRE : La dysfonction sympathique chez le sujet obèse normotendu : l'hypothèse membranaire de la résistance à l'action des catécholamines**

1.	SITUATION DU SUJET .....	174
2.	HYPOTHESE.....	175
3.	OBJECTIFS.....	175
4.	METHODES .....	175
4.1.	SUJETS .....	175
4.2.	COMPOSITION MEMBRANAIRE DES HEMATIES .....	175
4.3.	ÉTUDE A COURT TERME DE LA VARIABILITE DE LA FC ET DE LA PA.....	177

<b>5. RESULTATS</b> .....	<b>177</b>
5.1. COMPARAISON DES SUJETS OBESES ET TEMOINS .....	177
5.2. ANALYSE DES CORRELATIONS .....	177
<b>6. DISCUSSION</b> .....	<b>180</b>

## **TRAVAUX IN VITRO SUR DES LIGNEES D'ADIPOCYTES EN CULTURE**

<b>1. INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>182</b>
<b>2. MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>182</b>
2.1. CULTURE CELLULAIRE.....	182
2.1.1. <i>Lignée cellulaire</i> .....	182
2.1.2. <i>Milieu de culture</i> .....	183
2.1.3. <i>Entretien de la lignée cellulaire</i> .....	183
2.1.4. <i>Viabilité cellulaire</i> .....	183
2.1.5. <i>Différenciation adipocytaire</i> .....	184
2.2. ANALYSE DE LA COMPOSITION MEMBRANAIRE DES ADIPOCYTES 3T3-L1.....	184
2.3. MESURE DE LA FLUIDITE MEMBRANAIRE PAR POLARISATION DE FLUORESCENCE.....	186
2.4. DOSAGE DU GLYCEROL DANS LE SURNAGEANT DE CULTURES CELLULAIRES.....	189
2.5. DOSAGE DES ARNm EN RT-PCR.....	190
2.5.1. <i>Extraction des ARN</i> .....	190
2.5.2. <i>Dosage des ARN et vérification de l'intégrité de l'ARN</i> .....	191
2.5.3. <i>La rétroconversion</i> .....	192
2.5.4. <i>La polymérase chain reaction : PCR semi quantitative</i> .....	192
2.5.5. <i>La PCR en temps réel</i> .....	193
2.6. PROTOCOLE .....	194
2.6.1. <i>Sphingomyéline</i> .....	194
2.6.2. <i>Isoprénaline</i> .....	195
2.6.3. <i>Forskoline</i> .....	195
2.6.4. <i>Méthylisobutylxanthine (MIX)</i> .....	195
2.6.5. <i>Sphingomyélinase</i> .....	195
2.6.6. <i>Céramides</i> .....	195
2.6.7. <i>Méthyl-bêta-Cyclodextrine</i> .....	196
2.6.8. <i>Coloration à l'huile rouge</i> .....	196
2.6.9. <i>Déroulement du test</i> .....	196
2.6.10. <i>Expression des résultats</i> .....	197
2.6.11. <i>Statistiques</i> .....	197

## **EFFETS DE LA SPHINGOMYELINE SUR LA LIPOLYSE ADIPOCYTAIRE**

<b>1. HYPOTHESES</b> .....	<b>198</b>
<b>2. OBJECTIFS</b> .....	<b>198</b>
<b>3. RESULTATS</b> .....	<b>199</b>
3.1. EFFETS DE L'ENRICHISSEMENT MEMBRANAIRE EN SPHINGOMYELINE .....	199
3.1.1. <i>Effets sur la lipolyse basale</i> .....	199
3.1.2. <i>Effet membranaire de la sphingomyéline d'œuf (SM-AP) sur la régulation de la lipolyse stimulée : effets du temps de traitement</i> .....	200
3.1.3. <i>Analyse des effets de la sphingomyéline ajoutée 30 minutes avant la forskoline et le méthylisobutylxanthine</i> .....	201

3.1.4.	<i>Synthèse des résultats</i> .....	203
3.1.5.	<i>Etude de la composition membranaire des adipocytes après 30 minutes d'incubation avec la sphingomyéline</i> .....	203
3.1.6.	<i>Effets de la sphingomyéline sur la fluidité membranaire</i> .....	204
3.1.7.	<i>Effets de l'enrichissement membranaire en sphingomyéline sur l'expression des récepteurs <math>\beta</math>-adrénergiques après 30 minutes de traitement</i> .....	206
3.2.	EFFETS DE LA DEPLETION EN SPHINGOMYELINE DE LA MEMBRANE: EFFETS DE LA SPHINGOMYELINASE .....	206
3.2.1.	<i>Hypothèses</i> .....	206
3.2.2.	<i>Effet de la sphingomyélinase sur la fluidité membranaire</i> .....	207
3.2.3.	<i>Effets de la sphingomyélinase sur la lipolyse basale</i> .....	208
3.2.4.	<i>Effets de la sphingomyélinase sur la lipolyse stimulée par l'isoprénaline</i>	209
3.3.	EFFETS DE LA DEPLETION EN CHOLESTEROL : EFFETS DE LA $\beta$ -CYCLODEXTRINE .....	210
3.4.	SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS AVEC LA SPHINGOMYELINE, LA SPHINGOMYELINASE ET LA CYCLODEXTRINE SUR LA LIPOLYSE BASALE ET STIMULEE PAR L'ISOPRENALINE .....	211
3.5.	EFFETS DES CERAMIDES SUR LA REGULATION DE LA LIPOLYSE .....	211
3.5.1.	<i>Hypothèses</i> .....	211
3.5.2.	<i>Effets des céramides sur la lipolyse basale et stimulée</i> .....	212
4.	<b>DISCUSSION</b> .....	215

## **ANALYSE DES EFFETS DE LA SPHINGOMYELINE SUR L'EXPRESSION DES GENES**

1.	<b>INTRODUCTION</b> .....	220
2.	<b>EFFETS DE LA SPHINGOMYELINE SUR LES ARNM DES RECEPTEURS <math>\beta</math>-ADRENERGIQUES ET SUR LA LIPASE HORMONO-SENSIBLE (LHS)</b> .....	221
4.1.	EFFETS DE LA SM SUR L'EXPRESSION DE PPAR $\gamma$ ET SUR LA DIFFERENCIATION ADIPOCYTAIRE .....	222
4.2.	EFFETS DE LA SM SUR L'EXPRESSION DE SREBP2 .....	224
4.3.	EFFETS DE LA SPHINGOMYELINE SUR L'ARNM DE LA LIPOPROTEINE LIPASE .....	225
4.4.	EFFETS DE LA SM SUR LES GENES CIBLES DE SREBP : LES GENES IMPLIQUES DANS LA LIPOGENESE DE NOVO .....	226
4.5.	EFFETS DE LA SM SUR LES GENES CIBLES DE SREBP : LES GENES IMPLIQUES DANS L'HOMEOSTASIE DU CHOLESTEROL .....	226
4.6.	LE RECEPTEUR DE L'INSULINE.....	227
4.7.	LA RESISTINE .....	227
5.	<b>DISCUSSION</b> .....	228
6.	<b>CONCLUSIONS - PERSPECTIVES</b> .....	234

## **CONCLUSION GENERALE**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION GENERALE

Le développement d'un état d'insulino-résistance chez le sujet obèse permet de limiter le stockage des triglycérides dans le tissu adipeux. L'hyperinsulinémie qui en résulte est responsable d'une stimulation du système nerveux sympathique (SNS) qui active la thermogénèse et par conséquent augmente les dépenses énergétiques. De plus l'enzyme-clé, la lipoprotéine lipase, qui hydrolyse les triglycérides des lipoprotéines riches en triglycérides, « ouvrant ainsi la porte de l'adipocyte aux acides gras », est régulée par l'insuline. Ces deux mécanismes compensateurs permettent de limiter la prise de poids. L'hypertonie sympathique a néanmoins l'inconvénient d'exercer un effet hypertenseur tout particulièrement chez les sujets génétiquement prédisposés.

Au contraire, la diminution de l'activité et/ou l'absence de réponse du SNS à divers stimuli physiologiques sont susceptibles de faciliter la prise de poids et l'obésité. Les modèles animaux ont permis d'étayer cette théorie. L'absence d'adaptation « compensatrice » du SNS lorsque la masse grasse augmente pourrait également favoriser l'aggravation de la surcharge pondérale, si les autres systèmes de régulation de la balance énergétique ne peuvent compenser sa défaillance. La leptine, qui est au centre de ce système de régulation est avec l'insuline, l'un des principaux activateurs du SNS. Cette hormone pourrait donc être l'un des responsables de l'hypertonie sympathique et de l'hypertension artérielle du sujet obèse.

Nous avons émis l'hypothèse que les sujets obèses normotendus et insulino-résistants ont une diminution de l'activité sympathique ou une diminution de la réponse des tissus aux catécholamines. Malgré une insulino-résistance majeure, une hyperleptinémie et une obésité ancienne, certains sujets ont une pression artérielle parfaitement régulée. Ces sujets pourraient avoir une activité sympathique abaissée par rapport à d'autres sujets obèses.

L'appareil cardio-vasculaire est particulièrement sensible aux influences du système nerveux autonome (SNA). Nous nous sommes donc intéressés aux oscillations de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle. Les fluctuations de ces deux paramètres sont liées aux effets « complémentaires » des systèmes sympathique et parasympathique. Les deux composantes du SNA exercent leurs effets de façon oscillatoire mais selon des fréquences différentes. L'amplitude de ces oscillations est le reflet de l'importance de l'activation cardiaque ou vasculaire par ce système. L'étude de



la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle a donc constitué notre principal outil d'investigation clinique.

Notre démarche a été d'étudier les effets de l'âge, de la corpulence, de l'hyperinsulinémie et de l'hyperleptinémie, reflets d'une résistance à l'action de l'insuline et de la leptine.

Les indices de variabilité ont été analysés au repos et dans diverses situations dynamiques : orthostatisme, charge glucosée, régime hypocalorique associé ou non à un traitement par la sibutramine. Nous avons voulu ainsi étudier la réponse ou la réactivité du système nerveux autonome à différentes situations physiologiques ou pharmacologiques.

Nous avons d'abord étudié les effets de l'âge sur la régulation du système nerveux autonome cardiovasculaire en nous intéressant à une population de sujets parfaitement normotendus, âgés de 18 à 80 ans.

Pour mettre en évidence les effets de l'obésité, nous avons considéré une population de sujets normotendus, sédentaires, de poids stable, dont l'indice de masse corporelle variait de 20 à 65 kg/m<sup>2</sup>. Nous avons donc analysé les relations entre le degré d'obésité, l'hyperinsulinémie et les différents indices du système nerveux autonome. Sa réactivité a été évaluée lors d'une stimulation par l'orthostatisme puis, dans une deuxième étude par l'insuline induite par l'ingestion d'une charge glucosée.

Dans une troisième étude, nous nous sommes intéressés aux relations SNS - leptine et à l'évolution de cette relation après amaigrissement.

La diminution de la réponse des tissus aux catécholamines est une hypothèse qui sera abordée dans la seconde partie de ce travail. Des travaux récents de notre groupe ont montré qu'un excès de sphingomyéline (SM) membranaire est responsable d'une diminution du transport du glucose ou d'autres actions de l'insuline. Ces études ont été menées sur des lignées d'adipocytes ou de pré-adipocytes en culture. Ce type d'anomalies existent aussi *in vivo*. Le fait que les sujets obèses les plus hyperinsulinémiques aient un excès de SM dans la membrane du globule rouge ou de l'adipocyte, est venu conforter la théorie membranaire de l'insulino-résistance.

Nous avons donc émis l'hypothèse que les variations de SM (excès ou déficit) pouvaient influencer l'action des catécholamines. Nous avons tout d'abord vérifié que les sujets obèses les plus insulino-résistants avaient à la fois une dysfonction sympathique et un excès de SM membranaire au niveau des globules rouges. La

deuxième partie expérimentale de ce travail a été consacrée à l'étude *in vitro* de la résistance du tissu adipeux aux catécholamines ou plus précisément à celle de la lipolyse. Enfin nous avons voulu « explorer » les autres conséquences d'un excès de SM sur les fonctions de l'adipocyte, en étudiant d'autres gènes impliqués dans le métabolisme glucido-lipidique de cette cellule.

Les deux parties expérimentales de ce travail tentent donc de faire le lien entre d'une part un phénotype clinique d'obésité caractérisé par la triade hyperinsulinémie (ou insulino-résistance) – hyperleptinémie et dysfonction sympathique et un phénotype biologique adipocytaire caractérisé par un excès de SM membranaire. Ce domaine de la physiopathologie de l'obésité n'a encore été que peu exploré, faute d'outils adaptés.

Notre première partie, bibliographique, est consacrée essentiellement à l'implication du système nerveux autonome dans la physiopathologie de l'obésité. Le concept de résistance à l'action des médiateurs ou des hormones est présenté avec une attention particulière pour l'hypothèse membranaire et le rôle de la SM.

## RESUME DE LA DEMARCHE EXPERIMENTALE

### TRAVAUX DE RECHERCHE CLINIQUE

- **Première étude clinique**

Effets de l'âge et de l'obésité sur la variabilité de la Fréquence Cardiaque et de la Pression Artérielle. Rôle de l'insulino-résistance

- **Deuxième étude clinique**

Etude de la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle au cours d'une charge orale en glucose chez des sujets obèses normotendus.

- **Troisième étude clinique**

Relation entre le système nerveux sympathique et la leptine: effets de la restriction calorique et de l'amaigrissement.

### **Hypothèse membranaire de la résistance à l'action des catécholamines : rôle de la sphingomyéline**

- **Etude clinique préliminaire**

Dysfonction sympathique et contenu en sphingomyéline de la membrane du globule rouge, chez le sujet obèse normotendu.

- **Travaux *in vitro* sur des lignées d'adipocytes en culture**

- 1) **Effets de la sphingomyéline sur la lipolyse adipocytaire**

- 2) **Analyse des effets de la sphingomyéline sur l'expression des gènes**

# **PREMIERE PARTIE**

## **Etude bibliographique**

**DES MODELES ANIMAUX D'OBESITE AU ROLE DU  
SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE DANS LE  
DEVELOPPEMENT DE L'OBESITE CHEZ L'HOMME**

# 1. L'organisation et les méthodes de mesure de l'activité du système nerveux sympathique (SNS)

## 1.1. Description

Les fonctions de la plupart des organes sont influencées par le système nerveux autonome (SNA). La figure 1 montre la complexité de ce système et son organisation. Chacune des composantes, (système nerveux sympathique (SNS) et parasympathique) est régulée de façon régionale (338;339). Un dysfonctionnement ou neuropathie végétative peut concerner l'ensemble du système ou être localisé à une région ou un organe. Les variations interindividuelles des différentes activités sont très importantes, il est donc difficile de d'évaluer le fonctionnement du système, dans sa globalité ou au niveau régional.

Trois composantes sont fondamentales dans l'organisation de ce système: l'arc réflexe (figure 2), la réponse de l'organe et l'existence de mécanismes de régulation permettant de compenser éventuellement une défaillance ou une hyperactivité du système. L'arc réflexe est à la base de cette régulation mais il existe aussi des efférences bulbaires et supra-bulbaires. L'arc réflexe persiste après section de la moelle mais la disparition du contrôle supra-spinal inhibiteur entraîne une réponse sympathique excessive (222). D'autre part, chaque nerf sympathique établit une synapse dans les ganglions sus- et sous-jacents. Il y a donc des connexions multiples et une diffusion de la réponse sympathique sur plusieurs segments. Comme les ganglions sympathiques pré-ganglionnaires sont proches du système nerveux central, les fibres sympathiques pré-ganglionnaires sont relativement courtes.

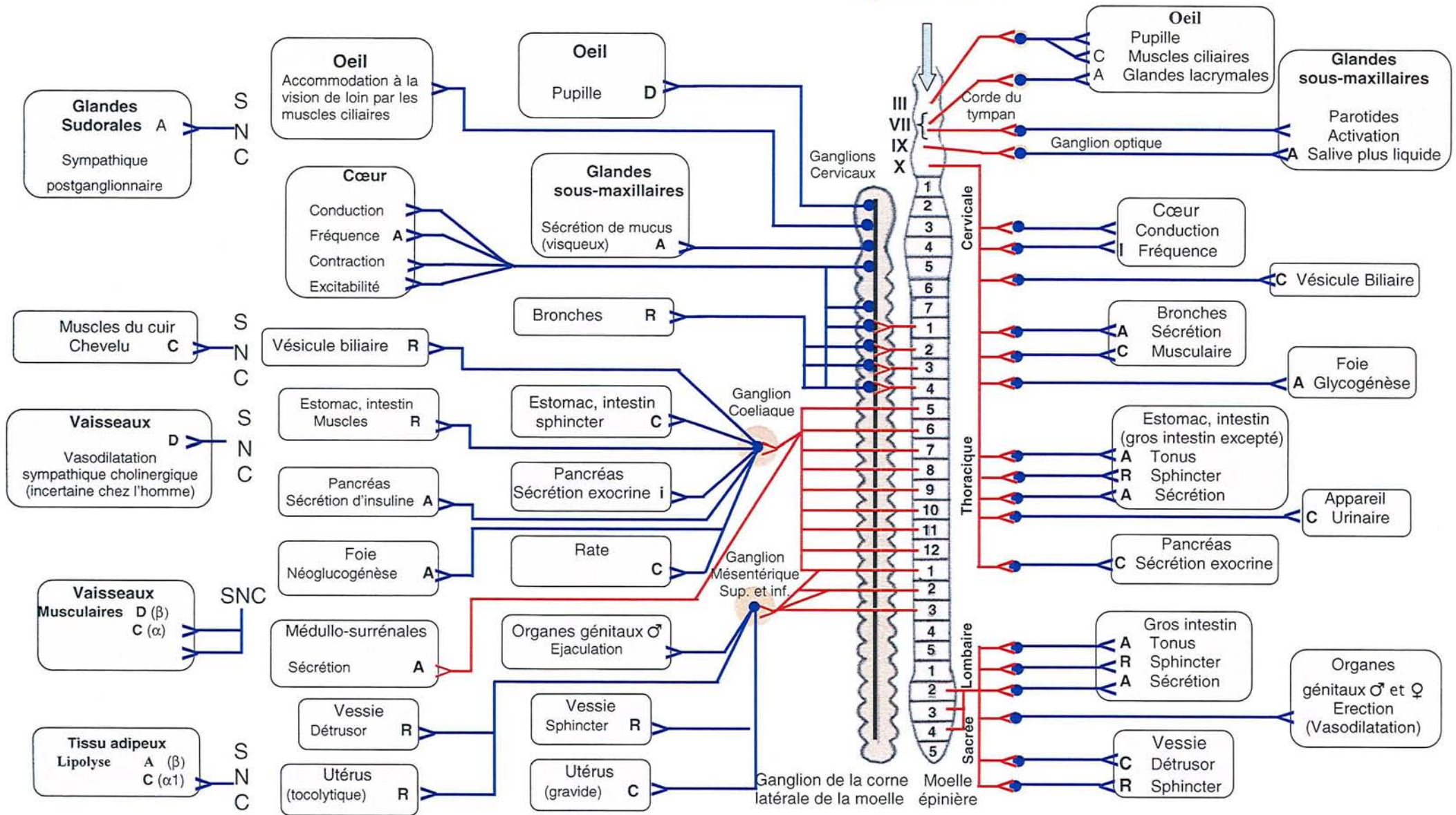
Les neurotransmetteurs sont la noradrénaline et l'adrénaline pour le système sympathique et l'acétylcholine pour le système parasympathique. L'acétylcholine assure la transmission de l'influx entre les neurones pré- et post-ganglionnaires dans les deux systèmes (figure 3). La médullo-surrénale représente un neurone post-synaptique libérant principalement de l'adrénaline (80%) et de la noradrénaline (20%).

De nombreux autres peptides, comme le neuropeptide Y (NPY) ou la galanine peuvent être libérés avec ces neurotransmetteurs; ils peuvent jouer un rôle tout aussi important que ces derniers, mais ils ont en général un rôle de neuromodulateur (128).

# Système sympathique

# Système parasympathique

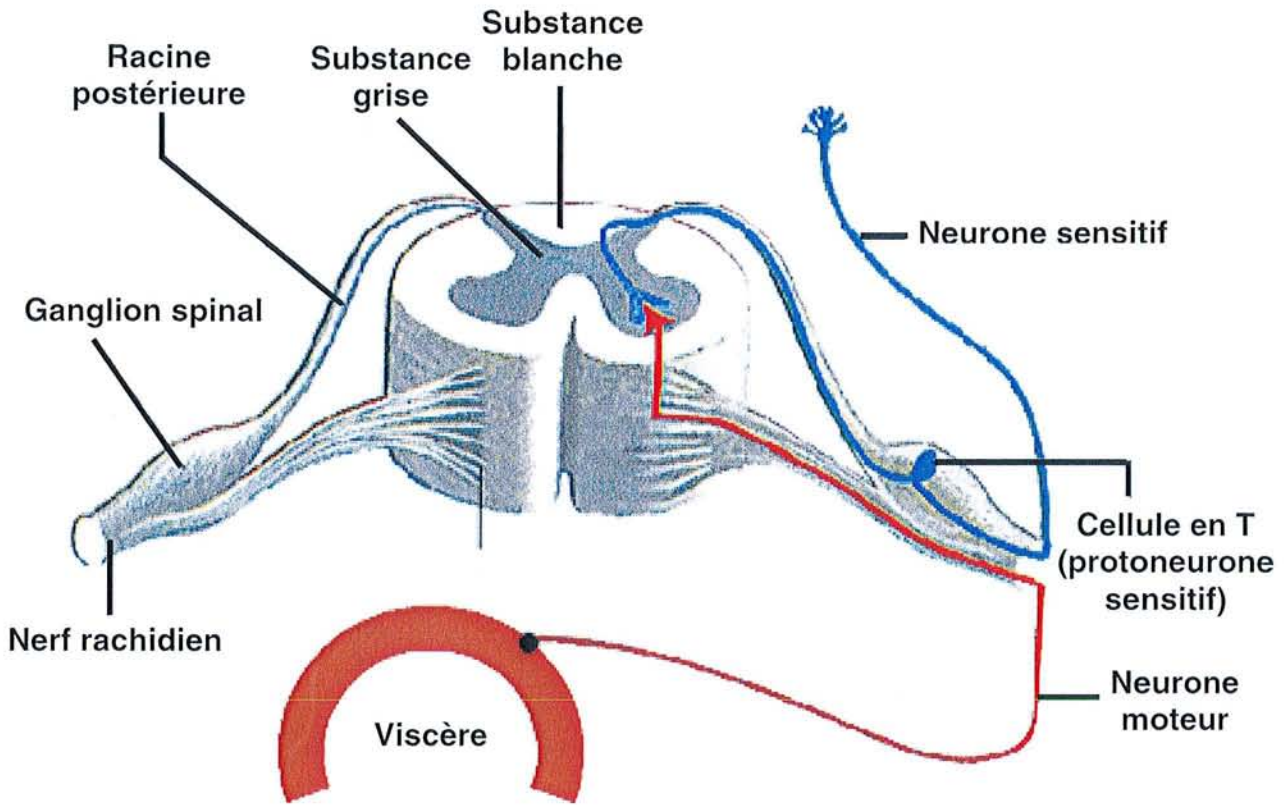
## Contrôle par les centres supérieurs Hypothalamus



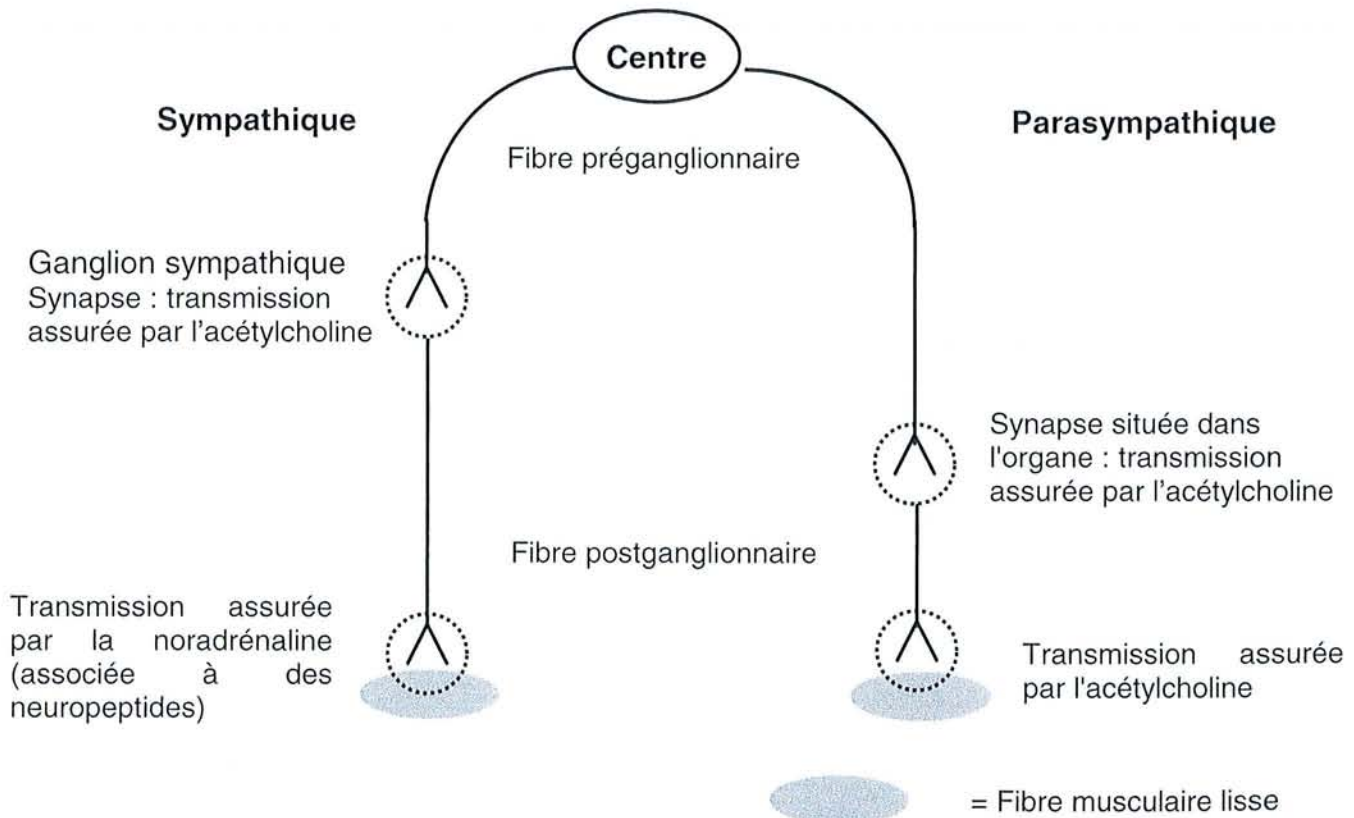
SNC : Efférences de nerfs appartenant au SNC : Système Nerveux Central

— Préganglionnaires — Postganglionnaires D = Dilatation R = Relâchement C = Contraction I = Inhibition, freination  
A = Activation, Accélération

**Figure 2 :** Systématisation du système nerveux sympathique : l'arc réflexe



**Figure 3 :** Les principaux neurotransmetteurs impliqués



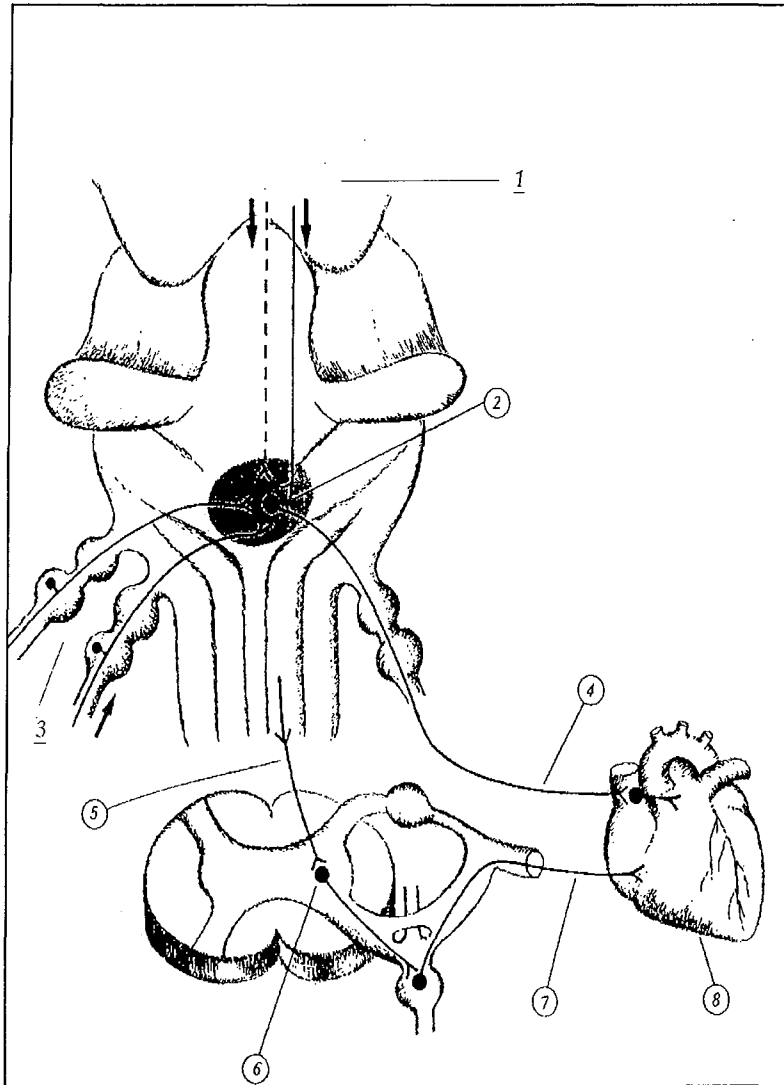


## **1.2. Spécificité de la régulation végétative du système cardio-vasculaire**

Le cœur a un fonctionnement automatique. Il est néanmoins soumis au contrôle du système nerveux autonome. L'organisation de ces deux systèmes est identique à celle de tous les organes. L'étage pré-ganglionnaire du système sympathique cardiaque est situé dans la moelle thoracique (région intermedio-lateralis), celui du parasympathique est constitué par le noyau du nerf vague ou pneumogastrique (X<sup>e</sup> paire crânienne) dans le bulbe rachidien. Le niveau post-ganglionnaire débute dans un ganglion cervical inférieur de la chaîne paravertébrale (ou chaîne sympathique), le ganglion stellaire. Pour le parasympathique, le niveau post-ganglionnaire est localisé dans le myocarde lui-même.

Au niveau périphérique, les fibres post-ganglionnaires sympathiques (les nerfs cardiaques) innervent des cellules myocardiques. Le transmetteur, la noradrénaline agit sur des récepteurs de type  $\beta$ -adrénergique et  $\alpha$ -adrénergique.

Les fibres post-ganglionnaires parasympathiques se terminent au niveau du nœud sinusal, du nœud auriculo-ventriculaire et du myocarde auriculaire. Pour le parasympathique, le transmetteur est l'acétylcholine qui agit sur les récepteurs muscariniques.



1 = influences suprabulbaires

2 = noyau moteur dorsal du nerf x

3 = barorécepteurs

4 = efférences vagales

5 = voies descendantes

6 = région intermedio-lateralis de la moelle épinière

7 = nerf cardiaque sympathique

8 = cœur

**Figure 4 : Organisation fonctionnelle du système nerveux autonome cardiaque (d'après Guerin *et al.* (182)).**

### 1.2.1. La régulation de la fréquence cardiaque

La fréquence cardiaque est déterminée par la fréquence intrinsèque du nœud sinusal. Les nerfs sympathiques accélèrent le rythme cardiaque (effet chronotrope positif) et renforcent la force de contraction (effet inotrope positif). Les fibres cholinergiques vagales ralentissent le rythme cardiaque (effet chronotrope négatif).

Le tonus vagal est prédominant. En effet le cœur dénervé bat à une fréquence élevée, environ 120 par minute. Le même effet est observé lorsque l'on bloque pharmacologiquement les deux systèmes, par l'atropine et un  $\beta$ -bloquant.

L'accélération du cœur résulte donc de la diminution de l'activité du parasympathique et de l'augmentation de l'activité adrénergique. Au-delà de la fréquence seuil de 120 battements/minute, le tonus vagal est totalement inhibé. Le ralentissement cardiaque nécessite l'inhibition rapide de la stimulation sympathique, dès que la fréquence diminue en dessous de 70 par minute.

D'autres facteurs peuvent moduler la fréquence cardiaque en modifiant l'activité du nœud sinusal comme la température du sang (tachycardie en cas d'hyperthermie et bradycardie en cas d'hypothermie) ou une altération du métabolisme local.

### **1.2.2. La régulation de la pression artérielle et le système nerveux autonome**

La pression artérielle varie avec le cycle cardiaque. La valeur maximale est atteinte au milieu de la systole cardiaque et la valeur minimale en fin de diastole.

La pression artérielle est régulée par différents mécanismes qui interagissent entre eux. Le système nerveux autonome est impliqué dans les "*mécanismes immédiats*" de régulation de la pression artérielle. Les points de stimulation sont les barorécepteurs, les chémorécepteurs (stimulés lors de l'hypoxie) et des centres vasomoteurs, stimulés lorsque la pression artérielle chute de façon importante. Les autres mécanismes d'action rapide sont humoraux, de type mécanique, comme le relâchement du tonus musculaire lisse vasculaire. Ils font intervenir l'activation de l'angiotensine, ou les échanges liquidiens dans les réseaux capillaires systémiques. Les mécanismes *d'action retardée* sont essentiellement hormonaux (aldostérone, hormone antidiurétique). Ces hormones agissent principalement sur le volume sanguin total, par le jeu de l'excrétion rénale de sodium et d'eau.

### **1.2.3. La régulation de la vasomotricité par le système nerveux autonome**

L'innervation des vaisseaux est uniquement assurée par le système sympathique qui entraînent un relâchement ou une contraction des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire (figure 5).

Les récepteurs adrénergiques vasculaires sont de 3 types. Les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques sont responsables d'une vasodilatation. La stimulation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques est à l'origine d'une vasoconstriction. Celle des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques situés au niveau du neurone présynaptique entraîne une réduction de la

libération de noradrénaline et donc une vasodilatation. Des récepteurs  $\beta_3$  seraient présents au niveau vasculaire chez l'homme (34). Leur rôle physiologique n'est cependant pas clairement établi.

La réponse vasculaire périphérique dépend donc essentiellement de la répartition des récepteurs  $\alpha_1$  et  $\beta_2$  et du neurotransmetteur. La stimulation sympathique induit généralement une augmentation des résistances périphériques. La noradrénaline a une activité  $\beta_2$  très faible, tandis que l'adrénaline stimule les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ .

#### **1.2.4. La régulation réflexe de la pression artérielle: rôle du baroréflexe**

La pression artérielle (P) est maintenue constante grâce aux modulations du débit cardiaque (Q) et des résistances systémiques (R) selon la loi de Poiseuille :  $P = Q \times R$  (516). Les modifications de la fréquence cardiaque et du tonus vasomoteur périphérique sont instantanées (figure 5).

Les variations tensionnelles entraînent des réactions correctrices ; il s'agit d'une *autorégulation par rétrocontrôle négatif*. Le circuit réflexe dépend du système nerveux autonome et a pour point de départ les barorécepteurs.

Les barorécepteurs sont localisés dans diverses régions du lit vasculaire, essentiellement dans le sinus carotidien, l'aorte et le cœur. Les nerfs afférents suivent le trajet du IX (nerfs provenant du sinus carotidien dits nerfs de Hering) et du X (nerfs provenant de la crosse aortique, dits nerfs de Cyon-Ludwig) jusqu'aux centres cardio-inhibiteur et vasomoteur.

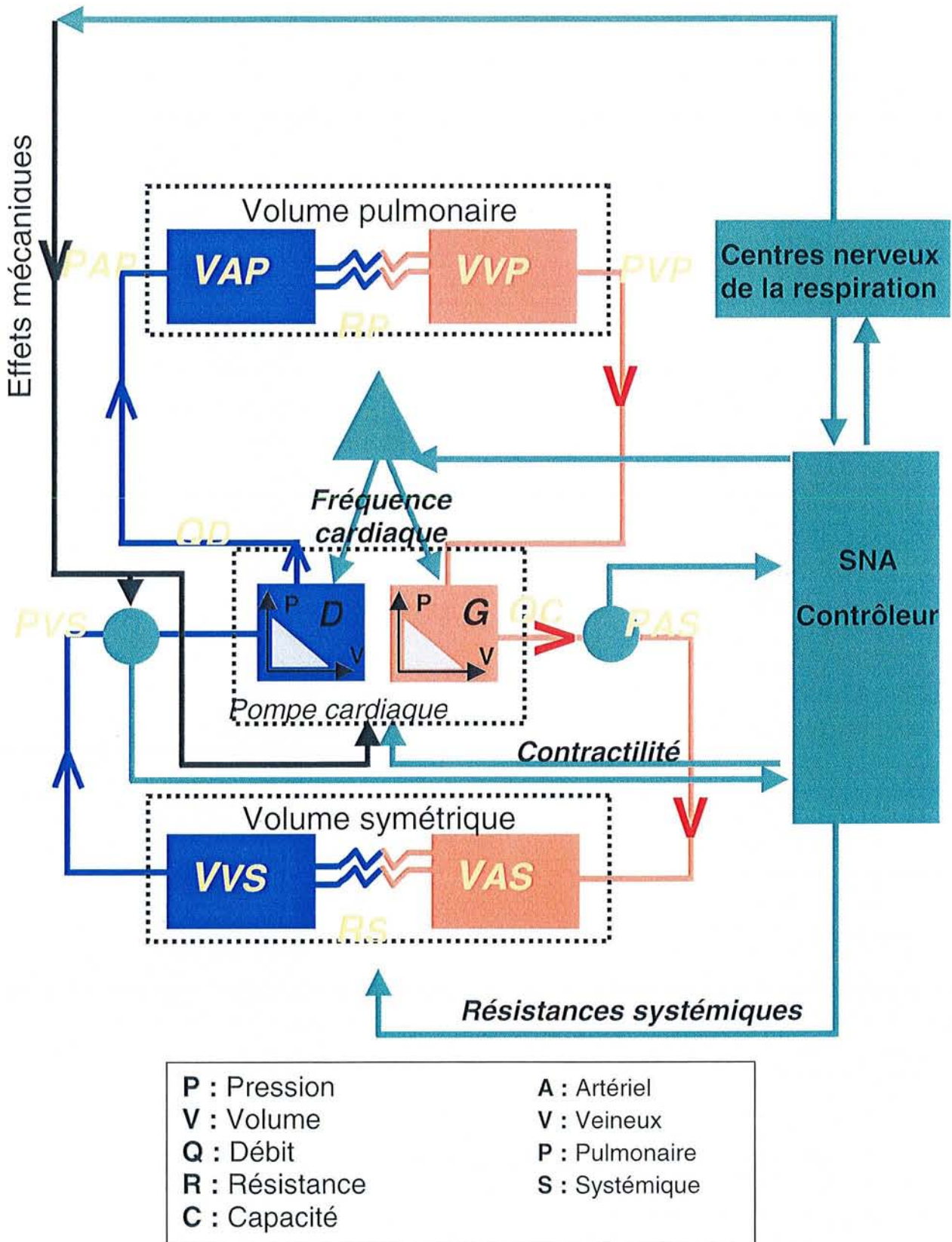
Les barorécepteurs sont sensibles à la tension développée dans la paroi artérielle. Ils réagissent proportionnellement à la pression endovasculaire selon la relation de Laplace.

Le seuil de stimulation des barorécepteurs (barosensibilité) varie en fonction de leur localisation. La fréquence de décharge de l'influx augmente avec l'augmentation de la pression artérielle.

Les centres cardiorégulateurs situés dans le noyau du tractus solitaire, sous le plancher du 4<sup>e</sup> ventricule, servent de relais du système sympathique et parasympathique.

Les noyaux médullaires sont le point de départ de la stimulation vagale (noyau ambigu pour la part vagale) et sympathique (noyau réticulaire latéral, noyau reticularis giganteo-cellularis).

**Figure 5 :** Le Système Cardiovasculaire et son contrôle par le SNA (modifié d'après G. Ouanounou, de l'INRIA, Rencontres INRIA-Industrie Neuilly/Seine 1997)



### **1.2.5. Le mode de fonctionnement du baroréflexe**

Les barorécepteurs ont un effet dépresseur. En situation stable, les impulsions émises par les barorécepteurs modèrent en permanence les centres de commande de la pression, en diminuant la fréquence cardiaque et en favorisant la vasodilatation (97).

En cas de chute de la pression artérielle, les barorécepteurs n'ont plus cet effet et les centres presseurs sont "libérés". Surviennent alors une tachycardie, une élévation du débit cardiaque et une vasoconstriction généralisée qui relèvent la pression jusqu'à ce que réapparaisse l'inhibition.

Toute élévation brutale de la pression aortique entraîne un accroissement notable de l'inhibition, une bradycardie et une vasodilatation et donc une baisse rapide de la pression artérielle.

Les récepteurs sont sollicités dans toutes les circonstances physiologiques. Par exemple lors du passage de la position couchée à la station debout, ils sont moins activés ce qui prévient la chute tensionnelle. Les récepteurs peuvent toutefois s'adapter en quelques jours au niveau de pression auquel ils sont soumis, mais ils n'ont donc pas d'effet sur la régulation à long terme de la pression artérielle.

### **1.3. Méthodes d'étude**

L'étude du système nerveux autonome (SNA) est particulièrement difficile chez l'homme, car ce système est complexe et peu accessible aux explorations (293). Les principales techniques permettant d'étudier le SNA sont :

- La mesure directe de l'activité des nerfs efférents : c'est la microneurographie (146).
- L'analyse des neurotransmetteurs par la mesure des concentrations sanguines ou urinaires des catécholamines.
- La méthode dite de "spillover" ou mesure de la noradrénaline qui est libérée par les tissus et déversée dans le plasma (143).
- L'analyse des fluctuations de la vasomotricité périphérique permet d'évaluer la réponse thermorégulatrice sympathique. Différentes méthodes évaluant le débit sanguin ont été proposées (la pléthysmographie, le gradient thermique ou laser-doppler (518)).

- L'analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle par analyse spectrale ou temporelle est une technique intégrant à la fois l'activité des nerfs efférents, sympathique et parasympathique et la réponse de l'organe cible.

Ces différentes méthodes d'exploration peuvent être couplées à des tests pharmacologiques, de blocage ou d'activation). L'analyse des variations de la fréquence cardiaque avant et après inhibition du système sympathique par un  $\beta$ -bloquant ou du système parasympathique par l'atropine permet d'évaluer le tonus vagal et sympathique cardio-vasculaire (20). Des tests de stimulation peuvent également être utilisés pour stimuler le SNS comme les stress physiques ou mentaux et le changement de position.

### **1.3.1. La microneurographie**

Une microélectrode est placée au contact du nerf sympathique et détecte directement les impulsions nerveuses. Les impulsions sympathiques sont de nature périodique de 10 secondes. Mais cette technique n'est applicable qu'aux nerfs accessibles : nerfs de la peau ou des muscles striés et d'autre par le sujet doit rester parfaitement immobile pendant l'enregistrement. La mesure de l'activité sympathique par microneurographie est corrélée à la mesure de la pression artérielle (541), et au niveau de la peau, à la vasoconstriction mesurée au niveau des doigts lors d'une exposition au froid (47).

Néanmoins, il n'y a pas toujours de concordance entre la mesure effectuée et la réponse de l'organe. Par exemple, lors d'une hypoglycémie, on observe une activation sympathique mesurable au niveau musculaire (42;146) mais celle-ci s'accompagne d'une vasodilatation, probablement due à la libération concomitante d'adrénaline (296). De la même façon, l'activité sympathique augmente après la prise d'un repas (43) ou lors d'une perfusion d'insuline (44), mais on constate une vasodilatation liée à l'effet propre de l'insuline sur les vaisseaux.

### **1.3.2. L'analyse des concentrations sanguines, urinaires ou plaquettaires des catécholamines**

Les mesures plasmatique ou urinaire de la noradrénaline ou de l'adrénaline permettent essentiellement d'évaluer l'activité de la médullosurrénale. Seule une faible proportion de la noradrénaline libérée par les nerfs sympathiques passe dans le plasma. Des études faites chez l'animal ont montré que la concentration en catécholamines plasmatiques pouvait être élevée, alors que l'activité des nerfs sympathiques était abolie (564). D'autre part, les échanges de catécholamines entre le plasma et les tissus sont bidirectionnels, la concentration plasmatique ne tient pas compte de l'importance de ces échanges.

La mesure des catécholamines dans le sang artériel ou la mesure des différences artério-veineuses pourrait être plus intéressante pour évaluer l'activité du SNS dans un territoire précis. Le sang veineux artérialisé pourrait donner des résultats comparables (275).

#### *La concentration urinaire des catécholamines*

Cette mesure a les mêmes inconvénients que l'analyse plasmatique. Elle peut toutefois donner un indice d'activité du SNS pendant un temps donné, durée pendant laquelle le sujet doit être en état stable. Toutefois, la marge d'erreur liée au dosage lui-même et le nombre d'amines à doser représente l'inconvénient majeur de ce paramètre.

#### *Les catécholamines plaquettaires*

La concentration de catécholamines présentes dans les plaquettes sanguines pourrait être un marqueur "intégrant" l'activité récente du SNS (96). Cette approche n'a pas été parfaitement validée.

### **1.3.3. La mesure du flux de noradrénaline libéré par les tissus dans le plasma**

La mesure du flux de noradrénaline libérée par les tissus peut se faire de façon indirecte en utilisant de la noradrénaline marquée. Cette approche permet d'évaluer la proportion de noradrénaline libérée par les tissus qui passe dans le plasma (143). Ce flux de noradrénaline serait proportionnel à la sécrétion de ce neurotransmetteur par les terminaisons nerveuses. C'est la mesure du « trop plein » synaptique.



La noradrénaline libérée par le nerf peut avoir plusieurs destinées. Elle peut être captée par le neurone efférent, être métabolisée dans la fente synaptique ou par le tissu et elle est alors libérée dans le plasma. Ce flux est proportionnel à l'activité neuronale à la condition que le métabolisme local de la noradrénaline soit stable (293).

Cette méthode nécessite l'utilisation d'isotopes. Elle permet d'évaluer l'activité sympathique globale ou localisée à un organe.

#### **1.3.4. La mesure de la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle.**

Le système cardiovasculaire est particulièrement sensible aux modifications d'activité du système nerveux autonome. En 1981, Akselrod *et al.* (6) publiaient un article sur l'analyse spectrale de la fréquence cardiaque et montraient qu'il existait une relation entre certaines fréquences du spectre et l'activité du système nerveux autonome. Les  $\beta$ -bloquants ou l'atropine ont ensuite été utilisés chez l'homme pour démontrer la spécificité de certains des pics du spectre de la fréquence cardiaque ou de la pression artérielle (194;367;389;436;545). L'association d'un blocage pharmacologique et d'une stimulation, (par exemple la position debout) permet de déterminer quelle est la composante impliquée dans la stimulation.

Cette analyse intéresse une composante restreinte du système nerveux autonome, celle à destinée cardio-vasculaire. Elle met en jeu de nombreux réflexes de régulation permettant l'homéostasie du système (figure 4).

La concordance des données obtenues par l'analyse spectrale et celles obtenues avec la microneurographie a conforté l'intérêt de cette méthode. Les variations de la fréquence cardiaque sont synchrones des variations des bouffées d'influx nerveux mesurées en microneurographie (523) (158). Par contre la concordance entre l'analyse des fluctuations de la fréquence cardiaque et la mesure de la libération de noradrénaline n'est pas établie, probablement en raison de l'hétérogénéité du fonctionnement du SNS selon le territoire concerné, rénal ou cardiaque (173). Nous décrivons dans le détail cette méthode que nous avons utilisée dans les trois études.

### 1.3.4.1. Les principes de l'analyse spectrale

La fréquence cardiaque et la pression artérielle sont soumises à des oscillations rythmiques, dues à l'action synergique des systèmes sympathique et parasympathique (6;439). Le système nerveux autonome agit par voie neuronale, humorale et mécanique (vasomotricité), pour maintenir l'appareil cardio-vasculaire dans un état de fonctionnement optimal.

L'analyse des variations de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle permet d'évaluer le niveau d'activité du SNA dans des conditions physiologiques ou pathologiques, en situation basale ou lors de stimulations. Plusieurs méthodes sont utilisées.

La première consiste à analyser la moyenne, la variance, les différences ou les ratios entre les périodes les plus longues et les plus courtes de l'intervalle qui sépare deux dépolarisations (intervalle RR) d'un électrocardiogramme; c'est l'analyse temporelle.

L'analyse plus précise de ces variations nécessite de recourir à des méthodes mathématiques. La transformation des courbes par la loi de Fourier permet de distinguer les variations de ces paramètres dans les différentes fréquences.

### 1.3.4.2. La transformation de Fourier

La *transformation de Fourier* consiste à décomposer un phénomène périodique complexe (*fluctuation*) en une somme de fonctions sinusoïdales (*oscillations*). Chaque oscillation constitutive est caractérisée par une période et une fréquence donnée (308).

Un signal périodique complexe peut être représenté par la somme d'une série de fonctions appropriées (fonctions sinus et cosinus).

La fonction  $R(t)$  sur l'intervalle  $(-L, L)$  peut être décrite de la façon suivante :

$$R(t) = \int ( A_n \cos n\pi t/L + B_n \sin n\pi t/L ) + C$$

En étendant l'intervalle de ces séries à l'infini et en utilisant la formule d'Euler :

$$e^{ix} = \cos (x) + i \sin (x)$$

on obtient l'expression suivante :

$$R(t) = \int r(f) e^{-2\pi i ft} df$$

qui correspond à l'intégrale de Fourier et la transformée de Fourier :

$$r(f) = \int R(t) e^{2\pi i ft} dt$$

Si les unités pour  $t$  sont des secondes (par exemple, si  $R(t)$  représente la fréquence cardiaque en fonction du temps), les unités pour  $f$  sont des cycles par seconde (ou Hertz) et  $r(f)$  décrit l'amplitude des fluctuations de fréquence cardiaque en fonction de la fréquence.

En pratique, l'utilisation de la transformée de Fourier est très complexe et requiert un temps d'intégration non négligeable. Pour  $N$  points, le nombre d'intégrations est de l'ordre de  $N^2$ . L'algorithme pour la transformée de Fourier rapide (fast Fourier transform, FFT) permet de réduire le nombre d'intégrations à  $N \log_2(N)$ .

La puissance totale qui représente l'information contenue dans un signal doit être la même, que le signal soit analysé dans le domaine temporel (secondes) ou dans le domaine fréquentiel (Hz), propriété connue sous le nom de théorème de Parseval. D'un point de vue mathématique, cela se traduit par la relation :

$$\text{Puissance totale} = \int |R(t)|^2 dt = \int |r(f)|^2 df$$

où  $R(t)$  est la fonction dans le domaine temporel (la suite d'intervalles RR) et  $r(f)$  la représentation du signal dans le domaine fréquentiel (puissance spectrale de la fréquence cardiaque).

Le spectre qui caractérise une fluctuation est représenté en abscisse, par une échelle de fréquence et, en ordonnée, par un indice dépendant de l'amplitude des oscillations.

La puissance totale du spectre de la fréquence cardiaque sur une bande de fréquence donnée correspond donc à la mesure de la variance de la fréquence cardiaque pour la période de temps considérée.

L'amplitude (racine carrée de la puissance) exprime la déviation standard de la fréquence cardiaque.

#### **1.3.4.3. Les spectres de pression artérielle et de fréquence cardiaque**

Si on applique le théorème de Fourier, une fluctuation constituée par une seule sinusoïde donnera un seul pic spectral.

Si les fluctuations sont la résultante de plusieurs oscillations, l'analyse spectrale permettra de dissocier ces oscillations sous la forme de pics localisés de fréquences distinctes. On peut effectuer la même analyse sur la courbe de pression artérielle enregistrée battement par battement. Les travaux de Sayers (439), et Akselrod *et al.* (6) ont clairement montré que l'analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque permet de déterminer des oscillations bien définies et susceptibles de donner des informations spécifiques sur les régulations physiologiques.

Les oscillations de Moyennes Fréquences (MF) sont représentées par un pic centré sur 0,100 Hz.

Les oscillations de Hautes Fréquences (HF), synchrones de la respiration, correspondent sur le spectre à un pic centré sur la fréquence respiratoire du sujet (période de 4 secondes ou fréquence de 0,250 Hz pour un sujet respirant à 15 cycles/minute).

Les oscillations de la pression artérielle résultent de la somme de plusieurs rythmes ou oscillations.

L'oscillation dite de *premier ordre* est déterminée par le cycle cardiaque. Comme il existe une concordance parfaite entre pulsation cardiaque et pression artérielle, on parle de *pression pulsatile*. Ce paramètre correspond à la variation physiologique de la pression artérielle, entre son niveau minimal en diastole et son niveau maximal en systole.

L'oscillation dite de *deuxième ordre* dépend du rythme respiratoire.

L'oscillation dite de *troisième ordre*, décrite par Mayer, est de nature vasomotrice.

La pression artérielle systolique varie spontanément de 5 à 10 mmHg en moyenne en position couchée. Les amplitudes de variations sont plus importantes en position debout, de 20 à 30 mmHg.

La pression thoracique négative durant l'inspiration entraîne une augmentation du retour veineux. La fraction d'éjection du ventricule droit est donc variable en inspiration et en expiration. Ce phénomène d'oscillation de la pression artérielle est connu sous le nom de *pouls paradoxal*.

#### 1.3.4.4. La signification des différentes bandes fréquentielles

##### **1) Les hautes fréquences : des oscillations dépendantes du parasymphatique et liées à l'arythmie respiratoire**

###### *Origine*

La fréquence cardiaque augmente à l'inspiration et diminue durant l'expiration. Le nerf vague (parasymphatique) à destinée cardiaque est principalement responsable de ce phénomène; sa stimulation est synchrone de la respiration.

Plusieurs facteurs génèrent l'arythmie respiratoire: 1) un réflexe à point de départ thoracique, lié à la traction des récepteurs pulmonaires, 2) la réponse cardiaque du baroréflexe secondaire aux variations de pression artérielle produites par les mouvements respiratoires, 3) les réflexes générés par la distension de l'oreillette droite, et 4) la modulation directe des centres du vague par les centres respiratoires. Ces oscillations dépendent essentiellement de l'innervation vagale du cœur. Elles sont donc en grande partie, le reflet du fonctionnement du système *parasymphatique* (203;367).

Le pic respiratoire disparaît progressivement parallèlement à l'augmentation de la fréquence cardiaque. Cependant, de très faibles doses d'atropine peuvent paradoxalement augmenter le pic des HF. L'atropine peut agir au niveau du système nerveux central et entraîner une libération d'acétylcholine en périphérie.

###### *Bandes de fréquences*

La fréquence respiratoire est généralement comprise entre 0,180 et 0,400 Hz. Les oscillations cardiaques situées dans cette bande de fréquence sont donc attribuées aux fluctuations respiratoires. Un consensus international (500) a permis de fixer les limites des hautes fréquences entre 0,150 et 0,400 Hz. On peut aussi restreindre cette bande de fréquences à une bande étroite de 0,050 Hz centrée sur la fréquence respiratoire, notamment lorsque l'on impose une fréquence respiratoire au sujet.

###### *Facteurs physiologiques modifiant les HF*

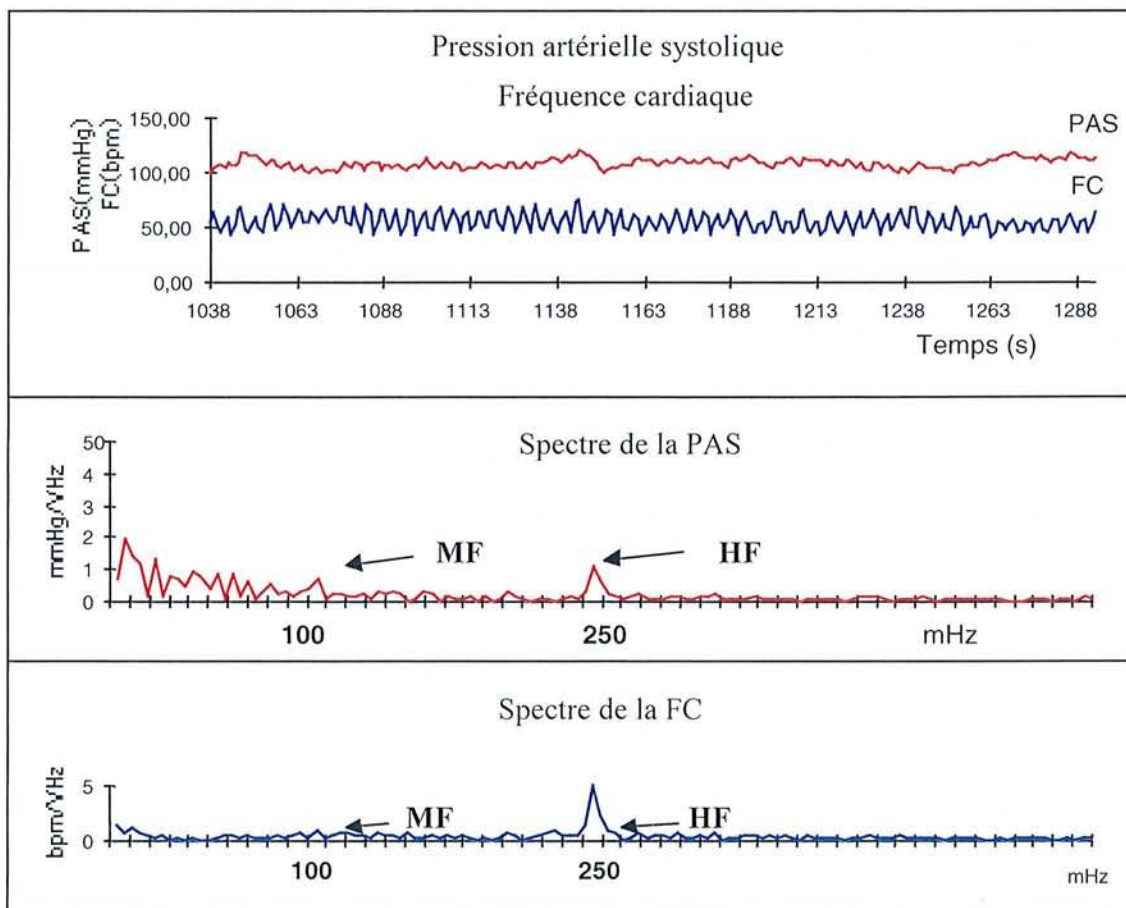
Les HF peuvent être affectées par des facteurs mécaniques de la fonction respiratoire, par la fréquence respiratoire et par les volumes respiratoires. Chez un même individu la puissance spectrale des HF diminue, avec l'augmentation de la fréquence respiratoire (40;436;437). Le volume respiratoire influence également cette composante (256). La respiration peut entraîner des oscillations de la fréquence cardiaque dans d'autres fréquences, notamment les MF. L'exemple le plus caractéristique est celui du

nourrisson qui présente des variations cycliques de l'amplitude respiratoire avec une fréquence proche de 0,1 Hz.

D'autres mécanismes peuvent aussi entraîner des variations de la fréquence cardiaque synchrones de la fréquence respiratoire. C'est ce que l'on peut observer lors d'une dénervation cardiaque, par exemple après transplantation (41). L'augmentation du retour veineux en phase inspiratoire peut expliquer ces variations en faisant varier la pression artérielle et la contractilité cardiaque.

*La puissance spectrale des HF représente un indice de fonctionnement du système parasympathique notamment lors d'une stimulation respiratoire. Les comparaisons interindividuelles nécessitent certaines précautions. Il faut vérifier que les principaux facteurs susceptibles de modifier les HF sont comparables dans la population étudiée.*

**Figure 3 :** Exemple de tracés et de spectres de la pression artérielle systolique et de la fréquence cardiaque (FC) d'un sujet sain, en décubitus et respirant à 15 cycles/min.



## **2) La composante sympathique: les oscillations de Mayer ou moyennes fréquences**

### *Origine*

Les oscillations décrites pour la première fois par Mayer ont une période d'environ dix secondes (0,100 Hz), cette période correspond à la période des stimulations sympathiques mesurées en microneurographie

De nombreuses hypothèses tentent d'expliquer ces oscillations. La théorie myogénique les attribuent à une activité rythmique spontanée des muscles vasculaires lisses. Elles pourraient aussi être générées par un oscillateur central (107), dépendre du baroréflexe (130) ou traduire un phénomène de résonance du système circulatoire, correspondant à des réponses périodiques à des perturbations aléatoires. Cependant il est clairement démontré que toutes les stimulations du système sympathique entraînent une augmentation de ces oscillations. Les épreuves de stress mental, la chute volumique (hémorragie), l'ischémie myocardique, conduisent à une augmentation de ces oscillations (227;301).

L'interprétation des MF a été l'objet de controverses. Pour certains auteurs (227;301;331;412), les MF pourraient être un marqueur des modulations sympathiques, notamment quand celles-ci sont exprimées en unités normalisées (u.n.). Pour d'autres, les MF pourraient dépendre des deux composantes, sympathique et parasympathique (6). L'origine des MF de la fréquence cardiaque serait à la fois centrale et liée au baroréflexe (107;177;184;331;332). La contribution du SNS est également démontrée pour les MF de la pression artérielle (543) mais celles-ci pourraient également dépendre des variations vasomotrices.

### *La composante vagale des MF*

L'inhibition de la composante vagale par l'atropine, entraîne une disparition des hautes fréquences et une diminution des MF (5;6;389). Après inhibition de la composante vagale, les variations observées de la fréquence cardiaque dans les moyennes fréquences dépendent donc du sympathique. Les expériences de double blocage ont permis de le démontrer (5;6) et de déterminer l'intervalle de fréquence spécifique de ces modulations (436). La variation de la fréquence cardiaque avant et après prise de  $\beta$ -bloquant est un premier indice. Ces médicaments réduisent les MF (326;367). Les changements de position (orthostatisme) modifient la variabilité de la fréquence cardiaque. Lors du passage en position debout, on observe une

augmentation de la balance sympatho-vagale. La composante MF de la variabilité augmente et les HF diminuent. La diminution du tonus parasympathique et l'augmentation du tonus sympathique permet de lutter contre l'hypotension orthostatique (301;367).

#### *L'Interprétation des MF en fonction des HF*

Pour interpréter les MF, on doit également tenir compte de la composante vagale de cette bande de fréquences, comme l'ont montré les expériences avec l'atropine (6;326;439;545). On peut envisager plusieurs situations théoriques en fonction des modifications des HF et des MF :

- Si on observe une augmentation des MF et une diminution des HF, alors l'augmentation des MF n'est pas lié à une stimulation vagale. Les sujets migraineux sont un exemple de cette situation. Chez ces sujets, on constate une stimulation marquée de l'activité sympathique, qui se traduit par une augmentation des MF sans changement des HF (388).
- Une réduction des MF associée à une absence de changement ou à une augmentation des HF, peut également être attribuée à une diminution de la composante sympathique.
- Si on observe une diminution à la fois des HF et des MF, la diminution des MF peut dans ce cas être liée à l'atteinte vagale sans que le sympathique ne soit en cause.
- Une augmentation concomitante des MF et des HF rend également l'interprétation des MF plus délicate, car on ne peut pas connaître précisément la part liée à la stimulation sympathique et celle liée à la stimulation vagale.

#### *Interprétation en fonction des fréquences*

Dans la bande fréquentielle des MF, on peut probablement distinguer plusieurs composantes. Le baroréflexe serait principalement responsable des variations fréquentielles entre 0,100 et 0,130 Hz (208). Les fréquences plus basses (<0,100 Hz) sont attribuées aux variations vasomotrices et à la thermorégulation. L'effet  $\alpha$ -adrénergique serait le principal responsable de cette composante, surtout pour la pression artérielle. Si on alterne une exposition au chaud et au froid, les fluctuations de la FC augmentent dans cette zone de fréquence (316). Ces fluctuations sont proches des variations liées au contrôle thermique.



## *Bandes de fréquence*

La plage de fréquence a été définie par consensus (500) de 0,040 Hz à 0,150 Hz. Néanmoins on peut aussi restreindre cette bande de fréquence entre 0,066 Hz et 0,129 Hz. Dans notre expérience, la bande 0,066-0,129 Hz serait plus spécifique du sympathique, pour la pression artérielle.

### **3) Les basses fréquences**

Les fréquences inférieures à 0,040 Hz sont les basses fréquences (very low frequency pour les anglo-saxons). Leur signification est plus hypothétique. Classiquement, elles sont attribuées à des composantes non-harmoniques. Cependant, certaines études ont montré que les basses fréquences sont modifiées lors de l'adaptation au froid (thermorégulation) et lors de la thermogénèse induite par des épices (capsaïcine) (316). Le pic fréquentiel serait en moyenne de 0,021 Hz et l'étendue de 0,007 à 0,047 Hz. Cependant, pour analyser cette bande de fréquences, l'enregistrement doit être d'une durée suffisante, au moins 1024 secondes. On se heurte alors à la difficulté d'obtenir un enregistrement stable pendant une période assez longue.

L'analyse des basses fréquences doit donc être prudente quand il s'agit d'enregistrement court (256 points).

*Il est indiscutable que les données issues de l'analyse spectrale à court terme, fournissent des informations spécifiques sur la régulation sympatho-vagale de la fréquence cardiaque (301). Il est cependant nécessaire d'analyser les résultats avec précaution.*

#### **1.3.4.5. Les facteurs physiologiques et pathologiques affectant la variabilité de la fréquence cardiaque**

Les puissances spectrales des différentes fréquences, MF et HF, peuvent varier en fonction de facteurs physiologiques, notamment l'âge.

La puissance spectrale totale diminue avec l'âge (du nourrisson au sujet âgé) alors que le ratio MF/HF varie peu. Chez le sujet âgé, on observe une augmentation moins importante du ratio MF/HF lors du passage de la position couchée à la position debout (367). Le pic de haute fréquence respiratoire diminue également avec l'âge. Les données sur les effets du sexe sont contradictoires (113;145;151;237;340;399;422).

*La variabilité de la fréquence cardiaque est altérée dans de nombreuses pathologies cardio-vasculaires comme l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque ou après infarctus du myocarde. Certains médicaments, comme les  $\alpha$ -bloquants, les inhibiteurs du système rénine angiotensine et les inhibiteurs calciques perturbent la variabilité de la PA et secondairement celle de la FC. Les pathologies touchant le SNA (diabète, maladies neurologiques) peuvent également modifier la variabilité de la FC. La rigidification des artères et l'augmentation des résistances vasculaires sont également responsables d'une diminution de la variabilité de la FC et de la PA.*

#### **1.3.4.6. L'expression des résultats**

Les très basses fréquences sont exprimées en valeur absolue ( $\sqrt{\text{Hz}}$ ). Les MF et les HF peuvent également être exprimées en valeur relative ou en unités normalisées (u.n.). On rapporte alors la puissance spectrale de ces fréquences à la puissance spectrale totale diminuée de la puissance des basses fréquences (301;367).

Les unités normalisées reflètent la part que représentent les MF ou les HF par rapport à la totalité de la puissance spectrale à l'exclusion des basses fréquences. Elles minimisent l'effet de l'augmentation ou de la diminution de la puissance spectrale totale. Elles doivent être interprétées en fonction de ses variations. Cependant, lors du tilt test, la variabilité totale peut diminuer, les MF exprimées en unités absolues peuvent baisser alors que leur contribution à la puissance totale augmente (300). Il est donc nécessaire d'exprimer les MF à la fois en valeur relative (rapportée à la puissance totale moins les basses fréquences) et en valeur absolue, ou de mentionner la puissance spectrale totale. L'analyse concomitante des fluctuations cardiaques et des influx nerveux par microneurographie ont montré que seules les MF en unités normalisées étaient reliées aux variations des influx nerveux en microneurographie (158;523).

#### **1.3.4.7. La balance sympatho-vagale**

Bien qu'il soit discuté par certains auteurs (129), le ratio MF/HF est considéré comme un bon indice de la balance sympatho-vagale (301). La composante HF donne un reflet satisfaisant de la composante vagale et ne pose donc pas de problème d'interprétation. Par contre la composante vagale des MF peut perturber l'interprétation de ce ratio, quand la composante vagale des MF est diminuée de façon sélective.

#### **1.3.4.8. La relation entre le tonus et l'analyse fréquentielle**

Les fluctuations de la FC ne sont pas directement le reflet de l'activité du SNA. Cependant on observe une corrélation entre l'intensité de la stimulation et l'importance des fluctuations (523). Cette relation n'est plus linéaire au-delà d'un certain seuil de stimulation; il y a alors un phénomène de saturation qui entraîne une atténuation des fluctuations et une diminution de la variabilité de la FC. C'est ce qui est observé au cours de l'effort physique (179;386).

La puissance spectrale est la résultante des effets du tonus, de ses fluctuations intrinsèques, des interactions entre les deux composantes neurologiques et de la réponse de l'organe impliqué (cœur ou vaisseaux). Il existe une concordance entre les modulations des MF liées au SNS et la fréquence des bouffées d'influx nerveux enregistrés au niveau des nerfs sympathiques (523).

#### **1.3.4.9. L'évaluation de la sensibilité du baroréflexe, méthode de l'analyse spectrale croisée (cross-spectrum)**

Les variations de la pression artérielle systolique provoquent des modifications de la fréquence cardiaque. Ces changements rapides sont liés à un arc réflexe, mettant en jeu des récepteurs sensibles à la pression (les barorécepteurs) des centres intégrateurs et une stimulation vagale ou sympathique. La vasoconstriction induite par l'injection d'adrénaline entraîne une augmentation de la PAS suivie d'une bradycardie réactionnelle (479). Il y a donc une concordance entre les variations tensionnelles et les variations de la fréquence cardiaque qui fluctuent avec un même rythme mais qui sont légèrement décalées dans le temps. La relation habituellement considérée comme linéaire entre ces variations est appelée le "*gain baroréflexe*".

Le délai entre la variation tensionnelle et la variation de la FC est de 1 à 2 battements. Le gain correspond à la pente de la courbe de régression entre ces deux variables. Il est exprimé en battements par mmHg ou en millisecondes d'intervalle R-R par mmHg. Le délai de réponse peut également être estimé.

On peut utiliser l'analyse spectrale pour déterminer la sensibilité du baroréflexe (335). Dans ce modèle mathématique, l'index quantifiant la sensibilité du baroréflexe est représenté par le module (ou gain) de la fonction de transfert entre les variations de pression et de fréquence cardiaque. Elle est habituellement déterminée dans la zone des moyennes fréquences.

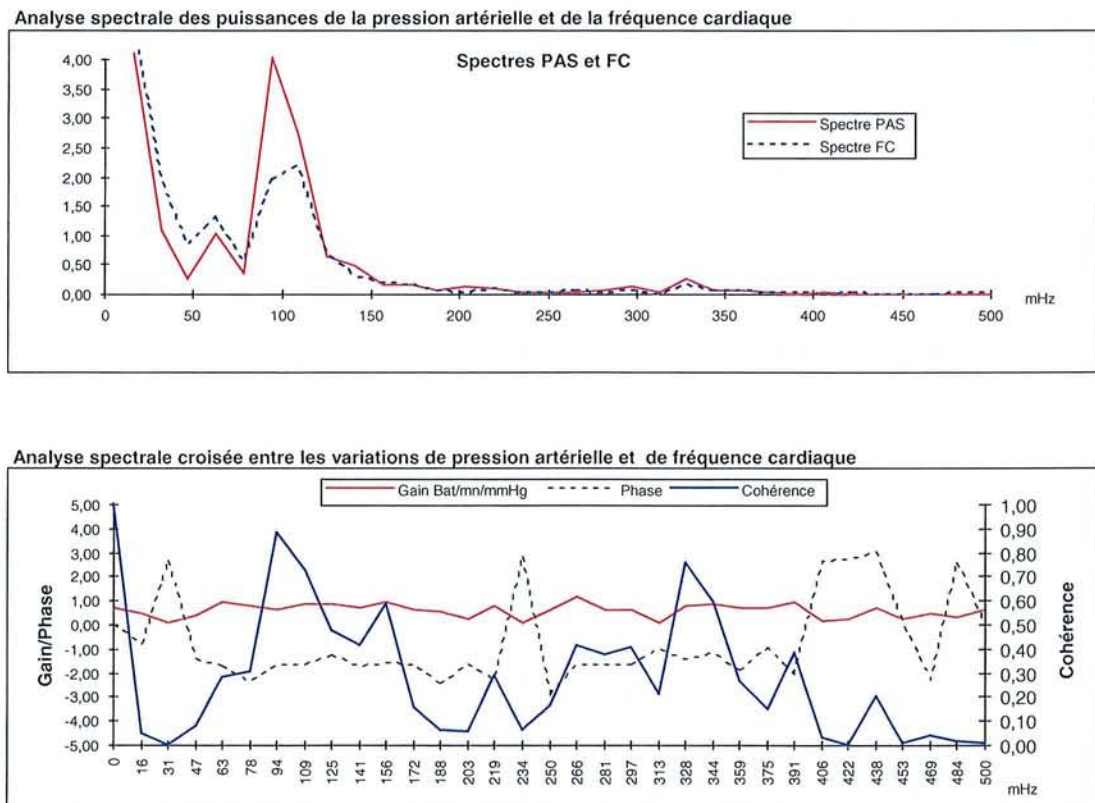
Un spectre croisé entre deux signaux (pression et fréquence cardiaque) est constitué de deux spectres: un spectre de cohérence et un spectre de phase.

Le spectre de cohérence exprime dans le domaine spectral, la proportion de relation linéaire entre deux signaux. La cohérence (élevée au carré) est une mesure comparable au coefficient de corrélation  $r^2$  utilisé en analyse de régression linéaire dans le domaine temporel. La cohérence évalue la corrélation entre les variations de 2 signaux (pression artérielle et fréquence cardiaque) à une fréquence donnée. Elle est comprise entre 0 (aucune relation) et 1 (relation maximale).

Le spectre de phase indique à chaque fréquence la différence de phase (retard ou avance) entre les deux signaux. La phase entre deux signaux ne peut varier qu'entre  $-180^\circ$  et  $+180^\circ$ . Si la cohérence est faible pour une certaine fréquence, la phase à cette fréquence ne peut être estimée de façon fiable.

L'étude du baroréflexe par analyse spectrale croisée a été validée chez l'homme par comparaison avec une méthode pharmacologique de référence (413).

**Figure 4 :** exemple de spectre et d'analyse spectrale croisée.



#### **1.3.4.10. Conclusion**

La variabilité de la FC et de la PA a montré son intérêt comme marqueur pronostique. La diminution de la variabilité de la FC est associée à une augmentation de la mortalité après infarctus du myocarde (46;244). Dans l'insuffisance cardiaque, elle est liée à une augmentation du risque de mort subite (309;390). Au cours du diabète, le risque de mortalité totale et cardiovasculaire double chez les sujets dont la variabilité de la fréquence cardiaque est diminuée (164).

La complexité de l'interprétation des données de la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle tient au fait que cette méthode est sensible aux variations d'activité (ou de tonus), mais aussi à la réponse de l'organe (cœur ou vaisseaux). Elle résulte à la fois des effets cardiaques et vasculaires périphériques du système nerveux autonome. Cette complexité fait aussi l'intérêt de cette méthode non invasive qui permet d'avoir un indice sur le fonctionnement du système nerveux autonome.

## 2. LA PLACE DU SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'OBESITE : LES MODELES ANIMAUX

### 2.1. *Modèles expérimentaux d'obésité hypothalamique*

Hetherington *et al.* (200) ont montré que la destruction du noyau ventro-médian de l'hypothalamus entraîne une hyperphagie et une obésité chez l'animal. Selon Anand et Brobeck (10) la destruction du noyau latéral s'accompagne d'une anorexie. Les principaux centres de la régulation de la prise alimentaire étaient ainsi décrits.

Cependant, dans ce modèle d'obésité, outre les effets sur la prise alimentaire, les systèmes sympathique et parasympathique périphériques paraissent jouer un rôle prépondérant. L'innervation végétative de la glande pancréatique semble essentiel puisque la vagotomie tronculaire empêche la constitution de l'obésité (210). Il en est de même pour l'innervation sympathique. La lipolyse du tissu adipeux (TA) peut être inhibée par la lésion du noyau ventro-médian favorisant ainsi la lipogénèse. Cet effet est lié à une défaillance du système nerveux sympathique, à la fois dans sa composante nerveuse et humorale (adrénaline) (68).

Inversement, l'augmentation de l'activité du SNS est associée à une baisse de la prise alimentaire et à une perte de poids (15;210). L'augmentation de l'activité du SNS conduit à une augmentation du métabolisme de base (491) et à une augmentation de la lipolyse du tissu adipeux.

La diminution de l'activité du SNS n'est pas présente dans tous les modèles d'obésité d'origine centrale. La lésion du noyau paraventriculaire entraîne le développement d'une obésité sans que l'on observe d'altération de l'activité du SNS (428;505). De la même façon, le système nerveux parasympathique ne serait pas activé dans ce modèle. La lésion du noyau paraventriculaire peut déclencher une obésité sans qu'il y ait d'altération du système nerveux périphérique. Au contraire, la lésion du noyau ventro-médian est responsable d'une obésité uniquement si elle est associée à une hypertonie vagale. Il faut noter néanmoins que, dans le modèle de lésion du noyau paraventriculaire, l'activité du SNS mesurée est peut-être plus faible que celle attendue, compte tenu du niveau d'hyperphagie entraînée par la lésion hypothalamique. En effet l'hyperphagie et la prise de poids peuvent être responsables d'une activation du SNS.

Les modifications de la régulation du système nerveux autonome observées dans ces modèles d'obésité centrale favorisent le stockage des nutriments sous forme de triglycérides. Elles orientent les acides gras vers le stockage dans le tissu adipeux.

## **2.2. Rôle de l'hyperinsulinisme dans le modèle d'obésité hypothalamique**

La lésion du noyau ventro-médian induit une diminution de l'activité du SNS et un hyperinsulinisme. Ces perturbations facilitent de façon conjointe la lipogenèse hépatique et le stockage des triglycérides. Elles favorisent aussi la réduction de la lipolyse du tissu adipeux.

L'hyperinsulinisme est lié à la diminution de l'activité du SNS et à l'hypertonie vagale. La perfusion d'adrénaline permet de diminuer la réponse insulinaire après l'ingestion de glucose. L'atropine inhibe en effet la sécrétion insulinaire stimulée par l'ingestion de glucose. Le blocage de ces deux systèmes, par l'atropine ou la vagotomie d'une part, et le blocage des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques d'autre part, suppriment l'hyperinsulinisme (27;45;415). Un effet trophique sur les îlots de Langerhans a également été observé dans ce modèle d'obésité (255). Une majoration du flux vasculaire des îlots liée à la diminution de l'activité sympathique et à une augmentation du tonus vagal peut participer à cet effet trophique et à la stimulation de la sécrétion insulinaire (218).

L'effet inhibiteur du SNS sur la sécrétion d'insuline est lié à la stimulation des nerfs splanchniques qui agissent par l'intermédiaire de récepteurs  $\alpha_2$  des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans. Cependant de nombreux autres peptides sont sécrétés en association avec la noradrénaline, ce sont des peptides stimulants ("Vasoactive intestinal peptide", cholécystokinine, "Gastrin-releasing peptide") ou inhibiteurs (Neuropeptide Y, galanine).

*En situation post-prandiale, la diminution de l'activité sympathique et de la stimulation vagale ont donc un effet synergique sur la stimulation de la sécrétion d'insuline. Les effets combinés d'une diminution de l'activité du SNS et de l'augmentation de l'insulinémie concourent à la prise de poids, en favorisant le stockage des acides gras, en diminuant la lipolyse du tissu adipeux et en réduisant les dépenses énergétiques sous forme de thermogenèse (79). L'hyperphagie est entretenue par la baisse de l'activité sympathique.*

*Ce modèle expérimental d'obésité est cependant propre à la lésion du noyau ventro-médian. La lésion du noyau paraventriculaire ou la déconnexion entre le noyau*

*paraventriculaire et le noyau ventro-médian conduisent à une hyperphagie, sans altération du SNS. L'hyperinsulinisme constatée est dans ce cas, secondaire à l'hyperphagie et non primitive comme dans la lésion du noyau ventro-médian.*

### **2.3. Action des molécules anorexigènes sur le système nerveux sympathique**

L'injection de noradrénaline dans le noyau ventro-médian, de NPY (132) dans le noyau paraventriculaire ou de  $\beta$ -endorphine (74;77) dans le troisième ventricule, conduit à une augmentation de la prise alimentaire et à une diminution de l'activité du SNS. Inversement, l'injection de sérotonine dans le noyau ventro-médian, de corticotropin-releasing hormone (132), de cholécystokinine (74;77) ou d'anorectine (16) dans le troisième ventricule, entraîne une diminution de la prise alimentaire et une stimulation du SNS.

La balance entre prise alimentaire et activité du SNS est aussi impliquée dans l'action de différents médicaments anorexigènes (la fenfluramine (288) l'amphétamine (286) ou le mazindol (286)). La nicotine (287) augmente l'activité du SNS et a un effet anorexigène faible. Le diéthylpropion (286) apparaît comme une exception puisqu'il est anorexigène mais ne modifie pas l'activité du SNS.

#### *La sibutramine*

La sibutramine a des effets noradrénergiques et sérotoninergiques. C'est un inhibiteur de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine inhibant rapidement chez l'animal, l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans le cerveau. Cette molécule présente l'intérêt de ne pas avoir les effets anti-histaminiques, anticholinergiques et anti-adrénergiques des monoamines tricycliques de première génération (85;289). La sibutramine a un effet inhibiteur sur la prise alimentaire en augmentant la satiété (213). Chez l'animal, la sibutramine augmente aussi la thermogénèse et le métabolisme de base. Cet effet, qui est lié à une stimulation de la thermogénèse du tissu adipeux brun par l'intermédiaire des *récepteurs  $\beta$ 3 adrénergiques* (276), est inhibé par les  $\beta$ -bloquants. Une stimulation du SNS interscapulaire par la sibutramine a été montrée chez l'animal (106).



Chez l'homme, la sibutramine active également le SNS et augmente la dépense énergétique. Plusieurs études ont montré que la perte de poids sous sibutramine était liée non seulement à un effet satiétogène prédominant, mais aussi à une augmentation de la dépense énergétique. Ainsi la diminution de la dépense énergétique liée à la perte de poids est moindre sous sibutramine que sous placebo. Cet effet pourrait être lié à une augmentation du tonus sympathique, qui se traduit par une augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle parallèlement à une augmentation des concentrations plasmatiques d'adrénaline (21;116;189;542).

### *Conclusion*

*A l'exception de la lésion du noyau paraventriculaire, dans tous les modèles expérimentaux d'obésité d'origine hypothalamique ou dans les études pharmacologiques, on constate une balance entre la diminution de l'activité du SNS et l'augmentation de la prise alimentaire et une balance entre l'augmentation de l'activité du SNS et la diminution de la prise alimentaire.*

### **3. SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE, PRISE DE POIDS ET OBESITE : LES DONNEES CHEZ L'HOMME**

Les modèles animaux d'obésité et les descriptions cliniques d'obésité d'origine hypothalamique, ont conduit Bray *et al.* (73) à étudier l'implication du système nerveux sympathique (SNS) dans la physiopathologie de la prise de poids. Cette hypothèse est résumée par l'acronyme MONA LISA (Most Obesities Known are low in Sympathetic Activity). Selon GA Bray, une activité sympathique anormalement faible pourrait prédisposer à l'obésité (68;70;72;73;75-77;80). Les arguments expérimentaux chez l'animal sont nombreux. Cependant chez l'homme, il existe très peu d'études prospectives permettant d'étayer cette hypothèse.

### **3.1. Rôle du système nerveux sympathique dans les obésités hypothalamiques chez l'homme**

Certaines lésions de l'hypothalamus sont responsables d'obésités très proches du modèle animal précédemment décrit (destruction du noyau ventro-médian) (71) (67;69;79). L'obésité peut être secondaire à des lésions tumorales (290) leucémiques (17;32), ou à un craniopharyngiome (419). D'autres étiologies comme l'hydrocéphalie (59;496), des lésions ischémiques (23) ou post-traumatiques (329) ont également été rapportées.

Ce type d'obésité s'accompagne d'un hyperinsulinisme dont le rôle dans la constitution de l'obésité est probable. En effet, l'inhibition de cette hypersécrétion par un analogue de la somatostatine, l'octréotide, permet une réduction pondérale, sans qu'il y ait pour autant d'apparition de diabète (290). Certains auteurs ont proposé une vagotomie pour limiter la prise de poids (478). Cependant on ne dispose d'aucune donnée concernant l'activité du SNS chez ces sujets, avant ou même après constitution de l'obésité.

Le syndrome de Prader-Willi s'accompagne d'une obésité secondaire à une sensation de faim incontrôlable. Cette pathologie résulte de la délétion ou de l'inactivation d'un ensemble de gènes de la région 15q12 du chromosome 15 paternel (167). La régulation de l'appareil cardio-vasculaire par le système nerveux autonome a été étudiée au cours de cette pathologie, après constitution de l'obésité (120). Aucune différence n'a été observée entre les sujets atteints de ce syndrome et les sujets atteints d'une obésité commune. Par contre une étude a mis en évidence une défaillance du système parasymphatique (75;121).

### **3.2. Système nerveux sympathique et régulation de la prise alimentaire**

Chez l'animal il a été démontré que l'augmentation du SNS périphérique est associée à une inhibition de la prise alimentaire (74;77). Chez l'homme, plusieurs études vont dans ce sens. Ainsi, Raben *et al.* (395) ont mis en évidence une forte corrélation entre l'impression de satiété post-prandiale et l'importance de la réponse noradrénergique ( $r = 0,97$ ,  $p < 0,01$ ). Cet état de satiété est d'autant plus important que le repas est riche en glucides ( $r = 0,86$ ,  $p < 0,05$ ).

Le mécanisme de l'effet satiétogène du SNS n'est pas élucidé. La stimulation des récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques localisés dans le noyau ventro-médian de l'hypothalamus serait en cause, mais aussi les récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques et/ou  $\beta_3$  périphériques (77). Chez l'animal, les agonistes  $\beta_3$  adrénergiques ont un effet anorexigène qui disparaît chez l'animal n'exprimant pas le  $\beta_3$  (180).

L'effet anorexigène du tabac et l'augmentation de la dépense énergétique observée chez les fumeurs pourraient être expliqués par l'effet stimulant de la nicotine sur le SNS (192;559). De même, l'effet de la caféine et de l'éphédrine sur la perte de poids serait lié à cette stimulation (125;504).

### **3.3. *Système nerveux sympathique et dépense énergétique***

Les variations interindividuelles de la dépense énergétique totale de 24 heures rapportées à la masse maigre pourraient dépendre en grande partie de l'activité du SNS. Le système sympathique régule le métabolisme basal, la thermogénèse post-prandiale et la dépense liée à l'activité physique spontanée.

La dépense énergétique des 24 heures est significativement corrélée à l'excrétion urinaire de noradrénaline et à l'activité des nerfs sympathiques mesurée par microneurographie (424) ( $r = 0,78$ ,  $p < 0,001$ ). Cette relation pourrait ne pas être présente dans certaines populations à haut risque d'obésité comme les Indiens Pima ( $r = 0,03$ ;  $p = \text{NS}$ ) (424). Or dans cette population le tonus du SNS semble altéré de même que la réactivité du SNS à la stimulation insulinique (484;486). La prévalence élevée de mutation du récepteur  $\beta_3$  dans cette population pourrait expliquer en partie l'absence de relation entre l'activité mesurée du SNS et la dépense énergétique (403).

A contrario, les  $\beta$ -bloquants entraînent une prise de poids des animaux de laboratoire (31). Chez l'homme, ils sont responsables d'une baisse de la dépense énergétique journalière, liée à une baisse du métabolisme de base et à une diminution de la thermogénèse post-prandiale. Cet effet est minime, mais il peut expliquer une prise de poids progressive. Ainsi, Acheson *et al.* (1) ont montré qu'un traitement par propranolol pris pendant une durée de 15 jours était susceptible de rendre positive la balance des lipides et de diminuer significativement la dépense énergétique des 24 heures. Ce déficit de 50 à 100 kcal par jour est susceptible de provoquer une prise de

poids de 2 à 5 kg par an. Ces chiffres sont conformes aux effets pondéraux constatés dans les études cliniques (26;311;418).

Dans une étude prospective, 63 Indiens Pima ont été suivis pendant 10 ans. L'activité du SNS avait été évaluée, au début de l'étude, par la concentration en noradrénaline dans les urines de 24 heures. Les auteurs ont montré l'existence d'une relation entre la prise de poids sur 10 ans et le niveau de ce marqueur (501). Astrup *et al.* (22) ont également trouvé une relation positive entre la perte de poids de femmes obèses suivies pendant 36 semaines, et les mesures initiales du métabolisme de base et de la concentration en noradrénaline.

### **3.3.1. Le métabolisme de base et la prise de poids**

#### *Action des catécholamines sur le métabolisme de base*

La perfusion d'adrénaline (295) ou la prise de terbutaline (agoniste  $\beta$ 2-adrénergique) (53) entraîne, chez l'homme, une augmentation du métabolisme de base. La concentration d'adrénaline permettant d'obtenir un tel effet est proche de celle qui active la lipolyse du tissu adipeux. Il existe peu de données chez l'homme sur le rôle du SNS dans la régulation du métabolisme de base (99;424;510). Dans deux d'entre elles (424;510), les auteurs ont mis en évidence une relation entre l'activité du SNS, évaluée par le dosage plasmatique ou urinaire de noradrénaline, et le métabolisme de base rapporté à la masse maigre. Dans la troisième étude (99), le métabolisme de repos était corrélé à l'activité du SNS mais cette relation n'était plus significative après ajustement sur la masse maigre. Par conséquent, l'activité du SNS pourrait expliquer, au moins en partie, les différences de métabolisme de base constatées entre des individus de même masse maigre. Les variations de dépenses énergétiques seraient voisines de 180 kcal/j, entre des sujets ayant une activité sympathique élevée ou basse.

#### *Effets des $\beta$ -bloquants sur le métabolisme de base*

Le métabolisme de base diminue de 3 à 4 % sous  $\beta$ -bloquants (propranolol) (1;53;86;424;510). Néanmoins cette diminution ne pourrait concerner que des individus ayant une activité sympathique élevée. Ainsi, Saad *et al.* (424) ont montré chez 36 sujets d'origine caucasienne et 32 Indiens Pima que le propranolol (120  $\mu$ g par kg de masse maigre en bolus puis 1,2  $\mu$ g par kg de masse maigre et par minute pendant 45

minutes) entraînait une diminution du métabolisme de repos uniquement chez les sujets d'origine caucasienne. Cette absence de diminution du métabolisme de repos chez les Indiens Pima serait liée à la baisse du tonus sympathique mesurée par microneurographie par rapport à des sujets caucasiens de même poids. Leur métabolisme de base est plus faible et ils ont une réactivité plus faible du SNS en réponse à l'ingestion de glucose (484;486). L'activité du SNS pourrait donc varier selon des facteurs ethniques ou génétiques.

### *Métabolisme basal et risque de prise de poids*

Ravussin *et al.* (405) ont montré, dans une étude prospective de 4 ans, que le niveau initial du métabolisme de base peut déterminer le risque d'obésité. En effet, le métabolisme basal exprimé par kilogramme de masse maigre, est variable d'un individu à l'autre (28 à 32 kcal/kg de masse maigre, après ajustement sur l'âge et le sexe).

Le risque d'avoir un gain de poids de plus de 7,5 kg est multiplié par 4 pour les sujets ayant un métabolisme de base plus bas de 200 kcal par rapport à la valeur prédite. Le métabolisme de repos est également le principal facteur prédictif d'augmentation de masse grasse pendant la grossesse (236) ( $r = -0,65$ ,  $p < 0,05$ ).

Le niveau du métabolisme de base pourrait être en grande partie génétiquement déterminé (61). Ravussin *et al.* (405) ont montré qu'il existe une forte influence familiale sur la dépense énergétique (corrélation intra classe = 0,48). Ces variations pourraient être liées en partie au niveau d'activité du SNS.

Il est possible d'augmenter la dépense énergétique d'un animal grâce à une perfusion intra-veineuses de catécholamines. Les sujets obèses auraient une résistance aux catécholamines qui ne leur permettrait pas d'augmenter leur dépense énergétique. Ainsi, pour augmenter la dépense énergétique de repos de 15 % les doses de catécholamines à perfuser augmentent avec la masse grasse du sujet (54). Cette résistance aux catécholamines, également retrouvée au niveau du tissu adipeux est liée à une diminution de la réponse des récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques (448).

L'étude du SNS de sujets post-obèses pourrait être intéressante s'il était démontré que le retour à un poids normal était associé à celui de l'état physiologique. Cela est discuté car l'influence de la restriction alimentaire peut être rémanente et ce d'autant plus que les études sont faites après une période de stabilité pondérale limitée. Néanmoins, une méta-analyse de 12 études montre que la dépense énergétique de

repos pourrait être plus basse de 3 à 5% chez les sujets post-obèses que chez des sujets n'ayant jamais présenté d'obésité (24).

*Les variations d'activité du SNS pourraient donc expliquer en partie les différences du métabolisme basal entre individus, qui peuvent atteindre 200 kcal/jour, pour une masse maigre de 50 kg.*

### **3.3.2. La thermogénèse post-prandiale et la prise de poids**

Il existe une relation bien établie entre la thermogénèse post-prandiale et les indices d'activité du SNS. Après un repas de 800 kcal à haute teneur en glucides (459), la dépense énergétique augmente ( $0,18 \pm 0,09$  kcal/min) parallèlement à la concentration en noradrénaline ( $44 \pm 39$  pg/ml). Dans ce travail, les différences entre les concentrations de noradrénaline post-prandiales et basales ( $0,11 \pm 0,09$  µg/min) étaient corrélées à l'augmentation de la dépense énergétique ( $r = 0,57$ ;  $p < 0,01$ ).

La clonidine, qui agit au niveau du système nerveux central, diminue l'activité du SNS. Cette action s'accompagne d'une diminution de la thermogénèse post-prandiale (460). Le SNS semble donc intervenir dans la régulation de celle-ci.

Selon la taille et la composition du repas en glucides, le SNS pourrait expliquer 30 à 40 % de la thermogénèse post-prandiale. La ration glucidique de l'alimentation pourrait également influencer la dépense énergétique de repos. En effet, à ration calorique égale, si on compare une alimentation hyperglucidique à une alimentation normoglycémique ( $62\% \pm 5\%$  vs  $51\% \pm 6\%$ ), les sujets ayant l'alimentation la plus riche ont une dépense énergétique de repos plus élevée de 11% ( $1,29 \pm 0,15$  vs  $1,16 \pm 0,13$  kcal/min,  $p < 0,01$ ) et une concentration en noradrénaline plus élevée ( $216 \pm 33$  vs  $165 \pm 18$  pg/ml,  $p < 0,01$ ). Cela est vrai aussi pour la demi-vie d'élimination de la noradrénaline ( $0,50 \pm 0,08$  vs  $0,36 \pm 0,09$  µg/min ;  $p < 0,01$ ) (509). Chez l'animal, les lipides induisent également une stimulation du SNS alors que paradoxalement les protéines sont sans effets (229;456). Il est néanmoins démontré que le signal permettant cette stimulation est l'insuline (424;536).

La composition de l'alimentation en macronutriments pourraient donc théoriquement avoir des répercussions sur l'activité du système nerveux sympathique et sur la dépense énergétique totale du sujet. Or l'hyperactivité sympathique est impliquée dans l'hypertension artérielle. La composition de l'alimentation en macronutriments pourrait

donc avoir des répercussions sur le contrôle tensionnel. Certaines expériences chez l'animal le montrent. En effet, la pression artérielle diminue lors d'une restriction calorique (560) alors que l'ajout de saccharose augmente la pression artérielle de rats spontanément hypertendus (562). L'augmentation de la dépense énergétique constatée lorsque l'alimentation est riche en glucides, semble néanmoins s'estomper rapidement (118).

La thermogénèse post-prandiale représente environ 10 % de la dépense énergétique totale. Elle dépend en partie de l'activité du SNS, qui est stimulé par l'insuline. Une baisse de cette dépense énergétique pourrait contribuer au déséquilibre de la balance énergétique, comme les données prospectives le suggèrent (294). Cependant, la contribution de la thermogénèse post-prandiale à la dépense énergétique est probablement trop faible pour qu'il soit possible de démontrer sa responsabilité sur la prise de poids.

### **3.3.3. Le système nerveux sympathique et l'activité physique spontanée**

Il existe de grandes variations interindividuelles dans la prise de poids. Ainsi, pour un apport excédentaire de 1000 kcal/j, les deux tiers de l'excès énergétique pourraient être dissipés sous forme de chaleur. La réponse à la suralimentation dépend essentiellement des variations compensatrices de l'activité physique spontanée et du tonus musculaire. Ces variations sont associées aux variations de l'activité du SNS (269;528). L'activité physique spontanée pourrait représenter une dépense énergétique de 100 à 800 kcal/jour (404).

Les sujets qui "gigotent", ne restant pas en place, ont donc une dépense énergétique plus importante que les sujets plus calmes.

### **3.3.4. Le système nerveux sympathique et l'exercice physique**

Le SNS est activé au cours de l'exercice physique. Ce phénomène n'a pas de conséquence sur la dépense énergétique, puisque les  $\beta$ -bloquants ne réduisent pas l'énergie dépensée pendant l'effort. De même, l'augmentation de la dépense énergétique enregistrée après l'effort n'est pas modifiée par les  $\beta$ -bloquants (63).

### **3.3.5. Le système nerveux sympathique et l'oxydation des acides gras**

L'activité du SNS pourrait influencer le type de macronutriments oxydés. La perfusion d'isoprénaline est suivie d'une diminution du quotient respiratoire (55;57), traduisant une augmentation de l'oxydation des lipides. De plus il existe une relation entre l'activité du SNS mesurée par microneurographie et le quotient respiratoire moyen des 24 heures, relation qui est indépendante de la masse grasse.

Une activité faible du SNS serait donc associée à une diminution de l'oxydation des lipides. La noradrénaline stimule la lipolyse et l'oxydation des acides gras par le muscle. Les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  sont tous les deux impliqués, puisque la dobutamine (agoniste  $\beta_1$ ) (449) et le salbutamol (agoniste  $\beta_2$ ) (448) ont les mêmes effets.

Inversement, le propranolol ( $\beta$ -bloquant) entraîne une augmentation du quotient respiratoire (56), traduisant une diminution de l'oxydation des lipides.

Le mécanisme de cette stimulation est discuté. Les catécholamines pourraient ne pas être impliquées directement dans la régulation de l'oxydation des acides gras par le muscle mais pourraient jouer un rôle indirect en augmentant de façon importante le flux vasculaire (54;55). Cet effet est lié aux récepteurs  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  responsables d'une vasoconstriction, et aux récepteurs  $\beta_2$  responsables d'une vasodilatation (34). Le rôle du récepteur  $\beta_3$  vasculaire n'est pas défini chez l'homme.

*Ces études indiquent que le niveau d'activité du SNS influence le type de substrat oxydé. In vivo, chez l'homme, le système vasculaire a une forte influence sur la libération des acides gras par le tissu adipeux et sur leur disponibilité pour le muscle.*

### **3.4. Prédilection génétique et prise de poids : polymorphisme des gènes impliqués dans la réponse adrénergique**

L'analyse des liaisons entre l'indice de masse corporelle ou la masse grasse et les polymorphismes génétiques des récepteurs adrénergiques a été réalisée dans plusieurs études.



Une association a été observée entre la graisse sous-cutanée et certains polymorphismes du récepteur  $\alpha 2$ -adrénergique. Mais aucune liaison n'a été mise en évidence avec les polymorphismes des gènes des récepteurs  $\beta 2$  et  $\beta 3$  (360).

Les études concernant la liaison entre l'obésité ou la masse grasse et le polymorphisme des récepteurs  $\beta 3$  sont contradictoires (95), Le rôle de ce récepteur ne semble donc pas majeur chez l'homme.

Néanmoins l'association d'un polymorphisme du récepteur  $\beta 3$  (Trp64Arg) et d'un polymorphisme de la protéine UCP1 (AG) pourrait expliquer une diminution du métabolisme de base de 79 kcal/jour, alors que chacun de ces polymorphisme n'avait pas d'effet indépendant (520).

Les preuves sont plus convaincantes pour le récepteur  $\beta 2$ . Dans une étude suédoise (254), deux polymorphismes du récepteurs  $\beta 2$  étaient liés, l'un à la masse grasse et l'autre à une augmentation de l'affinité de ce récepteur pour son agoniste. Le premier polymorphisme Gln27Glu était associé à une augmentation importante du risque d'obésité (risque relatif de 7). Les sujets homozygotes avaient en moyenne une masse grasse supérieure de 20 kg et des adipocytes plus larges de 50 %.

Une autre étude a mis en évidence une association entre ce polymorphisme et une augmentation de la graisse abdominale, uniquement chez les hommes, avec un odd ratio de 4,08 (108). Au Japon, ce polymorphisme est également plus fréquent chez les femmes comme chez les hommes obèses (211;334).

Par contre les polymorphismes du récepteurs  $\beta 2$  ne semblent pas impliqués dans l'obésité morbide (238;351).

Une étude d'intervention semble confirmer le rôle du polymorphisme du récepteur  $\beta 2$  dans l'obésité (513). Dans cette étude, douze paires de jumeaux ont été soumis à un régime hypercalorique excédentaire de 1000 kcal/j 6 jours sur 7 et pendant 100 jours. Les jumeaux porteurs du polymorphisme Gln27Gln ont pris plus de poids, plus de graisse sous-cutanée et ont diminué de façon plus importante leur sensibilité à l'insuline. Une différence identique a été constatée chez les sujets porteurs du variant 3.7/3.4 kb BanI.

Le deuxième polymorphisme Arg16Gly favoriserait, *in vitro*, la désensibilisation du récepteur. Il n'était pas associé à l'obésité dans l'étude suédoise (254). Par contre dans l'étude québécoise "Quebec Family Study (QFS)", l'allèle Arg était plus fréquemment retrouvé chez les hommes ayant une obésité sévère (IMC > 35 kg/m<sup>2</sup> : 49 %) que chez les hommes dont l'IMC était inférieur à 35 kg/m<sup>2</sup> (33 % ; p = 0,010). Dans une autre

étude (108), la liaison entre ce polymorphisme et l'obésité augmentait avec l'âge. Par conséquent, ce facteur génétique favoriserait la prise de poids chez les hommes, entre l'enfance et le début de l'âge adulte (32 ans). Ce polymorphisme est également plus fréquent chez des sujets qui ont une prise de poids récente (527). Enfin, l'allèle Arg16 est associé chez la femme à une augmentation de l'IMC, une diminution des acides gras libres plasmatiques et à une meilleure inhibition de la lipolyse lors d'une charge en glucose (324).

L'association de ces deux polymorphismes pourrait majorer le risque d'obésité comme le montre une étude française (323). De façon surprenante, ce sont les sujets Gln27Gln qui présentaient un risque accru d'obésité avec un odd ratio de 1,77 dans toute la population (95 % 1,2-2,6 ; p = 0,005), et de 2,4 chez les hommes (OR = 2,40 ; 95 % CI 1,34-4,27 ; p = 0,003). Lorsque Gln27Gln était associé à l'allèle Arg16 ce risque était majoré.

*Ces études montrent que le polymorphisme du récepteur  $\beta$ -2 pourrait être l'un des facteurs pouvant expliquer un déséquilibre de la balance énergétique. Elles soulignent l'intérêt de prendre en considération l'étude du système nerveux sympathique parmi les facteurs pouvant favoriser la prise de poids. Néanmoins, leurs conséquences fonctionnelles ne sont pas claires.*

### **3.5.      Activité du SNS au cours de l'obésité**

Le niveau d'activité du SNS de sujets obèses a été comparé à celui de sujets témoins dans trente-cinq études différentes (563). Les principaux marqueurs d'activité utilisés étaient les dosages de catécholamines plasmatiques ou urinaires. Les résultats sont très variables d'une étude à l'autre puisque dans un tiers d'entre elles il existait une augmentation des indices du SNS, un tiers montrait une diminution et un tiers une absence de différence. Cependant une diminution des concentrations en adrénaline a été retrouvée dans la majorité des études. On peut trouver plusieurs explications à cette discordance. La faiblesse du tonus ou de la réactivité du système sympathique est un des nombreux mécanismes incriminés dans l'obésité. Compte tenu de la diversité des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de celle-ci, la défaillance du SNS n'est sans doute ni une condition nécessaire ni une condition suffisante au stockage excessif des lipides. La diversité des phénotypes d'obésité et des populations étudiées, leur origine ethnique, est une première explication.

La prévalence de l'hypertension artérielle dans la population étudiée en est une autre. L'hypertension artérielle du sujet obèse est en partie liée à une augmentation du tonus sympathique (251). Il est donc peu probable de trouver une diminution du tonus sympathique chez ces sujets. Par contre, dans les populations obèses où la prévalence de l'hypertension artérielle est très faible, l'activité sympathique est basse. C'est le cas des indiens Pima (546) ou de certains sujets de race noire (425). Il est toutefois possible que dans les populations d'origine caucasienne sélectionnées dans ces études, certains sujets présentent un phénotype d'obésité proche de celui des indiens Pima.

Les méthodes d'évaluation du SNS peuvent également être mises en cause. Les mesures de concentrations plasmatiques de catécholamines sont un mauvais reflet de l'activité du SNS. Celle-ci dépend non seulement de la libération des catécholamines mais aussi de leur captation par les tissus et de l'efficacité de la transmission du signal.

Parmi ces études, il faut relever celle de Peterson *et al.* (381). Ces auteurs ont trouvé une relation négative entre différents indices d'activité du SNS (dont les concentrations plasmatiques d'adrénaline, de noradrénaline), et la proportion de masse grasse. Tous les sujets inclus dans cette étude avaient une pression artérielle normale et tous les facteurs pouvant interférer avec l'activité du SNA étaient des facteurs d'exclusion ou d'ajustement. Seuls 55 sujets sur 450 ont été finalement inclus.

Toutefois, cette étude est remise en cause par des travaux récents basés sur la mesure de la quantité réelle de catécholamines libérée par les tissus (méthode du spillover) et sur la microneurographie (4;174;529). Ces deux techniques ont permis de montrer qu'il existe une augmentation de l'activité du SNS chez le sujet obèse.

Grâce à des tests pharmacologiques, Aronne *et al.* (20) ont également montré que l'activité du SNS est plus élevée chez les sujets obèses que chez les sujets de poids normal. La prise de poids (10 % du poids initial) de sujets non obèses s'accompagne d'une augmentation de l'activité du SNS. Inversement, la perte de poids de sujets obèses est associée à une diminution de cette activité.

L'augmentation de l'activité du SNS n'est toutefois pas retrouvée dans toutes les populations. Certains sujets semblent ne pas avoir la capacité d'adapter l'activité de leur SNS lors de la prise de poids. Spraul *et al.* (486) ont montré qu'il existe une relation positive entre l'activité du SNS mesurée par microneurographie et le pourcentage de masse grasse. Or cette relation n'existe pas chez les Indiens Pima. Dans cette population, il y a donc non seulement une faiblesse d'activité du SNS avant la

constitution de l'obésité mais il y a aussi une absence d'adaptation du SNS lors de la prise de poids.

*Il n'est donc pas exclu que les sujets les plus obèses soient précisément ceux qui ont un SNS défaillant, et que cette défaillance puisse contribuer à l'accroissement de leur surpoids.*

### **3.6. Baisse du tonus sympathique, facteur de prise de poids : une condition ni nécessaire ni suffisante**

La baisse d'activité du système nerveux sympathique ne peut pas expliquer à elle seule une prise de poids. Si la sensibilité du sujet à la leptine est normale, celle-ci doit exercer un contrôle sur la prise de poids. Par conséquent la baisse d'activité du SNS ne peut être une cause de prise de poids que s'il existe parallèlement une diminution de l'effet de la leptine.

Ceci est illustré par deux exemples de modèles animaux qui ne s'accompagnent pas d'obésité, les souris déficientes en catécholamines (503) et les souris déficientes en UCP1 (137). Les souris qui ne peuvent pas synthétiser d'adrénaline ou de noradrénaline du fait d'une inactivation du gène codant pour la dopamine  $\beta$ -hydroxylase. Ces souris ont une thermogénèse réduite mais ne développent pas d'obésité. Les mécanismes de régulation de la prise alimentaire permettent donc de compenser ce déficit. De même, les souris ne pouvant pas synthétiser l'UCP 1 ont une thermogénèse défaillante, ce qui les rend sensibles au froid. Ces souris ne développent pas d'obésité. Une compensation par une augmentation de l'expression d'UCP2 a été mise en évidence. Néanmoins ces animaux ont la possibilité de réguler parfaitement leurs apports alimentaires.

En revanche, les souris transgéniques dépourvues de tissu adipeux brun deviennent obèses (280). Cette prise de poids est d'abord liée à une baisse des dépenses énergétiques puis à une hyperphagie. Cette dernière est expliquée par l'apparition d'une forte résistance à la leptine (303).

## 4. Système nerveux sympathique, l'insuline et l'insulino-résistance

### 4.1. Effets de l'insuline sur le tonus sympathique

Le rôle activateur direct de l'insuline sur le SNS a été démontré dans plusieurs études. Au cours d'une charge en glucose, l'insulinémie est corrélée à différents indices d'activité du SNS, comme la concentration en noradrénaline urinaire ou plasmatique ou au niveau de pression artérielle (481). En perfusant de l'insuline et du glucose à un sujet de poids normal, Rowe *et al.* (420) ont observé une augmentation de la concentration en noradrénaline plasmatique qui était parallèle à celle de la pression artérielle. L'activité sympathique mesurée par microneurographie augmente également lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinique chez des sujets sains (13) (44) ou chez des sujets ayant une pression artérielle à la limite de la normale (12). De même, la libération de noradrénaline par les tissus, évaluée par la mesure de son passage plasmatique (mesure du « spillover »), augmente également avec l'insulinémie (265). Par contre, la perfusion de glucose seul dans les artères à destination cérébrale n'entraîne pas de stimulation sympathique (538). Cependant d'autres études ont montré que l'hyperglycémie pouvait induire une stimulation sympathique indépendamment de l'insuline, mais les glycémies produisant cet effet sont élevées (12,7 mmol/l pendant 25 minutes) (204).

Contrairement au système sympathique l'activité du système parasympathique serait réduite lors d'un clamp euglycémique (522).

*L'insuline stimule donc la composante sympathique du système nerveux autonome indépendamment de ses effets sur le métabolisme glucidique.*

### 4.2. De la sélectivité de la stimulation

La stimulation de la composante sympathique par l'insuline pourrait être sélective. L'utilisation de micro-électrodes a montré que seuls les nerfs à destination musculaire sont stimulés, alors que les nerfs à destination cutanée ne le sont pas (43;44). De la même façon, lors d'un clamp euglycémique, on note une discordance entre l'importance de la stimulation neuronale sympathique musculaire et le peu d'effet constaté sur la fréquence cardiaque (522).

Les constatations faites chez l'homme sont étayées par des études faites chez l'animal. La perfusion d'insuline stimule l'activité sympathique mesurée au niveau des nerfs lombaires chez le rat. L'activité du SNS à destinée rénale et médullo-surrénalienne, n'est pas affectée par l'insuline sauf chez les rats spontanément hypertendus pour lesquels une stimulation médullo-surrénalienne est observée dans ces conditions expérimentales (333).

*La stimulation du système sympathique par l'insuline serait sélective. Elle ne toucherait que certains territoires de l'organisme notamment le territoire musculaire.*

### **4.3. Mécanismes de cette stimulation: action centrale de l'insuline**

L'action de l'insuline sur le système nerveux central a été démontrée chez l'homme et chez l'animal. L'insuline passe la barrière hémato-encéphalique (306) et peut agir dans les différentes régions du cerveau dont les cellules possèdent effectivement des récepteurs à l'insuline; c'est le cas notamment de l'hypothalamus (438). Chez l'animal, l'injection d'insuline dans une artère à destinée encéphalique provoque une stimulation sympathique alors même que la glycémie n'est pas modifiée. Cet effet disparaît si on bloque les ganglions sympathiques (339). La destruction de la région antéro-latérale du troisième ventricule fait également disparaître cet effet (338;339).

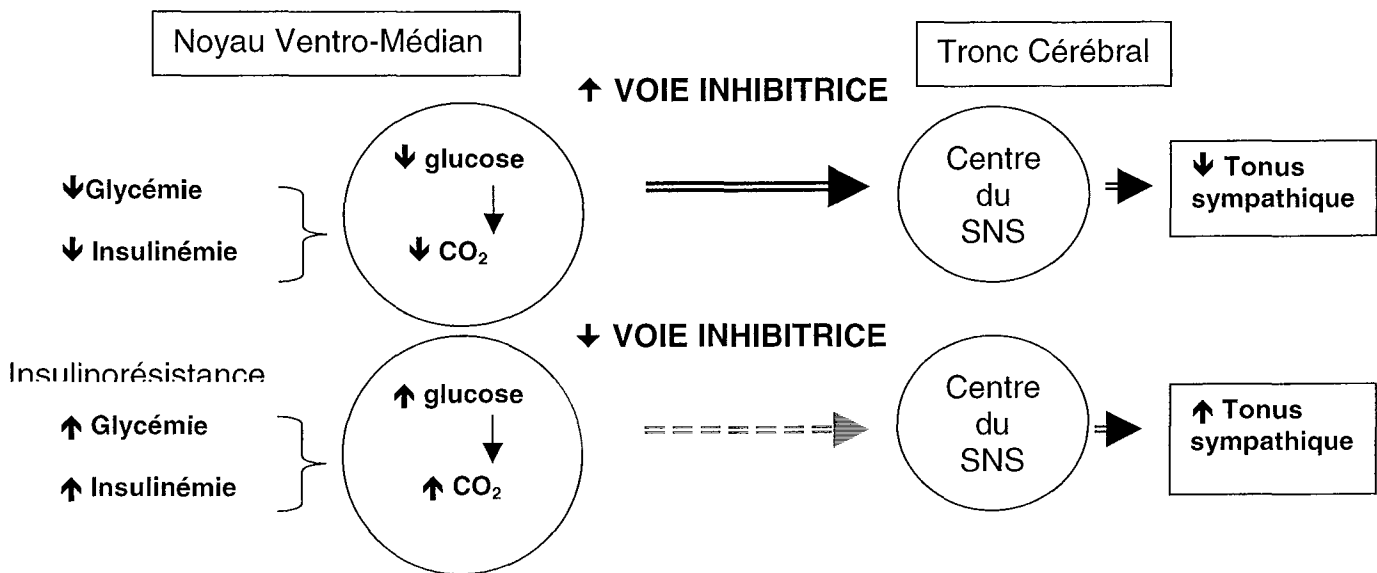
Chez l'homme, il a également été démontré, en mesurant la libération d'adrénaline par les tissus, que l'effet de l'insuline s'exerce essentiellement par une action centrale (265). Si l'insuline est perfusée dans une artère périphérique, elle n'a aucun effet sur la libération locale de noradrénaline.

Les neurones responsables de cet effet, sensibles à l'insuline et au glucose, sont situés au sein du noyau ventro-médian de l'hypothalamus. La destruction de ces neurones par le thioglucose entraîne une stimulation constante du SNS, qui ne disparaît pas chez l'animal à jeun (561). La régulation de l'activité sympathique pourrait donc se faire par un mécanisme d'inhibition. C'est l'affaiblissement du mécanisme inhibiteur qui serait responsable de la stimulation du système sympathique (figure 1).

A jeun, la baisse de la glycémie et la diminution de la concentration en insuline stimulent les neurones inhibiteurs des centres sympathiques. Inversement, le métabolisme du glucose freine l'activité de la voie inhibitrice, ce qui entraîne une

hypertonie sympathique. L'insuline joue un rôle clé dans ce mécanisme en favorisant l'utilisation du glucose (253).

**Figure 1 :** Mécanisme de stimulation du système nerveux sympathique par l'insuline (schéma modifié d'après (251)).



L'action de l'insuline sur le SNS n'est pas immédiate. Au cours des clamps euglycémiques, on constate un délai entre le début de la perfusion de l'insuline et l'activation du SNS. Le temps de réaction est lié à la longueur de cette boucle de régulation (252;540;562). De même, l'effet de l'insuline persiste après arrêt de la perfusion (252).

#### 4.3.1. Les effets de l'insuline sur la stimulation du SNS chez le sujet obèse

L'insulino-résistance induite chez le rat par un régime riche en fructose et en graisses est accompagnée d'une augmentation du tonus sympathique et d'une augmentation de la pression artérielle. A l'inverse, la restriction calorique et la perte de poids entraînent chez l'animal comme chez l'homme une diminution de la concentration en insuline, du tonus sympathique et de la pression artérielle (540).

### **4.3.2. Les facteurs génétiques**

L'effet de l'insuline sur le SNS pourrait dépendre de facteurs génétiques et de l'espèce étudiée. Ainsi, chez le chien, la perfusion d'insuline n'entraîne pas d'augmentation de la pression artérielle ou de l'activité des nerfs sympathiques (66). Par contre, l'insuline augmente la pression artérielle et le tonus du SNS du rat Dahl sensible au sel (506).

Les Indiens Pima obèses, très insulino-résistants, ont un tonus sympathique qui n'est pas augmenté et une pression artérielle normale alors que les sujets caucasiens obèses ont une augmentation du tonus sympathique et une prévalence élevée d'hypertension artérielle (174;444).

Une étude réalisée chez 149 vrais et faux jumeaux (498) a montré que la sensibilité du baroréflexe évaluée par une étude spectrale croisée, est fortement influencée par des facteurs génétiques. Après ajustement sur l'âge et l'IMC, la concordance était forte chez les vrais jumeaux mais pas chez les faux jumeaux.

*Un facteur génétique indépendant des autres facteurs pourrait donc expliquer une part importante des variations interindividuelles des différents paramètres de variabilité de la FC et de la PA. Certains sujets pourraient présenter une résistance à la stimulation par l'insuline du système nerveux sympathique.*

### **4.4. Conséquence de l'hypertonie sympathique sur la sensibilité à l'insuline**

Chez le sujet sain, l'augmentation du tonus sympathique provoque une diminution de 15 à 25 % de l'utilisation périphérique du glucose (215;264;499). Cet effet peut être expliqué par une augmentation de la concentration plasmatique en acides gras libres et par l'oxydation accrue de ceux-ci (499). Le cycle de Randle explique la diminution du transport du glucose et l'insulino-résistance. Un autre mécanisme possible est la réduction de la vascularisation liée à l'effet vasoconstricteur du SNS réduisant le flux de glucose disponible pour les tissus; c'est la théorie vasculaire de l'insulino-résistance (271). Ainsi, le blocage des récepteurs  $\alpha$  par la phentolamine permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline, en augmentant le flux vasculaire alors que les  $\beta$ -bloquants sont sans effet (373;433).



La vasoconstriction dans le territoire musculaire et la diminution de la densité du réseau capillaire pourraient jouer un rôle déterminant dans l'insulino-résistance des sujets obèses, des sujets atteints d'insuffisance cardiaque et des patients cirrhotiques (271). Inversement, la dénervation sympathique est responsable d'une augmentation de la sensibilité à l'insuline.

Néanmoins, une stimulation localisée du SNS chez l'homme ou chez l'animal est responsable d'une augmentation du transport du glucose et donc de la sensibilité à l'insuline (178;349). En effet, au niveau cellulaire, la stimulation adrénergique pourrait améliorer la sensibilité à l'insuline. En stimulant la voie de la glycogénèse musculaire, les catécholamines pourraient avoir un effet direct sur la sensibilité à l'insuline de ces cellules (264). Les récepteurs  $\beta$ 3-adrénergiques seraient surtout impliqués mais aussi les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques (276). La stimulation  $\beta$ -adrénergique par l'isoprénaline peut également améliorer la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux de souris rendues insulino-résistantes par des anticorps anti-récepteurs à insuline (135). Cet effet peut être reproduit par un inhibiteur de la phosphodiesterase, l'aminophylline, responsable d'une augmentation de la concentration d'AMPc dans la cellule. Le blocage des récepteurs  $\beta$ -1 par le metoprolol, fait disparaître cet effet.

Green *et al.* (178) ont montré que l'incubation de cellules adipeuses avec de l'adrénaline, est suivie d'une désensibilisation des récepteurs aux catécholamines accompagnée d'une amélioration importante de la sensibilité à l'insuline. Les agonistes  $\beta$ 3 pourraient aussi améliorer la sensibilité à l'insuline mais par un mécanisme indirect. La diminution de la taille des adipocytes, les rend plus sensibles à l'insuline. Les agonistes  $\beta$ 3 inhibent également la sécrétion du TNF $\alpha$ , cytokine impliquée dans l'insulino-résistance (228).

Les effets bénéfiques des agonistes  $\beta$ 3 ont également été décrits chez l'homme. Ils améliorent le métabolisme du glucose au niveau musculaire et la sensibilité au glucose de sujets de poids normal (547). Néanmoins, les résultats des essais thérapeutiques chez les sujets obèses ont été décevants.

Certaines situations pathologiques semblent contredire ces faits expérimentaux. Au cours du phéochromocytome, on constate une diminution de la sensibilité au glucose et une augmentation de la prévalence du diabète (60;119;427).

La vasoconstriction et la diminution du flux vasculaire favoriseraient au contraire l'insulino-résistance.

La réponse vasodilatatrice serait altérée chez le sujet obèse (55). L'augmentation de la libération d'acides gras par le tissu adipeux est responsable d'une diminution de la sensibilité à l'insuline de l'organisme par un mécanisme de compétition (effet Randle).

*Le SNS a des effets opposés sur la sensibilité à l'insuline. Il serait directement impliqué dans la théorie vasculaire de l'insulino-résistance. Néanmoins, en favorisant la libération d'acides gras par le tissu adipeux, il majore l'insulino-résistance hépatique et musculaire, par un effet lié au cycle de Randle. Par contre au niveau cellulaire, la stimulation catécholaminergique améliore la sensibilité à l'insuline de l'adipocyte (89;265;341) et de la cellule musculaire (276).*

#### **4.5. Effets de l'insuline sur la vascularisation périphérique**

##### **4.5.1. L'effet vasodilatateur de l'insuline**

De nombreuses études ont montré que l'insuline pouvait entraîner une vasodilatation périphérique (13;446;515), particulièrement au niveau des muscles squelettiques (397;538), et des coronaires (270). L'hypoglycémie et la stimulation sympathique qu'elle entraîne peut expliquer l'effet vasodilatateur de l'insuline à forte dose. Toutefois cet effet persiste même après surrénalectomie et lorsqu'on maintient la glycémie stable par la méthode du clamp euglycémique. Il s'agit donc d'un mécanisme direct (401). Cet effet est observé pour des concentrations physiologiques d'insuline, quelle que soit la technique employée, invasive ou non (90;215;246;247;284;398;515), et quelle que soit la région étudiée.

Les mécanismes de l'effet vasodilatateur ont été décrits dans deux études (445;487). Les auteurs ont démontré que l'action vasodilatatrice de l'insuline pouvait être inhibée, *in vivo*, par un inhibiteur de la NO synthase (le L-NMMA). L'insuline active la NO synthase, active le transport de la L-arginine, et augmente la concentration de GMPc de la cellule musculaire lisse. Elle stimule la libération de NO par la cellule endothéliale, expliquant l'effet vasodilatateur observé.

Le mécanisme d'action de l'insuline le plus probable est donc un effet direct sur la paroi des vaisseaux. Une action indirecte par le biais d'une stimulation par le système

nerveux végétatif a été également envisagée mais elle semble peu vraisemblable puisque l'action vasodilatatrice de l'insuline persiste après sympathectomie lombaire (434) ou en présence d'une neuropathie autonome. Au contraire, on constate un effet vasodilatateur de l'insuline plus rapide en cas de dénervation, car le SNS entraîne une vasoconstriction s'opposant aux effets de l'insuline (434).

L'effet vasodilatateur et potentiellement hypotenseur de l'insuline pourrait expliquer en partie la stimulation sympathique par un mécanisme réflexe dépendant des barorécepteurs (baroréflexe). Cela suppose que l'effet vasodilatateur de l'insuline soit préservé et prédominant sur l'effet vasoconstricteur du SNS.

*L'insuline exerce deux actions opposées sur la vasomotricité, et a par conséquent des effets opposés sur la régulation de la pression artérielle. Elle a une action stimulante sur le SNS et vasoconstrictrice liée aux récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, et une action vasodilatatrice directe en stimulant la synthèse de NO.*

#### **4.5.2. Les effets de l'insuline sur la vasomotricité chez le sujet obèse**

Nous avons décrit précédemment l'effet activateur de l'insuline sur le SNS. L'activation du SNS entraîne une augmentation des résistances vasculaires périphériques. Cet effet s'exerce par une stimulation de la vasoconstriction par l'intermédiaire des récepteurs  $\alpha_2$ . Le système nerveux sympathique active également le système rénine angiotensine (466). Cependant l'effet vasoconstricteur du SNS serait également défaillant chez le sujet obèse (518).

L'effet vasodilatateur de l'insuline serait également altéré chez le sujet obèse insulino-résistant (245;247;537), ce qui contribue vraisemblablement à l'augmentation de la pression artérielle. La fonction endothéliale est probablement en cause, mais d'autres mécanismes pourraient être impliqués. La vasodilatation dépendante de l'endothélium, étudiée par la perfusion intra-artérielle de méthacholine, est modifiée chez le sujet obèse insulino-résistant, alors que la vasodilatation indépendante de l'endothélium (réaction au nitroprussiate de sodium) est préservée (488). La baisse de production du NO est expliquée par l'insulino-résistance des cellules endothéliales. L'oxydation du glucose dans la cellule endothéliale semble être nécessaire à la synthèse du NO (571).

La vasoconstriction pourrait être facilitée par différents mécanismes. L'effet vasoconstricteur  $\alpha$ -adrénergique ne semble pas en cause (537). Par contre la vasoconstriction serait facilitée par l'augmentation de la voie du phosphoinositol activée par l'hypertonie sympathique. Cette voie, qui est à l'origine d'une augmentation de la concentration en calcium libre dans la cellule musculaire lisse, est responsable d'une augmentation du tonus musculaire de la paroi vasculaire (114;133;230). L'insuline stimule la sécrétion d'un facteur vasoconstricteur, l'endothéline-1, par un effet génique (359) sur la cellule endothéliale et sur la cellule musculaire lisse. La concentration plasmatique de ce facteur serait augmentée chez le sujet obèse (148). La leptine pourrait potentialiser l'action vasopressive du SNS (312). Or l'insuline est le principal stimulant de la synthèse de leptine. A long terme l'hyperleptinémie peut donc également expliquer une baisse de l'action vasodilatatrice de l'insuline.

*Plusieurs anomalies de la cellule endothéliale, touchant notamment la synthèse de NO peuvent expliquer le défaut de vasodilatation de la vascularisation périphérique chez le sujet obèse et le défaut d'action vasodilatatrice de l'insuline. L'hypertonie sympathique et l'insulino-résistance pourraient concourir de façon synergique à ce dysfonctionnement.*

#### **4.5.3. L'hyperinsulinisme et l'hypertonie sympathique : les répercussions sur le contrôle tensionnel**

L'hyperinsulinisme, à l'origine de la stimulation sympathique, s'oppose à l'action hypertensive du sympathique par son effet vasodilatateur. Ceci est cependant discuté car chez le chien, après dénervation des barorécepteurs, la perfusion d'insuline n'entraîne pas de modification tensionnelle (410). D'autre part, l'augmentation de la pression artérielle entraîne une stimulation des barorécepteurs qui stimulent le parasympathique et inhibent le sympathique (baroréflexe). A court terme, les sujets ayant une sensibilité normale de leur baroréflexe peuvent donc réguler normalement leur pression artérielle. Enfin, les mécanismes rapides ou retardés de contrôle de la pression artérielle peuvent également limiter les effets de l'hypertonie sympathique.

Un exemple singulier est celui de l'insulinome. Les patients porteurs de cette tumeur n'ont pas d'hypertension artérielle. L'activité du SNS n'est pas augmentée chez ces patients et cette activité n'est pas modifiée après exérèse de la tumeur (443). L'effet de l'insuline sur le SNS ne serait donc pas constant.

Toutefois, l'hyperinsulinémie est responsable d'une augmentation de la réabsorption hydrosodée rénale (544). La rétention hydrosodée contribue à l'élévation tensionnelle en augmentant la volémie. L'hyperinsulinémie pourrait également perturber les échanges ioniques transmembranaires et faciliter l'action de la noradrénaline et de l'angiotensine II.

#### **4.6. Les effets de l'insuline sur la variabilité de la fréquence cardiaque**

L'effet de l'insuline sur la variabilité de la FC a été étudié par Laitinen *et al.* (250) au cours d'un clamp euglycémique effectué chez 35 sujets. La variabilité totale de la FC et le ratio MF/HF augmentaient durant le clamp uniquement chez les sujets insulino-résistants, alors que les hautes fréquences, qui reflètent l'activité parasympathique, diminuaient. Par contre aucune modification de la variabilité de la fréquence cardiaque n'était observée chez les sujets normalement sensibles à l'insuline. Cependant dans cette étude, l'enregistrement de la variabilité de la fréquence cardiaque n'avait été réalisé qu'au moment où le plateau de perfusion était atteint. Un retard de la stimulation sympathique chez les sujets les plus insulino-résistants et une mesure trop tardive chez les sujets normalement sensibles à l'insuline pourraient donc expliquer ces résultats.

En l'occurrence, l'effet vasodilatateur de l'insuline apparaît 45 minutes après le début de la perfusion, alors que la stimulation sympathique périphérique, mesurée par microneurographie, survient dans un délai de 10 et 40 minutes (485). Dans cette étude, l'effet vasodilatateur de l'insuline n'était pas observé chez les sujets les plus insulino-résistants.

Par conséquent, ce travail ne permet pas d'exclure une éventuelle diminution de la réactivité sympathique chez les sujets insulino-résistants non obèses.

Au cours d'une hyperglycémie provoquée par voie orale Paolisso *et al.* (368) ont montré, que la balance sympatho-vagale augmente de façon significative durant le test et que ce rapport est négativement corrélé au pourcentage de masse grasse des sujets. Cependant le rapport MF/HF ne donne que des renseignements partiels sur la réactivité des modulations sympathiques. De la même façon, Matsumoto *et al.* (315) ont montré que les composantes sympathiques de la variabilité de la fréquence cardiaque

augmentent au cours de la période post-prandiale chez les sujets sains, alors qu'aucune modification n'est observée chez les sujets obèses. Cependant, l'analyse de la variabilité a été effectuée pendant une période très courte après le repas (35 minutes dans cette étude). Il est donc possible que chez les sujets obèses, une augmentation retardée de l'activité sympathique n'ait pas été observée pour cette raison.

## **5. Le système nerveux sympathique et la leptine**

La leptine exerce un effet satiétogène par son effet inhibiteur sur la sécrétion de neuropeptide Y (NPY) et son effet activateur sur la synthèse de peptides anorexigènes (figure 1) (78;347). Elle facilite également, chez l'animal, la stabilité pondérale en augmentant la dépense énergétique de repos et la thermogenèse. Ces effets sont essentiellement liés à une stimulation du SNS(193). La leptine peut être impliquée dans la physiopathologie de l'obésité à travers deux mécanismes essentiels : un défaut de sécrétion ou une résistance à son action. Le déficit total en leptine (équivalent de la souris ob/ob) est exceptionnel chez l'homme (31;102;147;330;366;402). La diminution relative des concentrations en leptine, plus basses que ne le voudrait la masse grasse de l'individu, est une autre possibilité. La leptino-résistance du système nerveux central pourrait sur le plan théorique être liée à plusieurs anomalies : un défaut de transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique, une mutation des récepteurs (équivalent de la souris db/db), ou un défaut dans la transduction du signal.

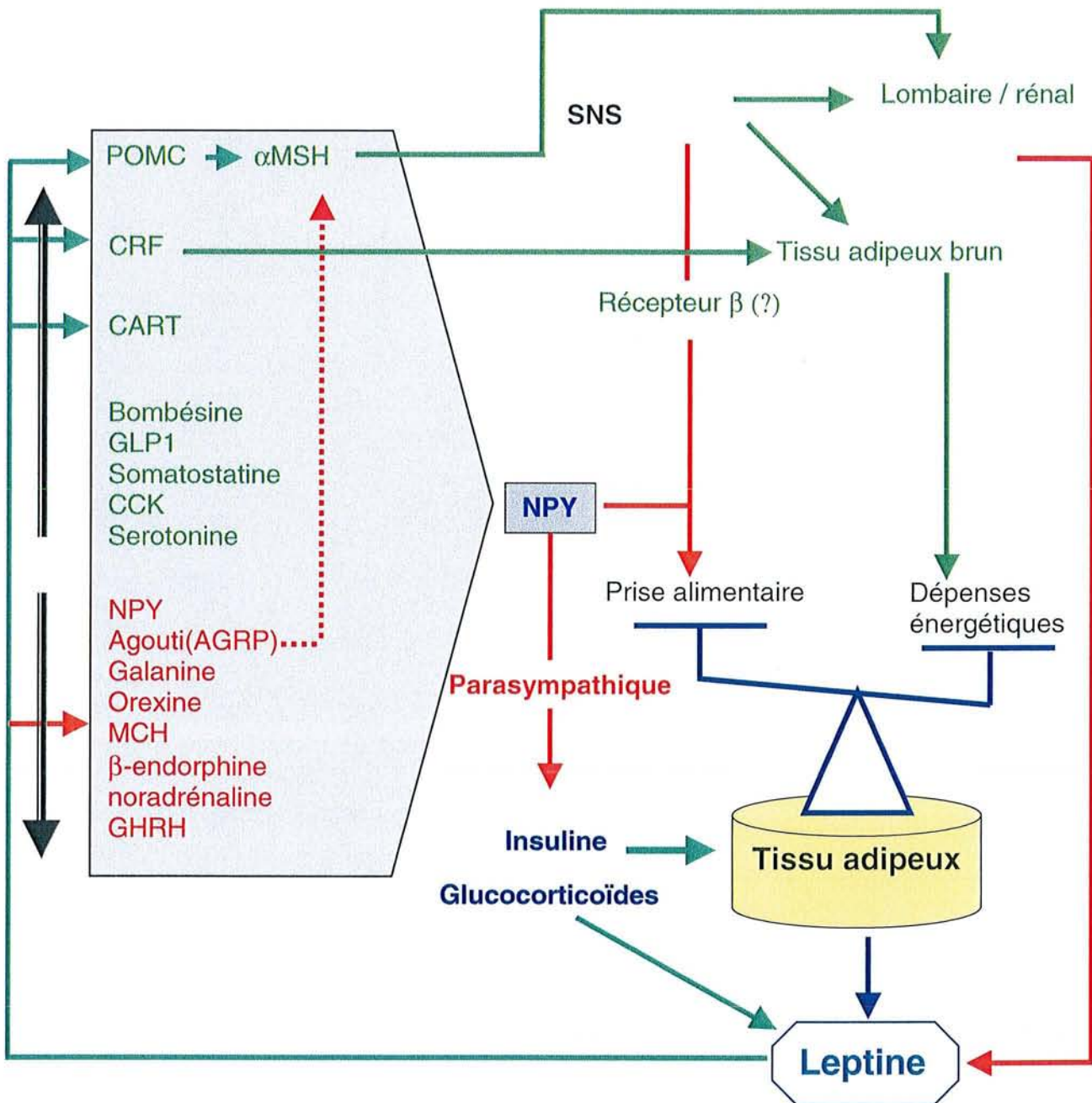
### ***5.1. Régulation de la prise alimentaire à long terme: interaction entre système nerveux sympathique et leptine***

Bien que les connaissances concernant le rôle physiologique de la leptine soient importantes, son implication réelle dans la physiopathologie de l'obésité reste indéterminée. Elle pourrait être un des éléments essentiels du "pondéostat". Le rôle physiologique de la leptine est de favoriser la prise alimentaire quand la concentration plasmatique en leptine est effondrée ou lorsqu'elle diminue. C'est ce qui se produit lors d'un jeûne prolongé ou lorsque la masse de tissu adipeux régresse. La finalité de cette régulation est donc de limiter la perte de poids.

La leptine exerce un effet anorexigène en diminuant la synthèse de deux peptides orexigènes, le NPY synthétisé par le noyau arqué et libéré dans le noyau

paraventriculaire, et la protéine Agouti ou agouti-related peptide (AGRP). D'autre part, elle stimule la sécrétion de peptides anorexigènes, la "melanocyte stimulating hormone" (ou  $\alpha$ -MSH) qui est dérivé de la proopiomélanocortine (POMC), et le "amphetamine-related transcript" ( ou CART). Ces deux effets s'accompagnent d'une stimulation du SNS, qui a lui-même un effet anorexigène. Ces deux actions sont donc synergiques.

**Figure 1** : Effets de la leptine sur le système nerveux sympathique, principaux peptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire.



Les voies activées sont en vert, les voies inhibées en rouge. POMC, "proopiomelanocortin";  $\alpha$ MSH, "melanocyte stimulating hormone"; MC4R, "melanocyte stimulating hormone receptor", CRF, "corticotrophin releasing factor"; CART, "amphetamine-related transcript"; NPY, neuropeptide Y; AGRP, protéine Agouti ou "agouti-related peptide"; MCH, "melanin concentrating hormone", CCK, "cholécystokinine", GLP1, "Glucagon like peptid"



## 5.2. *Action de la leptine sur le SNS et résistance à la leptine*

### 5.2.1. La leptine et le système nerveux sympathique

La leptine exerce un effet stimulant sur le SNS essentiellement en augmentant la synthèse de proopiomélanocortine (POMC) (126;196;282;435) et en inhibant la synthèse de Neuropeptide Y (347;468). En effet, l'injection de NPY dans les ventricules cérébraux entraîne, chez l'animal, une chute de la pression artérielle, et une diminution de l'excitation sympathique (317). On constate également une forte diminution de la sensibilité du baroréflexe. Si on injecte de la leptine dans le ventricule avant d'injecter le NPY, celui-ci n'a plus d'effet inhibiteur sur le SNS. On ne constate alors ni chute tensionnelle ni diminution de l'activité sympathique. Le NPY a donc un effet inhibiteur sur la stimulation sympathique, que la leptine peut réprimer.

La POMC est un précurseur, entre autres, de l' $\alpha$ MSH et de la  $\beta$ -endorphine. L'injection d' $\alpha$ MSH dans le ventricule latéral de rats est suivie d'une augmentation de la pression artérielle et d'une excitation des nerfs sympathiques lombaires (126). A l'opposé, les  $\beta$ -endorphines diminuent la pression artérielle et l'excitation sympathique. L'effet de l' $\alpha$ MSH est reproduit quand on injecte de la leptine en intra-ventriculaire. Cet effet n'est pas observé en présence de la protéine Agouti, qui est un antagoniste de l' $\alpha$ MSH. Paradoxalement, la naloxone bloque également l'effet de la leptine. Cet effet pourrait être lié à sa liaison avec le récepteur de type 4 de l' $\alpha$ MSH (MC<sub>4</sub>R). La leptine pourrait donc avoir une action stimulante sur le SNS par le biais de cette voie par l'intermédiaire des récepteurs MC<sub>4</sub>.

L'action vasopressive de l' $\alpha$ MSH et son action stimulante sur le SNS ont également été démontrées en injectant un agoniste des récepteurs MC<sub>4</sub> (MTII) dans les ventricules cérébraux (196). Un antagoniste de ces récepteurs, le SHU9119, bloque cet effet. Cependant il ne supprime pas les effets de la leptine sur le tissu adipeux brun, alors qu'il bloque l'excitation sympathique à destination rénale. Par conséquent, la leptine pourrait avoir une action stimulante sur le SNS, par deux voies distinctes. La voie des récepteurs MC<sub>4</sub> est responsable d'une stimulation des nerfs sympathiques à destination rénale. L'autre voie est destinée au tissu adipeux brun. La leptine pourrait stimuler cette voie par le biais du "corticotrophin releasing factor". Ce facteur injecté dans les ventricules cérébraux stimule le SNS du tissu adipeux brun, et cet effet est inhibé par son compétiteur (110).

L'effet de la leptine sur le SNS à destinée du tissu adipeux brun est également inhibé par le compétiteur du CRF, mais dans ce cas l'activité vasopressive de la leptine est conservée.

### **5.2.2. Une résistance sélective à la leptine**

La sélectivité de la stimulation du SNS par la leptine a été confirmée grâce à un modèle de souris résistante à la leptine, la souris Agouti (109;396). Cette souris synthétise en excès la protéine Agouti, laquelle bloque les récepteurs MC4 au niveau de l'hypothalamus, ce qui entraîne une obésité. L'injection de leptine dans les ventricules cérébraux de cette souris n'engendre aucun effet sur la prise alimentaire et le poids mais provoque une excitation des nerfs sympathiques à destinée rénale.

### **5.2.3. Une résistance globale**

La résistance à la leptine peut aussi être globale, touchant à la fois l'effet anorexigène et sympathique. De nombreux mécanismes et modèles animaux ont été décrits, reproduisant chacun des modèles différents de résistance à la leptine.

Une diminution de la sensibilité à l' $\alpha$ MSH a été observée chez des rats rendus obèses par une alimentation riche en lipides (282). L' $\alpha$ MSH injectée en intraventriculaire avait un effet plus faible sur la stimulation sympathique et un effet vasopressif plus faible chez l'animal obèse que chez l'animal de poids normal. De même, la leptine avait un effet moins important chez l'animal obèse. Par contre, les  $\beta$ -endorphines qui normalement diminuent la pression artérielle et inhibent le SNS, avaient un effet paradoxal chez cet animal.

Un autre modèle de résistance globale à la leptine est celui de rat F-344xBN (440). Ce rat augmente de façon constante sa masse grasse au cours du vieillissement et ce, malgré une augmentation de la sécrétion de leptine. De fait, l'effet de la leptine est altéré que cette hormone soit injectée en intraventriculaire ou en périphérie. Cependant la diminution prédomine quand elle est injectée en périphérie. Les auteurs ont constaté que chez ce rat âgé, la leptine n'exerçait plus son effet inhibiteur sur l'expression du gène du neuropeptide Y. Une diminution de la phosphorylation d'une protéine intervenant dans la chaîne de transduction pourrait être en cause (cytosolic signal transducer and activator of transcription ou STAT3).

Certains modèles animaux d'obésité répondent à l'injection centrale de leptine à dose très faible mais restent résistants à l'insuline périphérique (33;524). Une anomalie de transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique est suspectée (33).

### **5.3. Résistance à la leptine chez l'homme**

La concentration plasmatique de leptine augmente avec la masse grasse chez le sujet obèse. Cette augmentation n'a pas l'effet attendu sur la prise alimentaire et sur la dépense énergétique. L'injection de leptine à des sujets obèses permet d'en faire la démonstration. L'effet sur la perte de poids est faible (201).

Un phénomène de saturation du transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique pourrait être en cause (33;91). Ce transport est assuré par une forme courte du récepteur (Lra) présent dans les plexus choroïdes. La concentration de leptine dans le liquide céphalo-rachidien augmente avec la masse grasse du sujet mais dans une proportion beaucoup plus faible que dans le plasma. Le rapport des concentrations de leptine du liquide céphalo-rachidien sur celles du plasma était respectivement 4,3 fois et 5,4 fois plus faible chez les sujets obèses que chez les sujets de poids normal, dans deux études récentes (91) (457).

Un autre mécanisme possible est celui d'une mutation du récepteur de la leptine. Cette mutation à l'état homozygote a été rapportée chez des sujets obèses (102), mais elle est exceptionnelle.

Des anomalies de la chaîne de signalisation de la leptine, notamment de phosphorylation de STAT3 ont été démontrées mais uniquement chez l'animal (440).

L'hyperleptinémie pourrait également exercer une inhibition sur l'expression de son propre transporteur. Les souris db/db ont des concentrations très élevées en leptine et une densité des récepteurs choroïdiens très réduite. Ce mécanisme de désensibilisation pourrait être un des mécanismes impliqués dans la résistance à la leptine chez le sujet obèse.

*La leptine active le système nerveux sympathique par un mécanisme indépendant de l'effet anorexigène. La résistance à la leptine peut donc concerner de façon sélective l'effet anorexigène et épargner l'effet de stimulation sympathique et l'effet vasopressif. La stimulation des nerfs sympathiques à destinée rénale peut également être dissociée de l'effet sur le tissu adipeux brun car les voies de stimulation feraient intervenir des*

*peptides différents. Certains modèles animaux ont une résistance globale à la leptine touchant à la fois l'effet anorexigène et l'effet sur le système nerveux sympathique.*

#### **5.4. Interaction leptine/insuline**

Il y a certaines similitudes dans l'action de l'insuline et dans celle de la leptine au niveau des régulations de la balance énergétique. Ces hormones stimulent toutes deux le système sympathique. L'insuline exerce comme la leptine, un effet inhibiteur sur la sécrétion de NPY facilitant son action stimulante sur le SNS. A l'inverse de la leptine, l'insuline pourrait inhiber l'expression de POMC (414), et n'aurait donc pas d'effet stimulant sur le SNS lombaire. Toutefois l'insuline ne s'oppose pas à l'effet activateur de la leptine sur cette prohormone (127).

De façon surprenante, ces deux hormones n'ont pas d'action synergique ou additive sur le SNS. Au contraire, l'insuline pourrait inhiber l'effet de la leptine sur le système sympathique. En effet, l'injection prolongée d'insuline dans les ventricules cérébraux atténue l'effet de la leptine sur la stimulation sympathique (127). Le mécanisme n'est pas connu. Cette inhibition ne concerne pas la voie de la mélanocortine puisque l'insuline ne modifie pas la réponse de l' $\alpha$ -MSH.

La leptine, en freinant le NPY a donc une action inhibitrice indirecte sur la sécrétion d'insuline basale ou stimulée. En effet, le NPY a une action importante sur la sécrétion d'insuline en activant le système parasympathique innervant le pancréas (566;567).

*La leptine, en diminuant le NPY a une action inhibitrice indirecte sur la sécrétion d'insuline basale et stimulée. L'insuline inhibe l'action stimulante de la leptine sur le SNS. L'hyperinsulinisme, associée à l'insulino-résistance, pourrait donc être une cause de leptino-résistance du SNS.*

#### **5.5. Effet du SNS sur la synthèse de la leptine**

La noradrénaline freine la sécrétion de leptine (239;387). Il y a donc une boucle de régulation dans laquelle la leptine stimule le système sympathique, qui lui-même freine la sécrétion de leptine. Il s'agit donc d'un mécanisme de rétro-contrôle négatif.

Cette inhibition est directe puisqu'elle a été décrite sur des cultures primaires d'adipocytes ou des lignées murines (3T3-L1). L'AMPc reproduit cet effet (511).

Ce sont les récepteurs  $\beta_3$  qui semblent le plus impliqués dans cette régulation (165;512;512) dans différentes espèces animales. Bien que ces récepteurs puissent jouer un rôle au sein de la graisse viscérale et sous-cutanée (34;141), leur importance dans la régulation métabolique de l'adipocyte est probablement minime chez l'homme. Les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  pourraient avoir un rôle prépondérant dans cette régulation.

Le SNS est donc un des éléments clés de la régulation de la synthèse de leptine par le tissu adipeux (258;549). La perfusion d'isoprénaline entraîne chez l'homme une chute très rapide des concentrations plasmatiques de leptine (387). La sécrétion de leptine est effondrée lorsqu'il existe une hypersécrétion de catécholamines (phéochromocytome) et la sécrétion augmente après exérèse de la tumeur (429). Inversement, le blocage de la synthèse des catécholamines est suivi d'une augmentation très importante de la production de leptine chez l'animal,(473). Les  $\beta$ -bloquants atténuent la chute des concentrations de leptine lors du jeûne chez l'homme (511).

L'hyperactivité sympathique observée en situation post-prandiale, s'oppose donc à l'action à l'insuline et aux glucocorticoïdes qui stimulent la synthèse de la leptine.

*Le SNS représente le principal facteur inhibiteur de la synthèse de la leptine.*

*La résistance aux catécholamines du tissu adipeux, observée au cours de l'obésité, pourrait contribuer à l'augmentation de la sécrétion de leptine.*

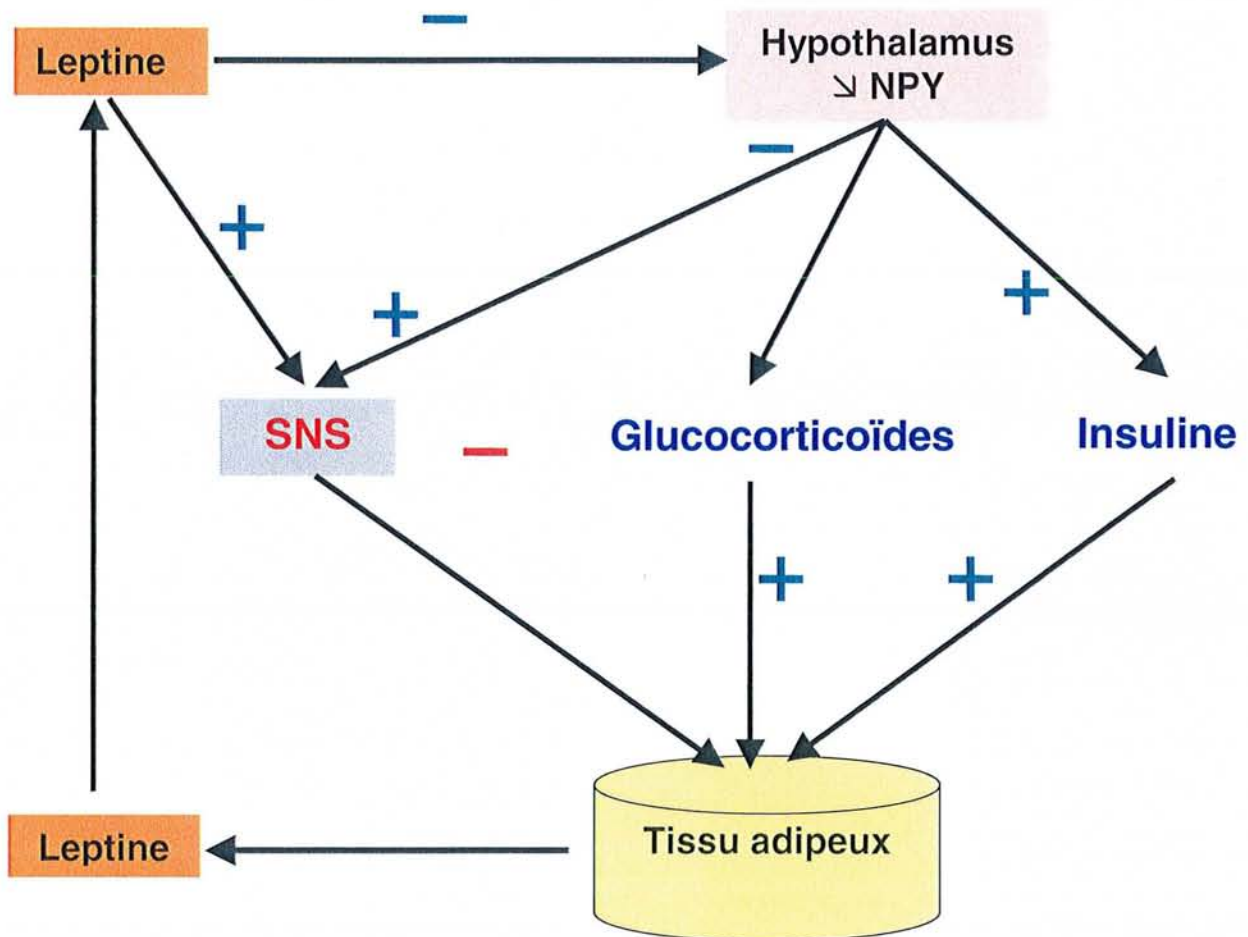
## **5.6. Système nerveux sympathique, leptine et axe corticotrope**

La stimulation du SNS et celle de l'axe hypothalamo-pituitaro-surrénalien se fait de façon parallèle et pourrait dépendre de la même zone d'excitation hypothalamique. La régulation conjointe de ces deux axes explique de nombreux paramètres associés au syndrome X du sujet obèse (50-52).

La leptine pourrait moduler le fonctionnement de l'axe hypothalamo-pituitaro-surrénalien, mais son mode d'action est discuté. Les neurones du noyau arqué synthétisant la POMC et le CRH sont stimulés par la leptine (458). La POMC est un précurseur de l' $\alpha$ MSH mais également de la "corticotropin releasing hormone" (CRH).

Celle-ci, libérée dans le noyau paraventriculaire, a un effet anorexigène et augmente la thermogénèse chez l'animal en stimulant le SNS destiné au tissu adipeux brun. En revanche la leptine empêcherait l'activation des neurones à CRH du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus responsable de l'activation de l'axe corticotrope (207). Cet effet est donc compatible avec les effets amaigrissants de la leptine.

**Figure 2** : Régulation de la sécrétion de leptine par le tissu adipeux: Implication du SNS



## **6. La dysfonction sympathique dans l'obésité : une hypothèse membranaire de la résistance aux catécholamines**

### **6.1. Résistance aux catécholamines et système cardio-vasculaire**

La réponse des vaisseaux aux catécholamines dépend de la répartition des récepteurs  $\alpha_2$ , vasoconstricteurs et  $\beta_2$ , vasodilatateurs. Les artérioles possèdent des propriétés contractiles qui déterminent le niveau de résistance vasculaire. L'hyperactivité sympathique ne semble pas provoquer de phénomène de résistance aux catécholamines, au contraire l'action de la noradrénaline pourrait être exacerbée (337). Cependant Blaak *et al.* (55) ont montré que chez le sujet obèse, la réponse vasodilatatrice dépendante des récepteurs  $\beta_1$  est diminuée. Ce récepteur est néanmoins peu présent au niveau vasculaire périphérique.

Une diminution de la réponse vasoconstrictrice cutanée mesurée par laser doppler a été mise en évidence chez des sujets obèses insulino-résistants et normotendus (518), suggérant une diminution de l'activation sympathique chez ces sujets. Une diminution de l'action vasoconstrictrice des catécholamines liée à un défaut des récepteurs  $\alpha_1$  ne peut pas être exclue. Ces données sont cependant en contradiction avec la diminution de la capacité de thermogénèse habituellement trouvée au cours de l'obésité.

D'autres tissus comme le tissu adipeux présentent également une diminution de la sensibilité aux catécholamines, c'est le cas du tissu adipeux *in vitro* (409) ou *in vivo* (65).

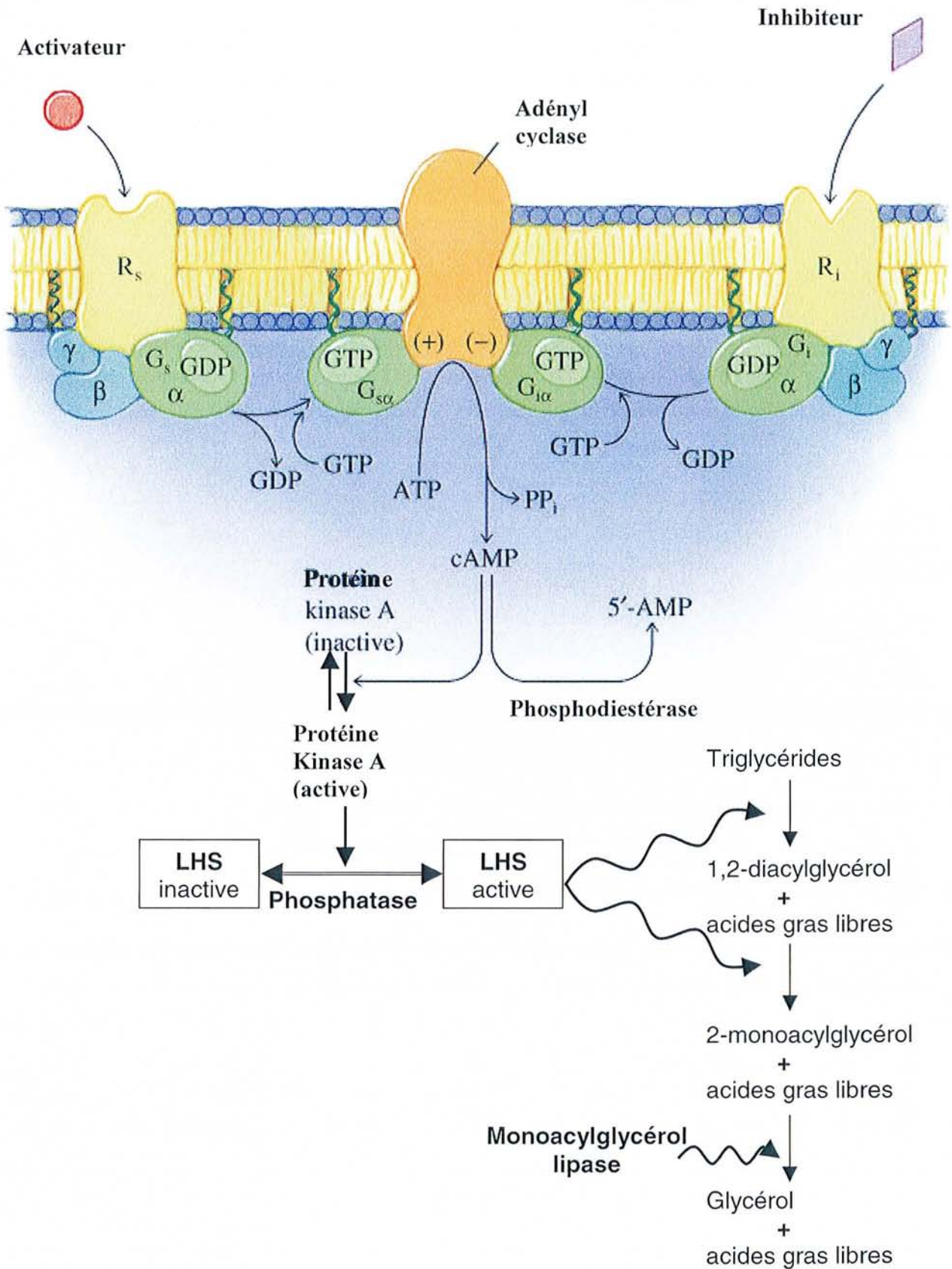
### **6.2. Résistance aux catécholamines et tissu adipeux**

#### **6.2.1. Rappels**

##### ***La régulation de la lipolyse***

Le système adrénergique et l'insuline jouent un rôle primordial dans la régulation de l'activité lipolytique de l'adipocyte. Chez l'homme, la stimulation de la lipolyse dépend essentiellement des catécholamines alors que l'insuline exerce un puissant effet antilipolytique.

**Figure 1 :** Régulation de la lipolyse





Les principaux récepteurs adrénergiques responsables de cette régulation sont de type  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ . Des études récentes utilisant la technique de microdialyse ont montré que les 3 types de récepteurs  $\beta$  étaient présents et actifs chez l'homme (34;141). Les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  exercent des effets identiques et seraient présents en proportion égale chez l'homme (320). Cependant, la lipolyse est stimulée de façon prédominante par les récepteurs  $\beta_2$  (34). L'importance du récepteur  $\beta_3$  dans la régulation de la lipolyse n'est pas clairement établie chez l'homme. La lipolyse dans la graisse sous cutanée est faiblement stimulée par les agonistes  $\beta_3$  (34;141). Néanmoins, ce récepteur serait essentiellement exprimé dans la graisse viscérale et pourrait donc jouer un rôle plus important lorsque cette graisse est développée.

Les récepteurs  $\alpha_2$  ont une action antilipolytique. La microdialyse a permis de montrer que le récepteur  $\alpha_2$  intervient dans la modulation de la lipolyse au repos et lors de stimulation, notamment par un stress mental (248;249). C'est la densité de récepteurs  $\alpha_2$  qui pourrait déterminer leur rôle physiologique. Le nombre de ces récepteurs augmente avec la taille de l'adipocyte (248). Il serait également exprimé de façon plus importante dans la graisse glutéale (248). Par conséquent, la réponse lipolytique pourrait dépendre de la proportion des récepteurs  $\alpha_2$  et  $\beta$ , de l'affinité des catécholamines pour ces récepteurs et des possibilités de désensibilisation des récepteurs.

L'affinité des récepteurs adrénergiques est variable en fonction du récepteur concerné et de la nature des catécholamines. L'affinité des récepteurs  $\beta_3$  pour les catécholamines est moins importante que celle des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ . Ce sont les récepteurs  $\alpha$  qui ont la plus grande affinité pour les catécholamines.

L'ordre relatif d'affinité mesurée *in vitro* pour la noradrénaline est le suivant :  $\alpha_2 > \beta_1 \geq \beta_2 > \beta_3$  et pour l'adrénaline  $\alpha_2 > \beta_1 > \beta_3$ . A des concentrations faibles de noradrénaline, ce sont les récepteurs  $\beta_1$  qui sont recrutés alors que l'activation des récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques nécessite des concentrations plus élevées de noradrénaline (249). La noradrénaline, l'adrénaline et l'isoprénaline ont des effets lipolytiques croissants. La noradrénaline a un effet lipolytique accentué par l'effet des  $\alpha_2$ -bloquants (phentolamine).

### ***L'innervation du tissu adipeux***

La noradrénaline est libérée par les terminaisons nerveuses du système sympathique, alors que l'adrénaline est libérée par la médullosurrénale et déversée dans le courant sanguin. On ignore la part réelle de l'innervation sympathique dans cette régulation. L'électro-stimulation intra-neuronale du système sympathique entraîne une augmentation moyenne de 47 % de la concentration en glycérol, mesurée par microdialyse, dans le tissu interstitiel du territoire d'innervation (123). Cette innervation jouerait donc un rôle important.

### ***Les facteurs vasculaires***

La vascularisation joue probablement un rôle majeur dans la régulation de la lipolyse du tissu adipeux. Cependant les données expérimentales chez l'homme sont peu nombreuses. L'utilisation de Xénon 133 a permis de montrer que la stimulation sympathique entraîne une diminution du débit sanguin, alors que la vasodilatation permettrait au contraire d'augmenter l'efflux des acides gras libres. La réponse vasculaire locale peut également être analysée par la microdialyse. Les agonistes  $\beta$ 2-adrénergiques entraînent une augmentation du flux vasculaire. Cet effet est également trouvé avec les agonistes  $\beta$ 3, ce qui a fait suspecter la présence de récepteurs  $\beta$ 3 au niveau vasculaire, chez l'homme (34).

## **6.2.2. La résistance à l'action des catécholamines au cours de l'obésité**

La sensibilité du tissu adipeux aux catécholamines a été étudiée au cours de la phase dynamique de prise de poids par Bougnières *et al.* (65). Ces auteurs ont mesuré la lipolyse du tissu adipeux chez 9 adolescents en phase de prise de poids, en utilisant une stimulation prolongée par de l'adrénaline et une perfusion de glycérol marqué. L'insulinémie était maintenue constante pendant toute la durée de la stimulation à l'aide de la technique du clamp euglycémique. Une nette diminution de la sensibilité du tissu adipeux à la lipolyse a été mise en évidence chez les sujets en phase dynamique de prise de poids. Pour une même masse grasse, les enfants obèses avaient une lipolyse basale abaissée de 30%. La lipolyse stimulée était également nettement réduite puisque la perfusion d'adrénaline était suivie d'une augmentation de la lipolyse de 239-246% chez les enfants témoins contre 55-72 % chez les enfants obèses malgré une concentration d'adrénaline largement supérieure dans ce groupe. Différents

mécanismes peuvent expliquer cette résistance du tissu adipeux aux catécholamines: une moindre diffusion de l'adrénaline en raison d'une vascularisation moins importante du tissu adipeux, une réponse vasculaire altérée ou une baisse de l'action des catécholamines sur l'adipocyte. Ce phénomène pourrait favoriser l'augmentation de la masse grasse en limitant la mobilisation des triglycérides du tissu adipeux.

La diminution de la sensibilité du tissu adipeux aux catécholamines pourrait apparaître progressivement avec l'augmentation de la masse grasse, même en l'absence d'obésité (447). L'augmentation du flux de glycérol et de palmitate lors d'une stimulation prolongée par de l'adrénaline était moins importante chez les sujets obèses (551), même après une phase de jeûne de 15 heures et 87 heures. Par conséquent, à court terme, le jeûne ne permet pas de corriger la diminution de la sensibilité du tissu adipeux à la lipolyse, ce qui suggère que des mécanismes de régulation à long terme sont en cause. Cette résistance à l'action des catécholamines pourrait être associée à une diminution de l'oxydation des acides gras, comme cela a été montré chez 7 hommes obèses en utilisant d'une perfusion prolongée d'adrénaline et du palmitate marqué (105).

#### Effets de la répartition de la masse grasse

La répartition de la masse grasse pourrait influencer la lipolyse basale ou stimulée (220). La lipolyse basale mesurée par l'utilisation de palmitate marqué était plus élevée chez des femmes ayant une répartition androïde des graisses, que chez des femmes gynoïdes. Par contre la lipolyse stimulée était plus basse chez les sujets androïdes. L'effet antilipolytique de l'insuline était également altéré chez les mêmes sujets. Ces résultats sont en accord avec les études effectuées *in vitro* montrant une différence de la sensibilité aux catécholamines du tissu adipeux glutéale par rapport au tissu abdominal. Elle pourrait être expliquée par une répartition différente des récepteurs adrénergiques selon la localisation, les récepteurs  $\alpha_2$  antilipolytiques étant plus nombreux au niveau glutéal (248). En revanche, les études par microdialyse donnent des résultats différents : la concentration en glycérol basal est augmentée dans la région fémorale mais la lipolyse stimulée n'est pas différente (328). Le tissu fémoral est moins vascularisé ce qui pourrait contribuer à la moindre mobilisation des graisses de cette région.

### La diminution de l'expression des récepteurs $\beta_2$

Une diminution de l'expression des récepteurs  $\beta_2$  a été décrite chez des patientes présentant une obésité androïde (409); Un déficit de cette voie d'activation a également été rapporté chez des hommes âgés présentant une intolérance au glucose (277;407). Le rôle de certains polymorphismes de ce récepteur sera envisagé dans un autre chapitre.

### Les voies antilipolytiques

Les effets antilipolytiques de l'insuline ont été explorés dans de nombreuses études au cours de l'obésité avec des résultats contradictoires. En revanche l'effet de l'insuline sur le transport du glucose de l'adipocyte du sujet obèse est nettement altéré. Les récepteurs  $\alpha_2$  adrénergiques sont exprimés en plus grand nombre dans l'adipocyte hypertrophié. L'augmentation des effets  $\alpha_2$  est corrélée à l'indice de masse corporelle. Les effets antilipolytiques de l'adénosine sont diminués, une désensibilisation des récepteurs à adénosine de type A1 est probable (225). Les effets antilipolytiques des prostaglandines sont également diminués chez l'animal (161) et chez l'homme (18). Par contre les récepteurs du NPY/peptide YY seraient exprimés en plus grand nombre dans les adipocytes hypertrophiques chez l'homme (94). Le rôle des récepteurs nicotiques n'est pas connu.

### La Lipase Hormono Sensible (LHS)

Une résistance aux catécholamines du tissu adipeux pourrait aussi être expliquée par une baisse d'activité de la LHS. Un facteur génétique pourrait être en cause puisque des sujets de poids normal ayant des antécédents familiaux d'obésité (198) auraient une activité plus basse de cette enzyme. Une altération précoce de cette enzyme pourrait être à l'origine d'une diminution de la capacité de la lipolyse, non compensée par une activation de l'activité sympathique, responsable à terme de l'obésité.

### Rôle de l'innervation

La méthode de « spillover » permet de mesurer la quantité de noradrénaline libérée par les tissus. Chez le sujet de poids normal la libération de noradrénaline augmente après un repas en proportions identiques dans le tissu adipeux que dans l'organisme entier ou que dans une zone de référence (avant-bras) (374). Il n'y a pas d'étude chez

le sujet obèse. La dénervation du tissu adipeux entraîne chez l'animal une hyperplasie du tissu adipeux blanc et une hypoplasie du tissu adipeux brun (377). La diminution de l'innervation du tissu adipeux pourrait avoir des répercussions sur la régulation de la lipolyse et sur l'hyperplasie du tissu.

### **6.2.3. La sensibilité aux catécholamines et les effets de l'amaigrissement**

Comme le montre une étude chez des femmes obèses androïdes, la perte de poids permet d'améliorer *in vitro* la sensibilité des adipocytes à la lipolyse stimulée par la terbutaline (agoniste  $\beta$ 2-adrénergique) (408). Mais l'amaigrissement entraîne également une diminution de la lipolyse basale. L'amélioration semble plus nette pour le tissu adipeux abdominal que pour le tissu fémoral. Cet effet serait lié à une augmentation de la densité des récepteurs  $\beta$ 2 et à une diminution de la sensibilité des récepteurs  $\alpha$ 2-adrénergiques dans ce tissu (321).

Barbe *et al.* (35) ont également montré grâce à la microdialyse que la sensibilité aux catécholamines du tissu adipeux sous-cutané augmente après amaigrissement induit par une restriction calorique sévère.

*Synthèse : Chez le sujet obèse, les études in vivo et in vitro suggèrent que l'effet lipolytique des catécholamines pourrait être altéré. Une anomalie de ce système de régulation pourrait alors faciliter le stockage des graisses lorsque la balance énergétique est positive et en l'absence de mécanisme compensateur et favoriser l'obésité. Lorsque l'obésité est constituée et que la balance énergétique est à l'équilibre, la résistance du tissu adipeux aux catécholamines permettrait de limiter la lipolyse et de préserver la masse grasse. La résistance aux catécholamines pourrait ainsi contribuer à la résistance à l'amaigrissement observée en clinique humaine chez certains sujets.*

### **6.3. La désensibilisation des récepteurs**

L'effet des catécholamines peut être transitoire, car il se produit, *in vitro*, un phénomène de désensibilisation lors de l'exposition prolongée des récepteurs à certains agents adrénergiques. *In vivo*, cet effet touche les récepteurs  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 (178;307) (122) et apparaît rapidement, par exemple après un exercice d'intensité modérée (50% de la  $VO_2$  max.) de 60 minutes (307). On observe également une désensibilisation des récepteurs  $\beta$ 3 adrénergiques mais *in vivo* cet effet semble plus

tardif (535). Les récepteurs  $\alpha 2$  sont moins enclins à la désensibilisation que les récepteurs  $\beta 1$  et  $\beta 2$ .

### Mécanisme

La désensibilisation des récepteurs  $\beta$ adrénergiques est liée à une phosphorylation d'une sérine du récepteur par des protéines kinases spécifiques (GRK). Une fois phosphorylés, les récepteurs se fixent à une protéine régulatrice, la  $\beta$ -arristine, qui empêche la liaison des récepteurs aux protéines G (169;291). Cet effet a lieu quand la stimulation est prolongée. Par conséquent, la désensibilisation des récepteurs implique leur phosphorylation par des protéines kinases spécifiques de ces récepteurs couplés à la protéine G et la liaison à cette protéine régulatrice, la  $\beta$ -arristine. Cette protéine permet l'internalisation du récepteur en interagissant avec la clathrine dans des puits d'endocytose (169;291). Cette protéine liée au récepteur peut elle même activer ou inhiber d'autres voies. Ce mécanisme ne serait pas spécifique des puits de clathrine mais serait également effectif dans d'autres microdomaines membranaires, les cavéoles et les rafts. Cette régulation pourrait être différente selon le microdomaine (354).

### Interaction entre insuline et catécholamines

L'insuline peut provoquer l'internalisation des récepteurs  $\beta$ adrénergiques et favoriser leur désensibilisation (140), ce qui contribue à son action antilipolytique. Elle peut aussi inhiber la synthèse et l'expression des récepteurs  $\beta$ adrénergiques. *In vitro*, sur les lignées murines, elle favorise la synthèse de récepteurs de type  $\beta 1$  et  $\beta 2$  mais diminue très rapidement l'expression du récepteur  $\beta 3$ . L'insuline favorise la phosphorylation de la tyrosine du récepteur et diminue la phosphorylation de la thréonine, ce qui conduit à une désensibilisation rapide du récepteur (en 30 minutes environ *in vitro*) (87;168)

*L'hyperinsulinisme pourrait donc être directement impliqué dans la diminution de l'action des catécholamines chez le sujet obèse hyperinsulinique, insulino-résistant (140).*

## **6.4. Résistance à l'action des catécholamines : hypothèse membranaire**

### **6.4.1. Le rôle des acides gras membranaires**

La composition en acides gras des phospholipides membranaires de l'hépatocyte change en fonction de la part des lipides dans l'alimentation et du type d'acides gras (342). Seuls les acides gras de la sphingomyéline ne seraient pas modifiés par la composition de l'alimentation en acides gras (342). La composition de la membrane en acides gras pourrait perturber la transmission du signal en perturbant les interactions entre l'agoniste  $\beta$ -adrénergique et son récepteur ou en modifiant les interactions entre le récepteur et la protéine G et l'activité de l'adénylate cyclase.

- Action sur l'affinité des récepteurs

Les résultats des études sont contradictoires en fonction de l'espèce étudiée ou du type cellulaire.

*Le tissu adipeux*

Une étude a montré, que l'affinité des récepteurs  $\beta$  du tissu adipeux diminue fortement, chez le rat, quand l'alimentation est enrichie en graisses saturées par rapport à une alimentation riche en graisses polyinsaturées (318). La rigidification de la membrane pourrait expliquer la diminution de l'affinité des récepteurs et la résistance à la lipolyse. Toutefois, dans une autre étude, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre différentes sources d'acides gras (392). Chez le porc les résultats sont également discordants (325;345). En comparaison à une alimentation standard, l'alimentation enrichie en acides gras de la série n-6 permet d'augmenter l'affinité des récepteurs  $\beta$ adrénergiques (345). L'alimentation riche en acides gras polyinsaturés (n-6) conduirait cependant à une diminution du nombre de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. A l'inverse, une autre étude a montré que l'alimentation riche en graisses saturées entraîne une augmentation du nombre de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sans modification de leur affinité (325) ou de la sensibilité du tissu à la lipolyse.

*Les cardiomyocytes*

Les acides gras essentiels de la série (n-3) pourraient augmenter l'affinité des récepteurs  $\beta$ adrénergiques des cardiomyocytes de singe (375).

- Effets sur l'activité de l'adénylate cyclase

*Sur le tissu adipeux* du porc il apparaît qu'en comparaison à une alimentation standard, l'alimentation enrichie en acides gras de la série n-6 augmente l'activité de l'adénylate cyclase (345).

*Sur le cardiomyocyte*, la carence en acides gras essentiels entraîne une baisse de l'activité de l'adénylate cyclase couplée aux récepteurs  $\beta$ adrénergiques (8). L'effet de la forskoline est également altéré, de même que l'activité de la protéine kinase A. Toutefois cette action inhibitrice n'a pas de conséquences sur l'activité des agonistes  $\beta$ adrénergiques. Les acides gras de type « trans » diminuent l'activité de l'adénylate cyclase de cette cellule, diminuent la densité des récepteurs, et l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$  membranaire (9). On observe les mêmes résultats sur *l'hépatocyte*. L'activité de l'adénylate cyclase est facilitée quand la membrane est enrichie en acides gras polyinsaturés (138;342;472).

*La composition de l'alimentation en acides gras pourrait donc influencer l'activité de l'adénylate cyclase. En revanche, les études sur l'influence de la composition membranaire en acides gras sur l'affinité des récepteurs  $\beta$ adrénergiques ne sont pas convaincantes.*

#### **6.4.2. Le rôle des phospholipides**

Des modifications de la composition membranaire en phospholipides pourraient influencer l'activité de l'adénylate cyclase et la sensibilité des récepteurs aux catécholamines. Le micro-environnement lipidique de cette enzyme pourrait modifier son activité également par la nature de la tête polaire des phospholipides (138). L'adénylate cyclase pourrait changer de conformation selon la composition de la membrane plasmique en phospholipides. Cependant les études réalisées à partir de membranes isolées n'ont pas été confirmées sur différents types cellulaires.

- Influence de la nature des phospholipides sur l'affinité des récepteurs

Les travaux concernant les effets de la composition membranaire sur la sensibilité des récepteurs adrénérgiques sont assez convergents.

*Le fibroblaste*

L'amantadine est un médicament qui augmente la fluidité membranaire en modifiant la composition de la membrane en phospholipides ; il augmente la concentration



membranaire en phosphatidylinositol au détriment de la phosphatidylsérine et de la sphingomyéline. Ses effets sur les récepteurs  $\beta$  ont été analysés sur des fibroblastes. L'amantadine diminue l'effet de l'isoprénaline sur la production d'AMP cyclique, sans que la densité des récepteurs  $\beta$  ne soit affectée (205).

#### *L'hépatocyte*

Le glucagon agit sur la cellule par l'intermédiaire d'une adénylate cyclase. La sphingomyélinase diminue l'action du glucagon. Cette enzyme entraîne une diminution de la concentration en sphingomyéline et en cholestérol de la membrane et serait responsable d'une diminution de la sensibilité des récepteurs. En effet dans cette étude, l'activité de la forskoline, n'est pas modifiée par la sphingomyélinase (217). L'enrichissement du feuillet externe de la membrane plasmique par de la phosphatidylcholine entraîne également une baisse de l'affinité des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques et des récepteurs du glucagon sans affecter l'action de la forskoline (217).

La digestion de la membrane plasmique par la phospholipase A2, qui dégrade les acides gras polyinsaturés en position 2 des phospholipides, et la phospholipase C, qui hydrolyse la tête polaire des phospholipides, diminue également l'affinité des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques du foie (393). De même, la peroxydation des phospholipides entraînerait une diminution de l'affinité de ce récepteur (393). Ce récepteur serait particulièrement sensible au groupe hydrophobe des PL mais aussi sensible aux charges négatives de la partie hydrophile (471).

*Les cardiomyocytes* de rats cirrhotiques sont moins sensibles à l'action des catécholamines. Ce défaut d'action pourrait être lié à une rigidification membranaire associée à une augmentation du rapport cholestérol/phospholipides (292). Le 2-(2-méthoxy-éthoxy)éthyl 8-(cis-2-n-octylcyclopropyl) octanoate (A2C), permet de restaurer une fluidité membranaire proche de la normale et de rétablir l'action de l'isoprénaline sur la production d'AMPc.

Les récepteurs  $\beta$  pourraient être également affectés par l'action des phospholipases. La tête polaire des phospholipides pourrait jouer un rôle important dans cette interaction (93;199;226). Le microenvironnement lipidique des récepteurs adrénérgiques pourrait donc influencer la transmission du signal (100).

- **Effets sur l'adénylate cyclase**

Sur l'hépatocyte, la sphingomyélinase ne modifie pas la réponse à la forskoline (217), de même que l'enrichissement du feuillet externe de la membrane plasmique par de la phosphatidylcholine (217).

*La fluidité membranaire pourrait donc influencer la sensibilité des tissus aux catécholamines en modifiant l'accessibilité des récepteurs  $\beta$ . La rigidification membranaire pourrait augmenter l'affinité pour ces récepteurs mais diminuer leur accessibilité. Néanmoins, les résultats divergent en fonction du type cellulaire (470).*

*Toutes ces études montrent que la tête polaire des phospholipides pourrait jouer un rôle dans l'interaction entre les récepteurs adrénergiques ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\beta$ ) et leurs agonistes. Parmi les récepteurs adrénergiques, les récepteurs  $\alpha 1$  adrénergiques seraient particulièrement sensibles à leur environnement lipidique. Un effet direct sur l'adénylate cyclase n'est pas probant. possible sur certains types cellulaires. Les mécanismes fins de cette régulation sont mal connus. Tous les sous types de récepteurs n'ont pas été étudiés et les études n'ont porté que sur quelques types cellulaires, le foie, le cœur et l'aorte. Aucune étude ne concerne l'adipocyte.*

### **6.5. La localisation membranaire des récepteurs adrénergiques: les cavéoles**

Les études menées sur le cardiomyocyte ont montré que les récepteurs  $\beta 1$  et  $\beta 2$  ne sont pas localisés au hasard au sein de la membrane plasmique. Ils sont essentiellement situés dans des microdomaines membranaires.

Il existe trois domaines spécifiques de la membrane plasmique susceptibles de loger les récepteurs adrénergiques, les puits tapissés de clathrine, et des microdomaines contenant ou non la cavéoline. Les îlots membranaires contenant la cavéoline sont les caveolae ou cavéoles. Les domaines non contrôlés par la cavéoline sont les « radeaux » ou « Raft ».

Les puits tapissés de clathrine jouent probablement un rôle important dans la régulation du message. Ces domaines membranaires d'environ 100 nm, sont riches en récepteurs couplés à la protéine G et sont impliqués dans la régulation à long terme de récepteurs, en particulier dans le phénomène de désensibilisation

Les cavéoles sont régies par la cavéoline. Ce sont des vésicules membranaires riches en sphingomyéline et en cholestérol, qui sont plus petites que les puits recouverts (50 à 100 nm) et qui sont particulièrement riches en protéine G et en récepteurs, tels que les récepteurs muscariniques, les récepteurs de l'endothéline, de la bradykinine et de l'insuline. Elles contiennent également des molécules lipidiques utilisées comme points d'ancrage comme le glycosylphosphatidylinositol (GPI) et les glycosphingolipides. La cavéoline joue un rôle fondamental dans l'organisation de ces microdomaines membranaires. Trois gènes de cavéoline différents ont été identifiés (cavéoline 1, -2, et -3) (112). Les cavéoles, comme les puits recouverts, peuvent être le siège d'interactions spécifiques de molécules impliquées dans la transmission du message. La structure particulière de la cavéoline, dite en échafaudage permet d'ancrer ces molécules à la membrane. Entre chaque activation membranaire, leur activité métabolique est inhibée ou supprimée. Ces molécules sont rassemblées sous forme inactive au niveau de la partie N-terminale de la cavéoline, elles sont capables d'oligomérisation. La sous unité  $\alpha$  des protéines G peut se fixer sur cette partie, supprimant ainsi son activité enzymatique (223). Les GPI sont ancrés dans le feuillet externe de la membrane et sont capables de fixer de nombreuses molécules. La protéine de liaison ou « bridge protein », de la famille des intégrines, peut entrer en contact avec la tyrosine kinase et activer la phosphorylation de l'IRS1 et la PI3kinase (273).

#### Cavéoles et cardiomyocyte

Les récepteurs adrénergiques des cardiomyocytes localisés au sein des cavéoles pourraient être régulés de façon particulière (364;365;461). Ainsi, les récepteurs  $\beta$ 2 adrénergiques sont accessibles quand ils sont situés dans ces zones (461). Leur délocalisation en dehors des cavéoles entraîne leur inactivation (364). Il a été démontré que la cavéoline peut se lier aux récepteurs  $\beta$ 2 adrénergique avec une forte affinité (461). Cette interaction favoriserait la séquestration des récepteurs  $\beta$ 2 adrénergiques au sein des cavéoles.

#### Cavéoles et adipocytes

L'adipocyte est la cellule la plus riche en cavéoles de l'organisme (272). Ces domaines membranaires pourraient donc jouer un rôle fondamental dans la régulation métabolique de cette cellule, chacun des microdomaines pourrait avoir un rôle

spécifique. Nous ne disposons pas d'étude sur la localisation des récepteurs  $\beta$ adrénergiques de l'adipocyte.

## 6.6. Rôle de la sphingomyéline dans les cavéoles

### 6.6.1. La sphingomyéline : structure et propriétés

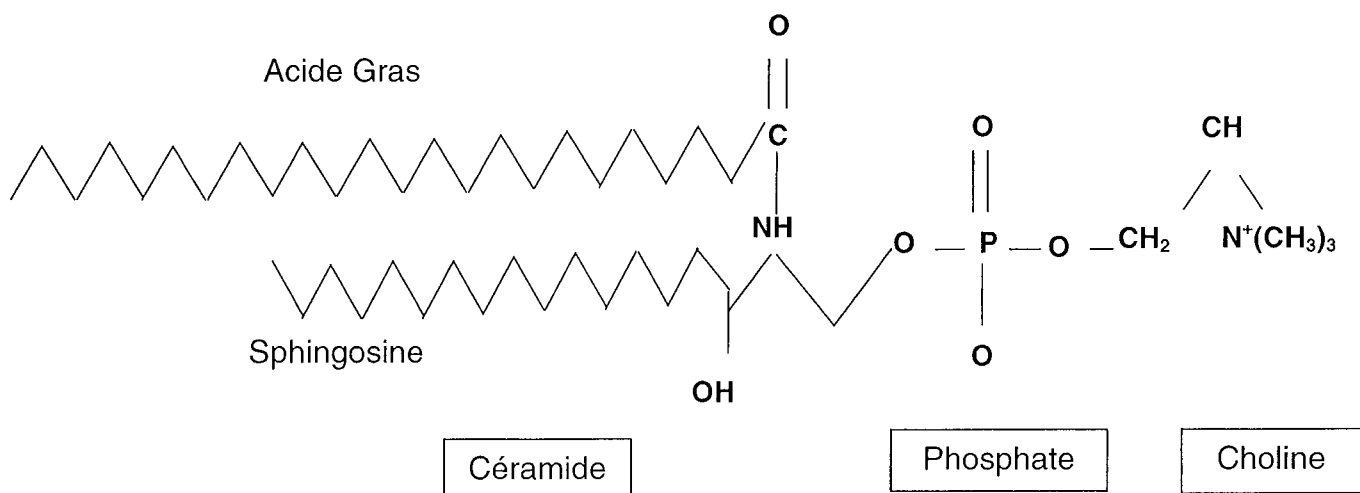
La SM est un phospholipide qui joue un rôle important dans la structure des membranes biologiques et des lipoprotéines.

- **Structure**

La sphingosine a deux carbones asymétriques. Il existe donc quatre isomères allostériques. (figure 6).

La SM et la phosphatidylcholine (PC) sont les principaux phospholipides de la membrane plasmique. La SM, comme la PC, est essentiellement située dans le feuillet externe de la membrane. Ces deux phospholipides ont une structure amphipathique, dont la constante PP (packing parameter) définie par le rapport  $V/(a \times l_c)$ , où  $V$  est le volume de la partie hydrophobe ;  $(a)$  la surface de la région polaire et  $l_c$  la longueur de la région hydrophobe ( $l_c$ ), est proche de 1. Ce paramètre permet de prédire la conformation spatiale de la molécule en milieu aqueux. Ces deux phospholipides ont une structure cylindrique et forment une bicouche en milieu aqueux, alors que les autres PL forment des micelles ou des formes hexagonales inversées. SM et PC ont donc une structure spatiale stable et peu sensible aux variations de composition du milieu, de pH, de composition ionique ou de température.

**Figure 6** : Structure de la sphingomyéline



La SM et la PC ont une tête polaire identique et diffèrent par leur région hydrophobe. La SM se distingue par sa liaison amide entre l'acide gras et la sphingosine dont l'acyl comporte 6 à 18 carbones.

La majorité des SM membranaires comporte une longue chaîne d'acides gras. Les acides gras les plus courants sont l'acide stéarique (C18), l'acide lignocérique (C24) et l'acide nervonique (C24 :1). Dans le globule rouge, l'acide palmitique (C16) est prédominant.

- **Propriétés**

La température de changement de phase gel/ liquide de la SM est élevée (27,5 °C). Cela confère à la membrane une structure plus rigide.

La longueur des chaînes d'acides gras, souvent importante dans la SM, influence également les interactions entre les deux couches de PL. Plus l'acide gras est long plus la molécule aura une structure asymétrique. Placées face à face, les deux chaînes carbonées se confrontent, formant des interdigitations.

Deux modèles d'interactions ont été décrits. L'un dans lequel les acides gras restent linéaires et s'imbriquent, l'autre où les acides gras se confrontent de façon plus anarchique, en perdant leur structure linéaire ; Ce dernier modèle est moins stable (36).

- **L'interaction SM-cholestérol**

Le cholestérol est un constituant majeur des membranes cellulaires. Le cholestérol influence les propriétés physico-chimiques de la membrane, sa perméabilité, la mobilité des PL et leur organisation (155). La capacité de la membrane à solubiliser le cholestérol dépend essentiellement de sa concentration en SM (357). Bien que de structure et de propriétés très différentes, ces deux composants sont localisés dans les mêmes compartiments membranaires.

L'interaction forte entre SM et cholestérol est liée à des liaisons hydrogènes entre la fonction hydroxyl du cholestérol et le groupe amide de la SM. (49). D'autres forces permettent de renforcer la cohésion entre SM et cholestérol, ce sont des forces de Van der Waals et des interactions hydrophobes (431) (49).

L'interaction est également fonction de la longueur de la partie hydrophobe de la SM : cette interaction est maximale avec la SM comportant un acide gras à longue chaîne et quand l'acide gras est saturé (400).

- **Synthèse de la sphingomyéline**

*Le cycle de la sphingomyéline et la synthèse de novo (Figure 7)*

La sphingomyéline est synthétisée par transfert de la fonction phosphorylcholine de la phosphatidylcholine sur le céramide, libérant un diglycéride. Cette activité est catalysée par la SM synthase. Le transfert direct d'une P-choline sur un céramide est une voie de synthèse minoritaire.

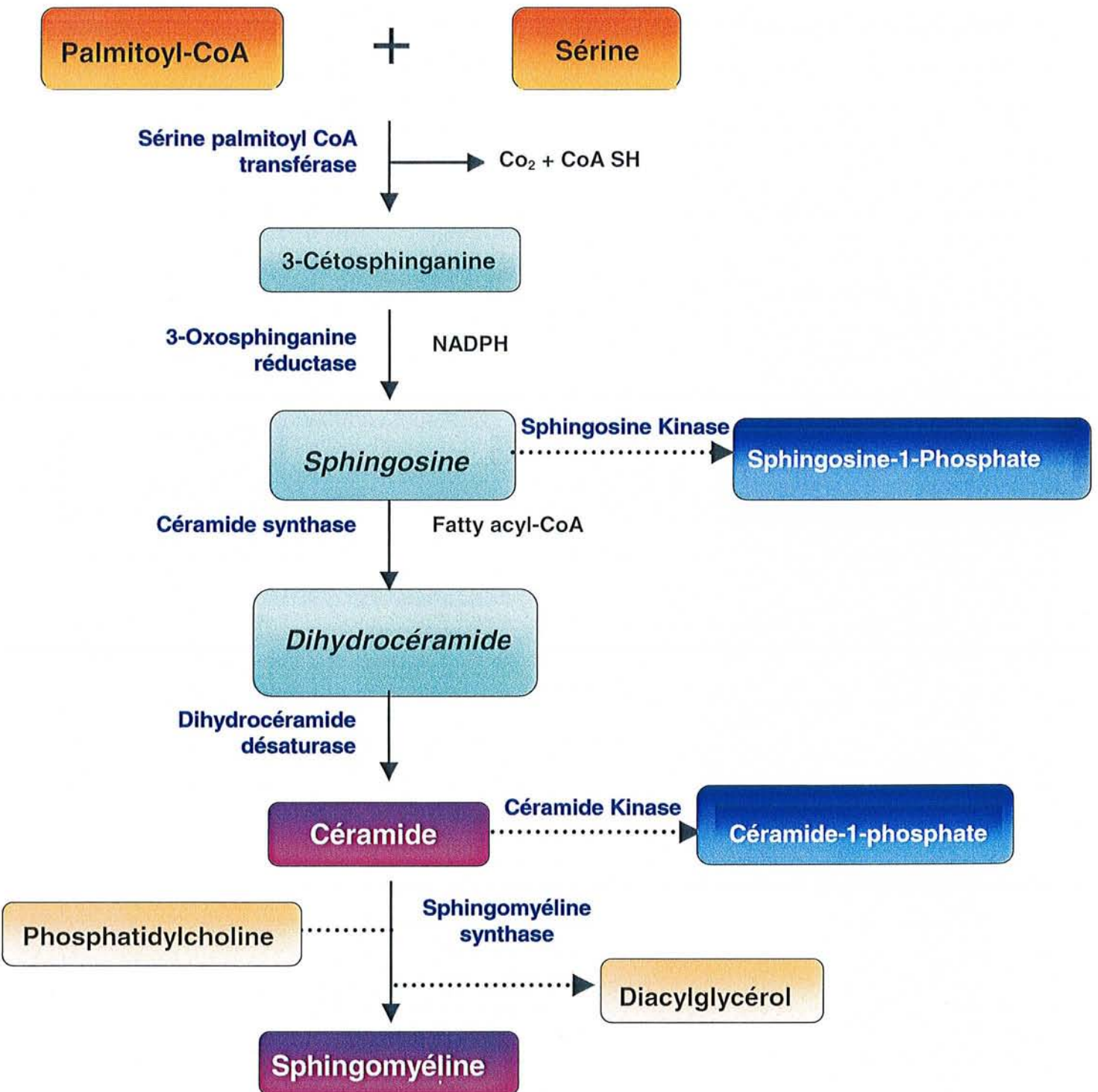
La synthèse *de novo* de céramide se fait à partir d'une condensation d'une sérine et d'un palmitoyl coenzyme A, grâce à la sérine-palmitoyl transférase, suivie d'une réaction de réduction de la fonction cétone, d'une acétylation, et d'une désaturation (379).

La synthèse de la SM a lieu dans l'appareil de Golgi et dans la membrane plasmique (159;219;525;526). Cependant l'activité SM synthase existe dans d'autres compartiments cellulaires. Il est probable que la localisation principale de la synthèse varie en fonction du type cellulaire. La synthèse membranaire peut représenter jusqu'à 50% de la synthèse cellulaire, pour l'oligodendrocyte (539). La synthèse est régulée par la sphingomyéline incorporée dans la cellule sous forme de lipoprotéine.

*La SM synthase*

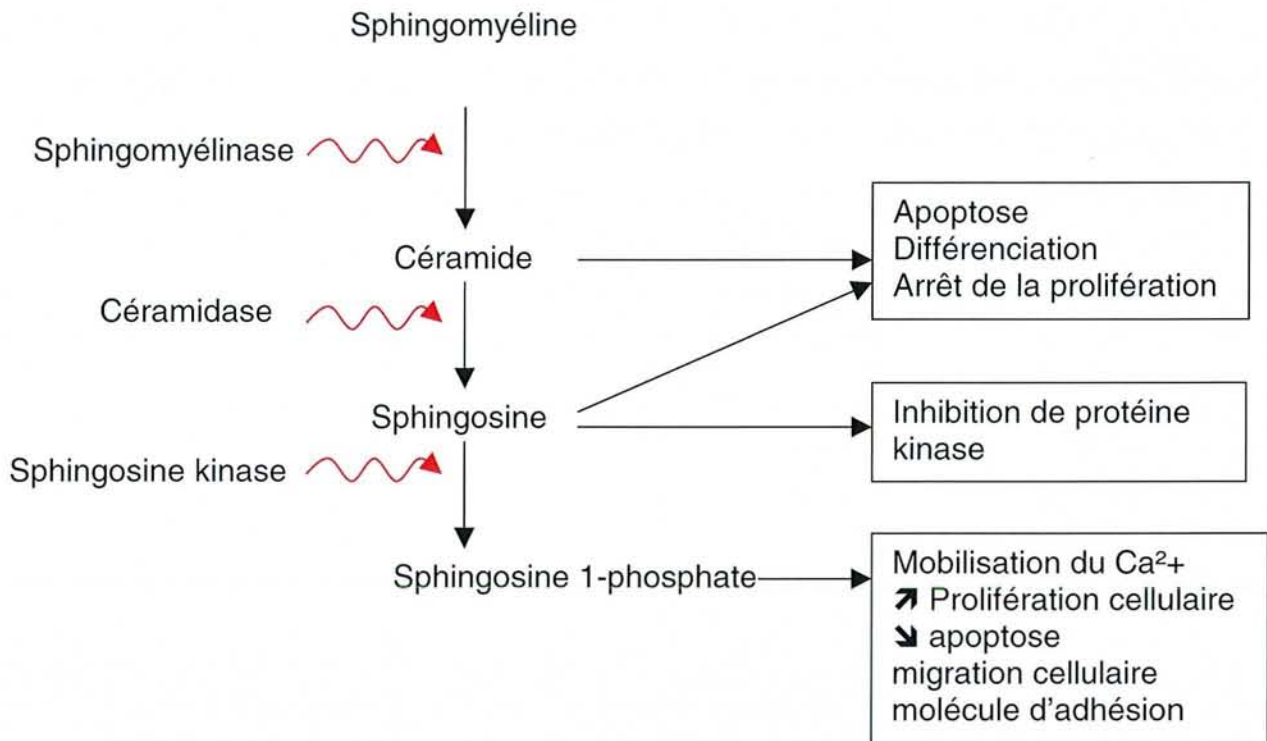
L'activité de la SM synthase joue un rôle important dans le fonctionnement cellulaire. Cela est illustré par une lignée de fibroblastes pulmonaires immortalisés (SV40) dans laquelle une augmentation importante de cette activité a été montrée (283). L'augmentation de cette activité enzymatique entraîne une diminution de la concentration en céramides dans la cellule qui sont immédiatement utilisés pour la synthèse de SM. Or les céramides jouent un rôle important dans la régulation de l'apoptose, par conséquent la diminution de la concentration en céramides expliquerait l'immortalisation de cette lignée.

Figure 7 : Synthèse de novo de la sphingomyéline



## Catabolisme de la SM : les sphingomyélinases

Figure 8 : Catabolisme de la SM



Plusieurs types de sphingomyélinases peuvent hydrolyser la sphingomyéline en céramide et en phosphorylcholine (figure 8).

Il existe deux familles de sphingomyélinases, une active en milieu acide (pH=4,5) et une active en milieu neutre.

Les sphingomyélinases acides sont localisées essentiellement dans les lysosomes. Ces enzymes jouent probablement un rôle mineur dans la production de céramides et dans l'induction de l'apoptose (502). Cependant les sphingomyélinases acides interviennent dans la maturation du récepteur du TNF $\alpha$  et pourraient jouer un rôle important dans la stimulation lymphocytaire. Le déficit en sphingomyélinase acide est responsable de la maladie de Niemann-Pick de type A et B, caractérisée par une accumulation de SM principalement dans les cellules hépatiques et spléniques (455).

Le rôle central des sphingomyélinases est de produire des céramides. Or la SM est essentiellement localisée dans le feuillet externe de la membrane. La dégradation de la SM par les sphingomyélinases acides ne serait donc possible que si les lysosomes contenant la sphingomyélinase acide subissent une translocation vers la membrane.



Il existe deux formes de sphingomyélinases neutres, une sphingomyélinase cytosolique et une sphingomyélinase membranaire dépendante du magnésium.

La sphingomyélinase de la membrane plasmique intervient dans l'apoptose et dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol de la cellule. Une sphingomyélinase identique est associée à la membrane du noyau. Son rôle précis n'est pas connu. Elle pourrait intervenir dans la dégradation des ARNm, la sphingomyéline protégeant les ARN de la dégradation par les ARNases (327).

De nombreux stimuli peuvent activer ces sphingomyélinases, notamment des cytokines et des facteurs de croissance. Le  $TNF\alpha$  active la sphingomyélinase surtout en présence d'un cofacteur, le « factor Associated to sphingomyélinase activation » (ou FAN) (2).

La sphingomyélinase activée par le  $TNF\alpha$  entraîne une dégradation du pool membranaire de sphingomyéline, et agit sur le feuillet interne de la membrane (14).

- **Métabolisme de la SM d'origine exogène**

*In vitro*, la sphingomyéline peut être apportée à la cellule sous forme de liposome ou sous forme aqueuse. *In vivo*, la SM exogène provient des lipoprotéines.

*In vitro*

*In vitro*, la sphingomyéline sous forme de liposome ou sous forme aqueuse pénètre très rapidement dans le fibroblaste cutané. Une faible proportion reste dans la membrane plasmique alors qu'une petite partie des endosomes formés se lie avec les lysosomes. La sphingomyélinase lysosomiale dégrade environ 8%/heure de la sphingomyéline qui pénètre dans la cellule (241). Les endosomes riches en sphingomyéline gagnent l'appareil de Golgi et la sphingomyéline est rapidement recyclée vers la membrane. La durée de ce cycle est courte, elle est estimée à 40 minutes dans les cellules fibroblastiques et dans les cellules ovariennes (CHO-K) (240;241). La supplémentation en sphingomyéline sous cette forme dans le milieu de culture permet d'augmenter la concentration en SM membranaire.

En physiologie

*In vivo*, les apports exogènes en SM se font probablement sous forme de lipoprotéines, bien que les échanges entre les lipoprotéines et les membranes des adipocytes soient aussi possibles (139). On ignore cependant quelle est la part de SM de la membrane plasmique qui provient de la synthèse endogène et celle qui provient des échanges avec les lipoprotéines. La SM contenue dans les lipoprotéines, en particulier celle des LDL, ne subit pas le même sort que la sphingomyéline en solution

aqueuse ou sous forme de liposome. La totalité de la sphingomyéline des LDL est hydrolysée par la sphingomyélinase acide lysosomiale (268). Les LDL se fixent aux récepteurs à apo B/E et sont internalisées dans la cellule. Cet endosome fusionne avec un lysosome contenant la sphingomyélinase acide. La SM est alors dégradée. Le déficit en cette enzyme conduit à une accumulation de SM et de cholestérol dans la cellule, c'est la maladie de Niemann-Pick. La SM des LDL pourrait réguler la synthèse endogène (267).

- **L'interaction SM-Cholestérol : conséquences sur le métabolisme cellulaire du cholestérol**

L'enrichissement ou la déplétion de la membrane en sphingomyéline entraîne des mouvements de cholestérol dans la cellule permettant de rétablir l'équilibre entre SM et cholestérol dans la membrane.

- *Effets de la déplétion membranaire en SM*

La déplétion de la membrane en SM peut être réalisée en faisant agir une sphingomyélinase exogène. Les effets de cette enzyme ont été largement étudiés pour comprendre le métabolisme intra-cellulaire du cholestérol (474).

Schématiquement, la diminution de la SM membranaire induit une fuite du cholestérol du compartiment membranaire vers le micrososome, car la concentration en SM membranaire ne permet pas de retenir le cholestérol (474;476). Or, c'est la concentration en cholestérol localisé dans la membrane microsomiale qui régit les régulations de la synthèse (HMG CoA réductase) et d'estérification du cholestérol (Acyl Cholestérol Transférase). La protéine responsable de cette régulation est SREBP2 (sterol regulatory element binding protein). SREBP2 est une protéine de 1150 acides aminés située dans le réticulum endoplasmique et dans l'enveloppe nucléaire. Quand la concentration en cholestérol diminue dans le micrososome, SREBP est clivée. Ce clivage se fait en deux sites et permet de libérer un fragment de 68 kd de la partie N-terminale de la protéine (83;442) (figure 7). Ce fragment pénètre dans le noyau et active la transcription de plusieurs gènes cibles de la synthèse du cholestérol, le gène du récepteur des LDL, la cavéoline, SR-B1 etc....

Quand la concentration en cholestérol microsomial augmente, la protéine SREBP reste non clivée et donc inactive.

Le clivage de SREBP est effectué par une enzyme, la « SREBP cleavage activating protein » ou SCAP. Quand la concentration en cholestérol microsomial est élevée, cette enzyme reste ancrée dans la membrane. A l'inverse, lorsque la concentration en cholestérol diminue dans le micrososome, l'enzyme est libérée, ce qui permet le clivage de SREBP. La dégradation de la SM membranaire conduit à une augmentation de l'estérification du cholestérol. Les esters de cholestérol constituent la forme de stockage du cholestérol. Elle entraîne également une diminution de la synthèse de cholestérol liée à une inhibition de l'HMG-coA réductase, l'enzyme clé de la synthèse du cholestérol(83).

- *Effets de la déplétion de la membrane plasmique en cholestérol*

Un chélateur du cholestérol, la cyclodextrine, provoque sur des cellules en culture une diminution du contenu membranaire en cholestérol. Cette déplétion conduit à une translocation du cholestérol du micrososome vers la membrane plasmique (260). La diminution du pool microsomial du cholestérol conduit à une augmentation de l'expression de SREBP 2 et à une augmentation de la synthèse du cholestérol.

- *Les effets de l'augmentation de la SM membranaire*

Cet effet n'a pas été étudié. Néanmoins Gatt et Bierman (162) avait suspecté que l'incorporation de la sphingomyéline dans des fibroblastes pouvait influencer la synthèse de cholestérol et la synthèse des récepteurs des LDL.

## **6.6.2. La sphingomyéline et les cavéoles**

Les cavéoles et les rafts sont des domaines riches en cholestérol et en sphingomyéline (SM) (474). La confrontation des molécules de SM des feuillettes interne et externe de la membrane dans ces microdomaines confère à ces zones une cohésion, une stabilité et une perméabilité réduite. La sphingomyéline génère des domaines spécifiques décrits sur des biomembranes et mis en évidence sur le cardiomyocyte en culture (557;558). La formation de structure en interdigitations semble indispensable à la formation et à la stabilité de ces microdomaines, mieux décrits récemment, les cavéoles et les rafts. Ces zones membranaires influencent la courbure de la membrane et donc la forme de la cellule, mais ont aussi un rôle majeur dans le fonctionnement cellulaire.

## **6.7. Sphingomyéline et lipoprotéines**

### **6.7.1. La sphingomyéline dans l'alimentation**

#### ***Origine : les apports alimentaires***

Le lait est la principale source alimentaire de sphingomyéline (60-80 mmol/l). Les apports en sphingomyéline peuvent atteindre 40 mg /j.

#### ***Absorption***

La sphingomyéline contenue dans l'alimentation est dégradée dans l'intestin grêle, surtout au niveau duodénal, où l'activité de la sphingomyélinase est la plus importante. L'activité enzymatique est présente dans la lumière intestinale et au sein de la bordure en brosse. La bile augmente de façon très importante cette activité enzymatique. Le caractère alcalin de la bile favorise également la libération de l'enzyme dans la lumière digestive. Les mécanismes de cette activation ne sont pas pleinement élucidés. La conjugaison avec la taurine et l'interaction avec certains sels biliaires seraient en cause (124).

Grâce au marquage de la sphingomyéline, Schmelz *et al.* ont montré que la quasi-totalité de la SM absorbée était dégradée (451;452). Une faible proportion est réintégrée dans les sphingolipides, sécrétée par l'entérocyte sous la forme de chylomicrons. Les métabolites de la sphingomyéline, en particulier les céramides, ne passent pas la barrière intestinale et ne sont pas absorbés.

Les acides gras de la SM sont utilisés par l'entérocyte pour la synthèse de triglycérides. La base sphingoïde est transformée en aldéhyde à longue chaîne et en éthanolamine phosphate (348).

*La sphingomyéline des chylomicrons provient donc d'une synthèse de novo dans la cellule intestinale. On ignore si les apports alimentaires de SM influencent cette synthèse et si la composition des chylomicrons influence la composition en sphingomyéline des lipoprotéines de synthèse hépatique.*

### **6.7.2. Composition des lipoprotéines en sphingomyéline**

Dans le plasma, le SM est essentiellement véhiculé sous forme de lipoprotéines, surtout dans les LDL et moins dans les VLDL et HDL (98). La SM représente environ 20% des phospholipides des lipoprotéines (214). Les sphingolipides des VLDL sont essentiellement des céramides.

#### ***Origine de la SM des lipoprotéines***

La SM des lipoprotéines provient de la synthèse hépatique. Cette synthèse semble dépendre du métabolisme du cholestérol. La diminution de la synthèse hépatique de cholestérol se traduit en effet par une diminution parallèle du cholestérol et de la sphingomyéline des VLDL et des LDL alors que la concentration en sphingomyéline augmente dans les HDL (58).

#### ***Effets de la SM des lipoprotéines sur leur métabolisme***

*In vitro*, la sphingomyéline inhibe de façon importante la lipoprotéine lipase (426). Les forces d'interaction hydrophobe entre la SM et les triglycérides gêneraient la liaison de la lipoprotéine lipase avec son substrat. La sphingomyéline renforce l'organisation de la membrane et réduit l'hydratation de la région polaire des phospholipides, alors que le cholestérol augmente l'hydratation de cette région. Ce degré d'hydratation pourrait être la cause de la diminution de l'activité de la lipoprotéine lipase. La liaison des triglycérides à la lipoprotéine lipase dépendrait de la structure de la région polaire de la membrane, la sphingomyéline rendrait cette région plus compacte, ce qui entraverait son activité.

*In vivo*, la clairance des lipoprotéines enrichies en sphingomyéline est fortement ralentie (406). La sphingomyéline modifie les propriétés et la structure de la surface des HDL (62). Elle inhibe la lécithine acyl transférase (LCAT). La sphingomyéline pourrait donc altérer les échanges entre le HDL et la cellule et gêner l'efflux de cholestérol. En réalité, l'efflux de cholestérol lié à SR-B1 serait au contraire augmenté quand les HDL sont enrichies en phosphatidylcholine ou en sphingomyéline (555). Néanmoins l'enrichissement des HDL en sphingomyéline entraînerait surtout une diminution de l'influx de cholestérol dans la cellule plutôt qu'une augmentation de l'efflux. La composition en SM des HDL est augmentée chez des sujets diabétiques de type 2, même après une insulinothérapie intensive (29).

Une concentration élevée en sphingomyéline des lipoprotéines pourraient donc favoriser l'athérogénèse en ralentissant le catabolisme post-prandial des lipoprotéines riches en triglycérides (221).

### ***Influence de l'alimentation sur la composition des lipoprotéines en SM***

Une alimentation riche en acides gras saturés entraîne chez l'animal, une augmentation de la concentration en sphingomyéline plasmatique alors qu'une alimentation enrichie en huile d'olive n'a pas d'effet. L'huile d'olive a cependant des effets différents sur les différentes lipoprotéines, elle augmente la concentration en cholestérol et en SM des VLDL mais diminue celle des LDL et des HDL (163).

Les acides gras de la série n-3 modifient le profil des acides gras des phospholipides mais augmentent aussi le rapport Phosphatidylcholine/Sphingomyéline qui augmente dans la membrane de l'adipocyte (372).

### **Sphingomyélinase et lipoprotéines**

La sphingomyélinase pourrait favoriser l'estérification du cholestérol, l'internalisation des récepteurs des LDL et la maturation de SREBP1 (ou ADD1) dont la production est favorisée par le TNF $\alpha$  (14;476).

Les sphingomyélinases peuvent être sécrétées par la cellule notamment dans les situations de stress. La sphingomyélinase du macrophage peut favoriser l'agrégation des VLDL et des LDL, surtout si ces lipoprotéines ont été enrichies en SM (450). Une sphingomyélinase dépendante du Zinc est également sécrétée par l'endothélium vasculaire. Cette sécrétion est stimulée par des cytokines (IL1b et IFN $\gamma$ ) (305). Cette sphingomyélinase agit sur les LDL, favorise leur agrégation et stimule la formation de cellules spumeuses (450) et donc l'athérosclérose (304).

La composition en sphingomyéline des lipoprotéines pourrait donc intervenir dans l'athérogenèse. Une étude transversale a permis de conforter cette hypothèse chez l'homme (221).

### **6.8. Rôle des métabolites de la sphingomyéline dans la signalisation cellulaire**

- Les céramides

Les céramides produits lors de la dégradation de la SM activent plusieurs voies métaboliques dont les cascades des MAP kinases (mitogen protein kinases) et SAP kinases (stress-activated protein kinases). De très nombreux effets biologiques ont été imputés aux céramides (235;383). Les céramides peuvent être phosphorylés par une céramide kinase ou être dégradés par des céramidases.

Il est admis que les céramides interviennent dans la régulation de nombreux gènes et enzymes. Ils agissent sur la différenciation cellulaire et l'apoptose. Les céramides activent entre autres la « sérine/thréonine protein kinase » (CAPK), la « ceramide activated protein phosphatase » (CAPP) (380).

- La sphingosine et la sphingosine 1P

La sphingosine a également de nombreux effets biologiques. Elle inhibe la protéine kinase C, inhibe la libération du calcium, et inhibe l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline (19).

La sphingosine 1P a un récepteur membranaire, l'EDG 1 (574), dont le gène a été impliqué dans la différenciation des cellules endothéliales. La sphingosine 1P est présente dans le plasma et provient essentiellement des plaquettes. Un effet de la sphingosine 1P sur les cellules endothéliales est donc possible *in vivo* (262;521).

## 7. Conclusion

La baisse d'activité du système nerveux sympathique peut être une cause de prise de poids si elle est associée à un défaut de régulation de la prise alimentaire, par exemple le développement d'une résistance à la leptine ; ce défaut de régulation peut lui-même être la cause de la diminution de l'activité sympathique. Une diminution de la concentration en leptine plasmatique ou la diminution de l'effet de la leptine sur le système nerveux central (leptino-résistance) pourraient expliquer une baisse de l'activité du SNS. Ce mécanisme pourrait donc être en cause dans certaines obésités chez l'homme. Nous ne disposons pas d'étude prospective permettant d'étayer cette hypothèse. Aucune relation entre leptine et thermogénèse post prandiale ou entre leptine et dépense énergétique de repos n'a été mise en évidence chez l'homme, alors qu'il s'agit d'un mode d'action majeur de la leptine chez l'animal. La leptine entraîne chez le rongeur, une augmentation de la dépense énergétique par le biais de la stimulation du système sympathique qui active la thermogénèse du tissu adipeux brun. Cette stimulation est possible, chez l'animal, grâce à la présence de récepteurs  $\beta_3$ . Contrairement à l'animal, le rôle du  $\beta_3$  récepteur n'est pas établi chez l'homme où le muscle pourrait être le principal responsable de la thermogénèse (53).

Une absence d'adaptation de la réponse du SNS à la prise de poids, liée à un défaut d'action de l'insuline et/ou de la leptine ou une résistance périphérique à l'action des catécholamines peuvent également contribuer à une prise de poids constante, pouvant conduire à une obésité massive. Cela nous a conduit à nous intéresser à la relation entre le système nerveux sympathique, l'insulino-résistance et la résistance à la leptine chez des sujets ne présentant pas d'hypertension artérielle.



# **DEUXIEME PARTIE**

## **ETUDE DU SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE AU COURS DE L'OBESITE : RELATION AVEC LA RESISTANCE A L'INSULINE ET LA LEPTINE**

### **TRAVAUX DE RECHERCHE CLINIQUE**

#### **PREMIERE ETUDE CLINIQUE :**

**Effets de l'âge et de l'obésité sur la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle**

#### **DEUXIEME ETUDE CLINIQUE :**

**Etude de la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle au cours d'une charge orale en glucose chez des sujets obèses normotendus**

#### **TROISIEME ETUDE CLINIQUE :**

**Relation entre le système nerveux sympathique et la leptine: effets de la restriction calorique et de l'amaigrissement**

# **PREMIERE ETUDE CLINIQUE**

**Les effets de l'âge et de l'obésité sur la  
variabilité de la Fréquence Cardiaque et de la  
Pression Artérielle**

**S.C.D. - U.H.P. NANCY 1**  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique - BP 11  
54601 VILLERS-LES-NANCY Cédex

## 1. Avant propos

La première étude à laquelle nous avons participé sur ce thème (Fluckiger *et al.* (151)), avait pour but d'analyser l'évolution de la balance sympatho-vagale au cours du vieillissement chez l'homme sain normotendu.

Les principaux résultats dans cette population dont l'âge variait de 18 et 80 ans peuvent être ainsi résumés. Le vieillissement est associé à une diminution progressive du contrôle de la fonction cardiaque par le système nerveux autonome. La variabilité globale de la fréquence cardiaque (déviations standard dans le domaine temporel et puissance spectrale totale dans le domaine spectral) diminue linéairement avec l'âge, quelle que soit la position du sujet. Les puissances spectrales MF de la fréquence cardiaque en position debout, reflétant les modulations du SNS, et la puissance spectrale HF, déterminée lors d'une respiration à un rythme fixe diminue également linéairement avec l'âge. Une altération du contrôle baroréflexe de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque avec l'âge a pu être mise en évidence par une analyse spectrale croisée.

La corpulence des sujets n'avait pas fait initialement l'objet d'une attention particulière. En reprenant les données, nous avons pu établir que les principaux paramètres de l'analyse spectrale étaient corrélés négativement à l'indice de masse corporelle (IMC), dans cette population de poids normal ou en surpoids ( $IMC < 30 \text{ kg/m}^2$ ). Il existait également une corrélation positive entre l'âge et l'indice de masse corporelle ( $r = 0,32, p = 0,016$ ), ce qui est conforme aux données de la littérature (432). Les analyses multivariées ont montré que certains indices du SN autonome étaient corrélés négativement à l'IMC même après ajustement sur l'âge, notamment le rapport MF/HF de la FC en position debout ( $r = -0,48, p = 0,0004$ ).

Cet premier travail qui montrait l'existence d'un effet indépendant du surpoids sur la balance sympatho-vagale nous a conduit à étudier de façon plus spécifique le système nerveux autonome en fonction du degré de corpulence. Nous avons donc considéré une population de sujets obèses et non obèses dont l'âge variait aussi peu que possible.

## 2. Introduction

L'activité du SNS évaluée par la microneurographie ou par la mesure de la libération de noradrénaline (méthode du "spillover") serait élevée dans l'obésité constituée d'après plusieurs travaux (4;174;175;529). Cependant, le débat sur le rôle du SN autonome reste ouvert car des questions restent posées : 1) cette activité pourrait être variable selon l'organe ou le tissu étudié (529); 2) les résultats pourraient être influencés par l'origine ethnique et d'autres facteurs génétiques (424) ; 3) ils peuvent varier considérablement en fonction de la méthodologie utilisée ; 4) aucune étude longitudinale ne permet d'évaluer le caractère primaire ou secondaire des variations constatées (425;510).

Quelques études ont montré qu'il existait une diminution de la variabilité de la fréquence cardiaque au cours de l'obésité (175;176;384;565). Cependant différents facteurs confondants doivent être pris en compte. Les effets de l'âge (151), de la pression artérielle (340), du déconditionnement physique (310), d'éventuelles variations pondérales en rapport avec une restriction calorique (175) sont les principaux paramètres qu'il faut considérer chez le sujet obèse.

Nous avons considéré dans cette étude les effets de l'indice de masse corporelle (IMC), de l'insulino-résistance et de l'âge sur la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle chez des sujets obèses et non obèses. L'analyse a été faite dans trois situations : au repos (décubitus, respiration libre ou DRL), au cours d'une stimulation vagale en imposant un rythme respiratoire (décubitus, respiration imposée ou DRI), et lors d'une stimulation sympathique par l'orthostatisme (orthostatisme, respiration libre ou ORL)

## 3. Sujets et Méthodes

### 3.1. Sujets

Soixante-sept sujets ayant une surcharge pondérale ou une obésité et 45 sujets non obèses ont été inclus dans cette étude. Ces 112 sujets étaient âgés de 18 à 60 ans.

Le groupe surpoids-obésité comportait 31 hommes et 36 femmes. Deux sujets ont été préalablement exclus en raison de troubles du rythme auriculaire. Les sujets ont été répartis en 3 groupes selon leur indice de masse corporelle (IMC). Le groupe surpoids (IMC 25 - 29,9 kg/m<sup>2</sup>) comportait 7 hommes et 10 femmes, le groupe d'obésité modérée (IMC 30 - 39,9 kg/m<sup>2</sup>) 14 hommes et 16 femmes, le groupe d'obésité morbide

(IMC  $\geq$  40 kg/m<sup>2</sup>) 10 hommes et 10 femmes. Les sujets ont été recrutés à l'occasion d'un programme de prise en charge de l'obésité. Leur poids devait être stable au cours du mois précédent l'inclusion (variation inférieure à 1 %). La pression artérielle systolique devait être inférieure à 140 mmHg et la pression artérielle diastolique inférieure à 80 mmHg. Les sujets devaient être sédentaires (aucune activité physique sportive ou de loisir régulière et travail non physique).

Le groupe témoin comportait 45 sujets sédentaires (30 hommes et 15 femmes), en bonne santé. L'absence d'entraînement physique a été contrôlé en mesurant la VO<sub>2</sub> Maximale (inférieure ou égale à 80 % de la VO<sub>2</sub> max théorique).

Aucun des sujets n'avait d'hypertension artérielle ou de traitement antihypertenseur. Le dosage de la glycémie ou l'hyperglycémie provoquée par voie orale a permis d'exclure un diabète. La fonction thyroïdienne était normale. Aucun sujet ne recevait de traitement et tous étaient actifs mais sédentaires. Les fumeurs étaient exclus.

Le poids, la taille, le tour de taille et le tour de hanche ont été mesurés. Les caractéristiques des patients sont décrites dans le Tableau 1.

Les sujets ne devaient consommer ni alcool, ni café pendant les 12 heures précédant l'enregistrement. Les sujets ont signé un consentement éclairé avant l'inclusion.

## **3.2. Méthodes**

### **3.2.1. Enregistrement de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (voir chapitre 1.3.5 : méthodes d'étude, page 30)**

L'enregistrement simultané de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque a été réalisé à l'aide d'un capteur digital d'un moniteur Finapres 2300 (Ohmeda, France) installé au niveau de la 2<sup>ème</sup> phalange du majeur de la main gauche. Pour éviter toute fluctuation d'origine hydrostatique, la main était placée à hauteur du cœur (4<sup>ème</sup> espace intercostal sur la ligne axillaire médiane). Le Finapres enregistre à la fois la fréquence cardiaque et les pressions artérielles systolique, diastolique et moyenne.

Nous avons réalisé trois enregistrements successifs d'au moins cinq minutes chacun :

- Lors du premier enregistrement, le sujet était installé en décubitus dorsal ; cette position est définie comme la position de référence pour l'activité du système nerveux autonome, en l'absence de stimulation sympathique et vagale.
- Ensuite, le sujet restait en décubitus, mais devait respirer à un rythme imposé de 12 cycles/minute à l'aide d'un métronome ; cette manœuvre qui stimule le nerf vague permet d'amplifier les oscillations d'origine respiratoire.
- Lors du dernier enregistrement, le sujet devait se mettre debout ; l'orthostatisme permet en effet d'amplifier les oscillations lentes d'origine sympathique.

### **3.2.2. Acquisition et traitement des données**

Le Finapres est relié à un micro-ordinateur PC (Compaq SX), équipé d'un logiciel d'acquisition Anapres 3.0 (Notocord Systems, France). Le traitement des valeurs de pression artérielle et de fréquence cardiaque, enregistrées toutes les secondes au niveau du Finapres, est réalisé à l'aide du logiciel Microsoft Excel qui, couplé au logiciel Anapres, effectue l'analyse spectrale grâce à une transformée rapide de Fourier sur 256 secondes d'enregistrement.

Ce logiciel permet aussi de réaliser une analyse spectrale croisée (cross-spectrum) pour évaluer la relation entre les variations spontanées de la pression artérielle systolique et celles de la fréquence cardiaque. Les valeurs du gain ont été moyennées pour les bandes MF, lorsque la cohérence moyenne était supérieure à 0,5.

### **3.2.3. Expression des résultats de l'analyse spectrale**

Les paramètres suivants ont été calculés pour chacune des positions étudiées, pour la fréquence cardiaque et la pression artérielle :

Les valeurs moyennes de la fréquence cardiaque (bpm) et de la pression artérielle systolique et diastolique (mmHg);

La variabilité à court terme dans le domaine spectral est représentée par les *puissances spectrales*, calculées en intégrant l'aire sous la totalité du spectre ou sous un pic en particulier ;

- La puissance spectrale totale (aire totale sous le spectre) correspond à la variance de la variable étudiée (variabilité totale) ;
- Les moyennes fréquences (MF), calculées pour le pic situé à 0,100 Hz (entre 0,066 et 0,129 Hz) quantifie les oscillations de Mayer de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque;
- Les hautes fréquences (HF) calculées pour le pic centré sur la fréquence respiratoire (en intégrant une bande de 50 mHz autour du maximum du pic) quantifie les oscillations respiratoires de la pression artérielle ou de la fréquence cardiaque ;

Les puissances spectrales sont exprimées :

- en unité absolue (u.a.) (mmHg/ $\sqrt{\text{Hz}}$  pour la pression artérielle, battements par minute / $\sqrt{\text{Hz}}$  pour la fréquence cardiaque) ;
- en unité normalisée (u.n.) ou relative = pourcentage de la puissance spectrale totale à l'exclusion des basses fréquences, traduisant la contribution d'une oscillation à la variabilité totale ;

Le rapport des puissances spectrales MF/HF a également été utilisé.

### **3.2.4. Déroulement de l'étude**

Le protocole débute le matin après 12 heures de jeûne, au calme, dans une pièce à une température de 20-22°C .

Après dix minutes de repos en décubitus, l'enregistrement Finapres de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque est réalisé au cours des trois séquences suivantes : 1) en décubitus-respiration libre (DRL), 2) en décubitus-respiration imposée (DRI) et 3) en orthostatisme-respiration libre (ORL).

Le respect des conditions de recueil stationnaire implique une période de stabilisation du signal entre chaque position (environ 10 minutes).

### 3.2.5. Sensibilité à l'insuline

La valeur du HOMA (Homeostasis model assessment) a été utilisée pour évaluer la sensibilité à l'insuline. Cette méthode rapportée par Mathiews *et al.* (319) est basée sur la mesure de deux insulinémies à jeun ( $t = -5$  min et  $t = 0$ ) et deux mesures de glycémies. La formule est la suivante:  $\text{insuline (mU/ml)} \times \text{glycémie (mmol/l)} / 22,5$ . La glycémie est mesurée par la méthode de la glucose oxydase (Beckman Instruments Inc, Fullerton, CA). L'insulinémie est déterminée par une méthode immuno-enzymatique (Insulin IMX. Abbott laboratories, Tokyo, Japan). Le coefficient de variation intra-analyse était de 4% et le coefficient inter-analyse de 6%. La réaction croisée avec la proinsuline était de 0,05 %.

### 3.2.6. Analyse statistique

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type. Nous avons utilisé les logiciels Statview version 5.0 (SAS institute, Cary, NC) et BMDP statistical software (Berkeley, CA, University of California press, 1992) pour l'analyse statistique. La normalité des variables a été vérifiée en calculant les coefficients d'asymétrie et d'aplatissement (Skewness et Kurtosis).

Une analyse de la variance a été utilisée pour comparer les moyennes de plusieurs groupes. Un test *a posteriori* (test de Student Newman Kells) a permis d'analyser les différences inter-groupes. Les relations entre les paramètres ont été étudiées à l'aide de régressions linéaires et le cas échéant de régressions multiples. Les valeurs ont été rapportées en moyennes  $\pm$  SD. Un  $p < 0,05$  était pris comme seuil de signification pour l'ANOVA et  $p < 0,01$  pour les comparaisons entre les sujets en surcharge pondérale ou obèses et les sujets témoins (Test de Student-Newman-Keuls).



## 4. Résultats

### 4.1. Description des sujets et paramètres de variabilité de la FC et de la PA

L'âge, le sex-ratio, la fréquence cardiaque et la pression artérielle de repos n'étaient pas différents dans les 3 groupes de sujets obèses et chez les sujets témoins (Tableau 1).

**Tableau 1 :** Description des sujets

	Témoins	Surpoids	Sujets obèses		p (ANOVA)
Classes d' IMC (kg/m <sup>2</sup> )	18,5-24,9 (n=45)	25-29,9 (n=17)	30-39,9 (n=30)	≥ 40 (n=20)	
Age (ans)	41,0 ± 13,1	39,8 ± 11,1	39,3 ± 12,9	33,2 ± 9,9	NS
Sexe ratio	30/15	8/9	14/16	10/10	NS
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22,3 ± 1,7	27,0 ± 1,5*	35,6 ± 3,2*	47,1 ± 6,3*	<0,001
Taille/Hanche	-	0,86 ± 0,03	0,92 ± 0,09	0,98 ± 0,18	0,028
HOMA	-	3,0 ± 1,5	5,3 ± 3,5*	6,3 ± 3,5*	0,010
PAS (mmHg)	110,1 ± 15,5	112,0 ± 19,6	119,5 ± 17,6	113,0 ± 15,7	NS
PAD (mmHg)	60,7 ± 9,0	62,7 ± 11,4	64,0 ± 12,2	60,8 ± 11,6	NS
FC (bpm)	64,4 ± 10,3	66,8 ± 6,9	70,4 ± 9,9	69,8 ± 11,3	NS

IMC signifie indice de masse corporelle; HOMA, homeostatic model assessment ; PAS, pression artérielle systolique ; PAD, pression artérielle diastolique ; FC, fréquence cardiaque.

La distribution de l'âge et de l'IMC n'était pas différente dans les deux sexes. D'autre part, nous n'avons pas trouvé de différences liées au sexe pour les paramètres de variabilité de la FC et de PA. Les données des hommes et des femmes ont donc été rassemblées.

- **Les puissances totales et les moyennes fréquences**

#### **Au repos (DRL) (Tableau 2 A )**

Les puissances totales n'étaient pas statistiquement différentes dans les quatre groupes, de même que les puissances MF (u.a.) et les HF (u.a.).

Les valeurs de MF (u.n.) de la FC et de la PA étaient plus basses dans les deux groupes de sujets obèses que dans le groupe de sujets témoins. Les basses fréquences (BF) de la pression artérielle systolique (PAS) étaient significativement augmentées dans le groupe de sujets d'obésité modérée (IMC : 30 – 39,9 kg/m<sup>2</sup>) au repos.

### **En orthostatisme (ORL) (Tableau 2 B )**

*Les puissances totales* de la PAS, la PAD et la FC n'étaient pas statistiquement différentes dans les quatre groupes mais étaient significativement augmentées par rapport au repos ( $p < 0,01$ ).

*Les puissances totales des MF de la PAS, PAD et de la FC* étaient significativement augmentées en comparaison aux valeurs en DRL ( $p < 0,01$ ). Ces valeurs étaient plus basses dans le groupe des sujets d'obésité morbide ( $p < 0,05$ ) en comparaison au groupe surpoids.

*Les MF (u.n.) de la FC et de la PAD* étaient significativement augmentées par rapport au repos ( $p < 0,01$ ), mais était plus basses dans les deux groupes de sujets obèses ( $p < 0,05$ ). Les MF (u.n.) de la PAS augmentaient significativement dans les quatre groupes par rapport au repos ( $p < 0,05$ ), mais n'étaient pas significativement différentes dans les 4 groupes.

### **La valeur du gain baroréflexe**

La valeur du gain baroréflexe, mesurée sur les bandes 0,090 et 0,110 Hz en orthostatisme était abaissée chez les sujets obèses (Tableau 2).

### **En décubitus respiration imposée (DRI) (Tableau 2 C )**

*Les puissances totales* de la PAS, la PAD et la FC n'étaient pas statistiquement différentes dans les quatre groupes.

Les MF en u.a. n'étaient pas différentes en respiration imposée en comparaison aux valeurs en DRL.

- **Les hautes fréquences**

### **Au repos (DRL) (Tableau 2 A )**

Les HF de la PAS, de la PAD et de la FC en u.a. et en u.n. n'étaient pas statistiquement différentes dans les quatre groupes.

### **En orthostatisme (ORL) (Tableau 2 B )**

Les HF en u.a. n'étaient pas statistiquement différentes dans les quatre groupes. En u.n. , les valeurs de HF de la PAS et de la FC étaient plus basses dans le groupe de sujets ayant un surpoids.

En moyenne, les HF étaient significativement plus élevées en ORL qu'en DRL dans le groupe de sujets témoins ou en surpoids, pour la PAS et la PAD quand les valeurs étaient exprimées en u.a. et pour la PAS et la FC quand elles étaient exprimées en u.n.

### **En décubitus respiration imposée (Tableau 2 C )**

Les HF en u.a. et en u.n. n'étaient pas différentes dans les quatre groupes. En moyennes ces valeurs étaient plus élevées qu'en DRL, pour la PAS, la PAD et la FC.

**Tableau 2** : Puissances spectrales (unité absolue) et unité normalisée des MF et des HF de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle en décubitus respiration libre (DRL) (A), et en orthostatisme respiration libre ORL et le gain baroréflexe en ORL (B) , décubitus respiration imposée (DRI) (C).

**A** : Puissances spectrales (unité absolue) et unité normalisée des MF et des HF de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle en décubitus respiration libre (DRL)

	Témoins	Surpoids	Sujets obèses		p (ANOVA)
Classes d'IMC	18,5 - 24,9 n=45	25 - 29,9 n=17	30 - 39,9 n=30	≥ 40 n=20	
<b>Décubitus respiration libre</b>					
<b>DRL</b>					
<b>Total</b> (0,040-0,400 mHz)	28,4 ± 9,0	28,5 ± 6,6	34,3 ± 10,0	30,1 ± 12,2	NS
PAS (mmHg/VHz)	16,1 ± 7,2	17,2 ± 4,0	20,3 ± 6,7	17,5 ± 6,9	NS
PAD (mmHg/VHz)	21,6 ± 9,7	29,1 ± 12,8	28,4 ± 17,6	24,8 ± 11,7	NS
FC (bpm/VHz)					
<b>BF</b>					
PAS (mmHg/VHz)	14,1 ± 5,2	14,1 ± 3,8	17,9 ± 5,4*	12,9 ± 4,1	0,010
PAD (mmHg/VHz)	7,4 ± 4,0	7,8 ± 1,9	9,2 ± 2,6	7,4 ± 3,1	NS
FC (bpm/VHz)	7,0 ± 2,9	8,7 ± 3,1	9,2 ± 4,1	8,4 ± 3,2	NS
<b>MF</b> (0,066 – 0,129 Hz)					
PAS (mmHg/VHz)	6,9 ± 2,7	6,7 ± 2,0	7,3 ± 3,1	6,0 ± 2,8	NS
PAD (mmHg/VHz)	4,6 ± 2,0	4,8 ± 1,9	4,9 ± 2,2	3,8 ± 1,8	NS
FC (bpm/VHz)	5,3 ± 2,9	6,4 ± 3,3	5,8 ± 3,2	4,4 ± 2,3	NS
<b>HF</b> (0,050 Hz)					
PAS (mmHg/VHz)	2,2 ± 1,6	1,7 ± 0,6	2,9 ± 2,0	2,4 ± 1,6	NS
PAD (mmHg/VHz)	1,2 ± 1,1	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,9	1,4 ± 0,9	NS
FC (bpm/VHz)	2,7 ± 2,0	2,7 ± 1,2	3,3 ± 2,4	2,4 ± 1,9	NS
<b>MF u.n.</b>					
PAS	24,6 ± 5,8	22,7 ± 5,4	20,4 ± 4,6*	19,0 ± 4,8*	0,0003
PAD	29,2 ± 8,9	26,2 ± 5,8	23,0 ± 4,9*	21,5 ± 6,0*	0,0002
FC	24,5 ± 6,3	21,7 ± 5,2	19,6 ± 4,2*	19,5 ± 4,4*	0,0005
<b>HF u.n.</b>					
PAS	7,3 ± 3,1	6,1 ± 2,8	8,0 ± 5,2	7,5 ± 4,9	NS
PAD	7,1 ± 3,3	5,3 ± 1,6	7,0 ± 3,9	7,1 ± 4,8	NS
FC	12,1 ± 6,0	10,0 ± 3,4	10,7 ± 4,9	8,8 ± 3,8	NS

**B** : Puissances spectrales (unité absolue) et unité normalisée des MF et des HF de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle en orthostatisme respiration libre ORL et le gain baroréflexe en ORL.

	Témoins	Surpoids	Sujets obèses	p (ANOVA)	
<b>Orthostatisme respiration libre</b>					
<b>Total</b> (0,040-0,400 mHz)					
PAS (mmHg/VHz)	37,7 ± 12,7	43,1 ± 13,2	44,4 ± 22,5	36,8 ± 8,8	NS
PAD (mmHg/VHz)	22,9 ± 9,8	26,3 ± 26,3	24,9 ± 6,7	21,1 ± 5,3	NS
FC (bpm/VHz)	28,0 ± 13,2	35,3 ± 14,8	35,0 ± 17,9	29,4 ± 11,5	NS
<b>HF</b> (0,050mHz)					
PAS (mmHg/VHz)	3,5 ± 1,8 $\square$	2,7 ± 1,7 $\square$	3,1 ± 1,4	2,8 ± 1,8	NS
PAD (mmHg/VHz)	1,6 ± ,9 $\square$	1,5 ± ,7 $\square$	1,8 ± 1,0	1,3 ± ,7	NS
FC (bpm/VHz)	2,6 ± 1,7	2,9 ± 2,5	3,4 ± 3,4	2,2 ± 1,6	NS
<b>MF</b> (0,066 – 0,129 Hz (u.a.))					
PAS (mmHg/VHz)	10,8 ± 4,7 $\square$	13,2 ± 5,8 $\square$	11,7 ± 5,4 $\square$	9,1 ± 3,4 $\square$ #	0,049
PAD (mmHg/VHz)	7,3 ± 3,3 $\square$ #	9,5 ± 3,8 $\square$	7,6 ± 3,4 $\square$	6,3 ± 2,5 $\square$ #	0,034
FC (bpm/VHz)	8,0 ± 4,6 $\square$ #	10,9 ± 5,31 $\square$	7,7 ± 5,3 $\square$ #	6,4 ± 4,2 $\square$ #	0,046
<b>HF u.n.</b>					
PAS	9,5 ± 4,2 $\square$	6,1 ± 2,4*	7,5 ± 3,4	7,9 ± 5,0	0,013
PAD	7,6 ± 3,3	5,5 ± 1,7	6,5 ± 3,0	6,1 ± 3,3	0,060
FC	9,9 ± 3,6 $\square$	7,4 ± 3,2 $\square$ *	8,8 ± 3,7	7,8 ± 3,7	0,049
<b>MF u.n.</b>					
PAS	28,6 ± 6,2 $\square$	29,0 ± 7,8 $\square$	25,5 ± 6,6 $\square$	25,1 ± 6,8 $\square$	0,075
PAD	33,6 ± 7,7 $\square$	32,2 ± 6,5 $\square$	28,1 ± 6,7 $\square$ *	29,0 ± 8,5 $\square$	0,011
FC	29,5 ± 7,3 $\square$	26,6 ± 9,4 $\square$	21,8 ± 5,4 $\square$ *	22,3 ± 6,2 $\square$ *	<0,001
<b>MF Gain</b> (bpm/ mmHg)	n= 43 1,0 ± 0,5	n= 15 0,65 ± 0,30*	n= 20 0,72 ± 0,22	n= 16 0,68 ± 0,25*	0,002

**C** : Puissances spectrales (unité absolue) et unité normalisée des MF et des HF de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle en décubitus respiration imposée (DRI).

	Témoins	Surpoids	Sujets obèses		p (ANOVA)
<b>Décubitus respiration imposée</b>					
<b>Total (0,040-0,400 mHz)</b>					
PAS (mmHg/VHz)					
PAD (mmHg/VHz)	29,1 ± 7,0	34,7 ± 11,3	37,4 ± 15,6	30,6 ± 17,0	NS
FC (bpm/VHz)HF (u.a.)	16,6 ± 4,2 22,4 ± 8,2	19,4 ± 6,0 29,0 ± 11,8	20,6 ± 11,4 29,9 ± 25,4	16,3 ± 5,9 23,7 ± 11,2	NS NS NS
<b>MF (0,066 – 0,129 Hz (u.a.))</b>					
PAS (mmHg/VHz)	6,8 ± 2,5	7,1 ± 2,3	8,0 ± 4,7	5,6 ± 3,1	NS
PAD (mmHg/VHz)	4,3 ± 1,7	4,7 ± 1,6	4,7 ± 2,7	3,0 ± 1,6#*	0,016
FC (bpm/VHz)	4,7 ± 2,0	6,1 ± 2,3	5,9 ± 4,4	3,5 ± 1,7#	0,007
<b>HF(0,050mHz)</b>					
PAS (mmHg/VHz)	3,5 ± 1,4□	4,1 ± 2,0□	4,1 ± 1,9□	4,1 ± 2,1□	NS
PAD (mmHg/VHz)	1,7 ± 0,9□	2,2 ± 1,2□	2,4 ± 1,5□	2,3 ± 1,4□	NS
FC (bpm/VHz)	4,1 ± 2,5□	6,9 ± 4,9□	4,8 ± 3,8□	5,7 ± 5,5□	NS
<b>HF u.n.</b>					
PAS	12,1 ± 4,5□	12,5 ± 5,8□	10,4 ± 4,2□	13,8 ± 7,0□	NS
PAD	10,2 ± 4,9□	11,3 ± 4,3□	11,1 ± 4,7□	13,5 ± 7,2□	NS
FC	17,8 ± 7,4□	20,7 ± 7,3□	16,7 ± 8,8□	19,7 ± 11,1□	NS
<b>MF u.n.</b>					
PAS	23,1 ± 6,3	21,5 ± 6,5	18,4 ± 4,2	18,0 ± 4,9*	0,0007
PAD	26,1 ± 9,0	23,9 ± 6,1	21,1 ± 5,3	19,1 ± 5,7*	0,0015
FC	21,0 ± 5,4	20,8 ± 5,3	18,7 ± 5,4*	16,0 ± 3,9*	0,0029

PAS signifie pression artérielle systolique; PAD, pression artérielle diastolique ; FC, fréquence cardiaque ; MF (% de la puissance spectrale totale), moyennes fréquences ; HF (% de la puissance spectrale totale), hautes fréquences. U.n. : unité normalisée ; u.a. : unité absolue

\* : Comparaison avec le groupe témoin  $p < 0,05$

# : Comparaison avec le groupe surpoids  $p < 0,05$

□ : Comparaison entre les positions ORL et DRL et entre DRI et DRL  $p < 0,01$

## 4.2. Corrélations avec l'IMC, l'âge et le HOMA

- **IMC et âge**

- Dans toute la population étudiée (valeurs entre parenthèses dans le tableau 3)

En DRL et en ORL, les MF (u.n.) de la PA et de la FC étaient corrélées négativement à l'IMC après ajustement sur l'âge (Tableau 3). En valeur absolue, les puissances spectrales des MF de la FC, en ORL, étaient également corrélées négativement à l'IMC ( $r=-0,29$  ;  $p=0,0013$ ), de même que les MF de la PAS ( $r=-0,23$  ;  $p=0,018$ ).

Les différences entre les MF de la FC en position debout et couchées (delta) étaient significativement et négativement corrélées à l'IMC même après ajustement sur l'âge: IMC ( $r=-0,27$ ;  $\beta= -0,0018$ ;  $p=0,005$ ); l'âge ( $r=-0,40$   $\beta= -0,002$   $p<0,0001$ ).

- Dans la population de sujets obèses et en surpoids ( $IMC \geq 25$  kg/m<sup>2</sup>)

En DRL les MF (u.n.) de la PA était corrélées négativement à l'IMC. Dans ce sous groupe, les MF (u.n.) de la FC était corrélées à l'IMC après ajustement sur l'âge. En ORL, les MF (u.n.) de la FC était corrélées à l'IMC, de même que les MF de la PAS (u.n.).

Les BF étaient négativement corrélées à l'âge en DRL ( $r=-0,35$  ;  $p=0,0004$ ), en DRI ( $r=-0,38$  ;  $p=0,0001$ ), et en ORL ( $r=-0,40$  ;  $p<0,0001$ ). Dans ce sous groupes de sujets, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre les MF de la FC et de la PA avec le rapport taille/hanche.

Les HF (u.n.) de la FC et de la PA n'étaient corrélées ni à l'IMC, ni aux valeurs de HOMA. Par contre, l'âge contribuait de façon indépendante à la diminution des HF (u.n.) en DRI ( $r=-0,36$  ;  $p=0,001$ ).

- **HOMA**

- En ORL, les MF de la FC et de la PA étaient corrélées négativement aux valeurs de HOMA en unités normalisée (Tableau 4, Figure 1) comme les puissances spectrales ( $r=-0,27$ ;  $p=0,028$  pour les MF de la FC ;  $r=-0,31$ ;  $p=0,020$  pour les MF de la PAS).

- Les différences entre les MF de la FC en position debout et couchées (delta) étaient significativement et négativement corrélées au HOMA indépendamment de l'effet de l'âge ( $r=-0,36$ ;  $\beta= -0,007$ ;  $p=0,008$ ) mais dans ce cas l'effet de l'IMC n'était plus significatif.

- L'analyse multivariée a révélé que les valeurs de HOMA étaient significativement corrélées aux MF(u.n.) de la FC, indépendamment de l'IMC et de l'âge (Tableau 5).

- La régression multiple pas à pas a montré que les valeurs de HOMA, l'âge et l'IMC pouvaient expliquer 36% de la variance des MF(u.n.) de la FC (Tableau 6).

- Les HF n'étaient pas corrélées au HOMA.

**Tableau 3** : Régressions multiples, coefficients de corrélation partielle entre les moyennes fréquences (variable dépendante), l'IMC et l'âge (variables indépendantes) dans toute la population (entre parenthèse) (n=112) et chez les sujets en surpoids ou obèses (n=67).

		Decubitus		Orthostatisme	
		r	p	r	P
PAS MF (u.n.)	IMC	-0,346 (-0,425)	0,006 (<0,0001)	-0,201 (-0,234)	0,119 (0,016)
	Age	0,042 (-0,021)	NS (NS)	-0,010 (-0,029)	NS (NS)
PAD MF (u.n.)	IMC	-0,361 (-0,411)	0,004 (<0,0001)	-0,164 (-0,296)	0,204 (0,002)
	Age	-0,028 (-0,105)	NS (0,249)	-0,116 (-0,171)	NS (0,069)
FC MF (u.n.)	IMC	-0,250 (-0,381)	0,051 (<0,0001)	-0,320 (-0,478)	0,009 (<0,0001)
	Age	-0,093 (-0,132)	NS (NS)	-0,323 (-0,388)	0,008 (<0,0001)

PAS signifie pression artérielle systolique ; PAD, pression artérielle diastolique ; FC, fréquence cardiaque ; MF (% de la puissance spectrale totale), moyennes fréquences.

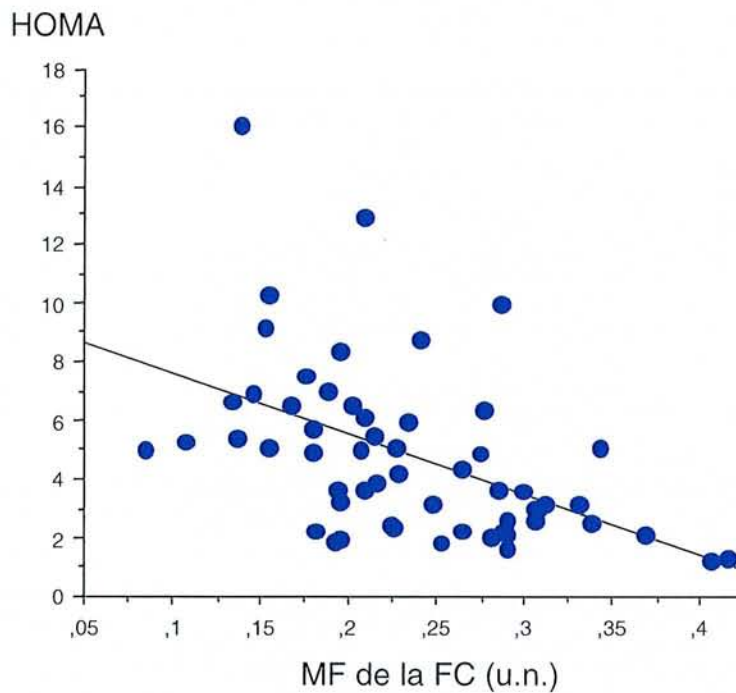
**Tableau 4** : Coefficients de régression simple entre les moyennes fréquences de la PAS, PAD et de la FC en DRL, et en ORL et les valeurs de HOMA chez les sujets en surcharge pondérale ou obèses (n=59).

HOMA	Decubitus		Orthostatisme	
	r	p	r	P
PAS MF (u.n.)	-0,054	NS	-0,285	0,033
PAD MF (u.n.)	-0,115	NS	-0,304	0,023
FC MF (u.n.)	-0,233	0,083	-0,455	0,0004

PAS signifie pression artérielle systolique ; PAD, pression artérielle diastolique ; FC, fréquence cardiaque ; MF (% de la puissance spectrale totale), moyennes fréquences; HF (% de la puissance spectrale totale), hautes fréquences ; HOMA, homeostatic model assessment.



**Figure 1 :** Relation entre le HOMA et les MF de la fréquence cardiaque en ORL.



**Tableau 5 :** Analyse des régressions multiples entre les moyennes fréquences en ORL (variable dépendante) et le HOMA, l'IMC et l'âge (n=59).

MF (u.n.)	PAS		PAD		FC	
	r	p	r	p	R	P
HOMA	-0,309	0,033	-0,346	0,016	-0,477	<0,001
Age	-0,112	NS	-0,246	0,065	-0,369	<0,001
IMC	-0,175	NS	-0,109	NS	-0,226	0,047

*IMC signifie indice de masse corporelle ; HOMA, homeostatic model assessment ; PAS, pression artérielle systolique ; PAD, pression artérielle diastolique ; FC, fréquence cardiaque ; MF (% de la puissance spectrale totale), moyennes fréquences.*

**Tableau 6 :** Analyse de régression pas à pas entre les moyennes fréquences de la fréquence cardiaque (MF FC,u.n.) en ORL et les variables indépendantes: le HOMA, l'IMC et l'âge (n=59).

FC MF u.n.	$\beta$	SE	$r^2$	p
HOMA	-0,008	0,003	0,21	0,0004
Age	-0,002	0,001	0,30	<0,0001
IMC	-0,002	0,001	0,36	<0,0001

*IMC signifie indice de masse corporelle ; FC, fréquence cardiaque ; MF (% de la puissance spectrale totale), moyennes fréquences ; HOMA, homeostatic model assessment. Un  $p < 0,05$  était pris comme seuil de signification*

### 4.3. Etude de la sensibilité du baroréflexe

La cohérence des spectres de FC et de PA a été évaluée par une analyse spectrale croisée sur les enregistrements en orthostatisme. Aucun des témoins (n=45) et 16 sujets obèses sur 67 avaient une cohérence inférieure à 0,5. Ces sujets ont donc été exclus de l'analyse. Les valeurs de gain étaient corrélées négativement à l'IMC ( $r=-0,45$  ;  $p<0,0001$ ) et au valeur de HOMA ( $r=-0,43$  ;  $p=0,037$ ), indépendamment de l'âge.

## 5. Discussion

### • Principaux résultats

Cette étude montre qu'en orthostatisme, les moyennes fréquences et la sensibilité du baroréflexe diminuent avec la corpulence. Cette relation est essentiellement liée à l'insulino-résistance des sujets, que nous avons évaluée par la valeur du HOMA. Ainsi cet indice contribue pour 21% à la variance des MF de la FC. L'âge est associé à une diminution des MF et des HF indépendamment de l'IMC. Au repos, nous avons également observé une diminution des moyennes fréquences. L'âge est également associé à une diminution des MF et des HF indépendamment des autres facteurs.

Ces résultats suggèrent que la réactivité du système sympathique lors d'une stimulation par l'orthostatisme est altérée chez le sujet obèse insulino-résistant et que cette diminution est liée à une atteinte de la sensibilité du baroréflexe.

Une diminution de la variabilité de la FC a été rapportée dans quelques études (384;565). Cependant, dans l'étude de Zahorska-Markiewicz (565) seules les HF étaient abaissées. Piccirillo *et al.* (385) ont également trouvé une diminution des MF de la FC associée à une augmentation de la concentration en noradrénaline chez des sujets obèses. Par contre les MF de la PA étaient augmentées. Mais il faut souligner que dans cette étude la PA était plus élevée chez les sujets obèses, ce qui peut expliquer cette discordance. L'hypertension artérielle, fréquente au cours de l'obésité, peut influencer la variabilité de la PA et de la FC (101;184). L'hypertonie sympathique peut aussi être une cause d'hypertension artérielle chez les sujets obèses (312). Par ailleurs les sujets obèses étaient un peu plus âgés que les témoins, ce qui peut contribuer à la diminution de la variabilité de la FC dans cette étude (385).

- **Effets de l'obésité sur la variabilité de la FC et de la PA et sur la sensibilité du baroréflexe**

En analyse univariée, nous avons observé des corrélations négatives entre les MF de la FC et de la PA et l'IMC, au repos et en orthostatisme. Les MF dépendent essentiellement des modulations du SNS mais aussi de la composante vagale du système nerveux autonome. Cette diminution ne peut être attribuée à une diminution des modulations du parasympathique car les HF, modulations liées uniquement au système parasympathique ne sont pas affectées.

La diminution des oscillations des MF de la pression artérielle peut résulter d'une diminution de la vasomotricité (278;279). Valensi *et al.* (518) ont en effet mis en évidence une altération de la vasomotricité cutanée chez les sujets obèses. Cependant ces modulations peuvent également dépendre du baroréflexe. Or dans notre étude la sensibilité du baroréflexe est diminuée chez les sujets obèses. Ces résultats sont en accord avec ceux de Grassi *et al.* (174;175) et de Picirello *et al.* (385) qui trouvent une altération de la sensibilité du baroréflexe chez les sujets obèses normotendus. Cela suggère que cette altération soit la cause de la diminution de l'activation du système nerveux sympathique du sujet obèse.

- **Insulino-résistance**

Le résultat le plus intéressant de cette étude est la mise en évidence du rôle propre de l'insulino-résistance dans la diminution de la variabilité de la fréquence cardiaque.

Or, il a bien été montré que l'activité du SNS mesurée en microneurographie ou par le flux de noradrénaline libérée par les tissus était augmentée dans l'obésité (111;144;421;536). Nous pensons que cette activation peut, comme dans l'insuffisance cardiaque, s'accompagner d'une diminution de la réponse du tissu cardio-vasculaire par un mécanisme de désensibilisation. Ce phénomène peut être accentué par l'insulino-résistance car l'insuline facilite la désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (30;358).

La diminution des MF ne peut être expliquée que par une diminution de l'activité du SNS ou par une diminution de la réponse des tissus. La composante vagale des MF ne semble pas en cause puisque les HF ne sont pas diminuées. On peut également observer dans certaines situations physiologiques une diminution de la modulation de la FC des MF lorsque le tonus est très élevé; c'est le mécanisme de saturation. Ce phénomène est observé lors d'un effort physique intense (81). Dans notre étude, les MF augmentent en orthostatisme par rapport au repos, ce mécanisme peut donc être exclu.

La diminution de la réponse au SNS peut être liée à une désensibilisation des récepteurs adrénergiques, ou à une altération dans la chaîne de transmission du signal à l'étape post-récepteur (346). Ce mécanisme a été incriminé dans la diminution de la variabilité de la FC du sujet âgé (346;548). Chez le sujet obèse, Blaak *et al.* (55) ont montré que la réponse vasodilatatrice dépendante des récepteurs  $\beta_1$  est diminuée. D'autres tissus présentent également une diminution de la sensibilité aux catécholamines, c'est le cas du tissu adipeux *in vitro* (409) ou *in vivo* (65). La désensibilisation des récepteurs adrénergiques a également été rapportée dans l'insuffisance cardiaque (103).

- **Effets de l'âge.**

Nous avons montré dans une étude précédente (151) que la variabilité de la fréquence cardiaque diminue avec l'âge indépendamment du poids, au repos et en orthostatisme. Les résultats présentés ici, montrent également que la variabilité de la FC diminue avec l'âge au repos comme en ORL. Cela a été montré dans d'autres

études (463;514;531). Shannon *et al.* (463) rapportent que les MF (u.n.) de la FC sont diminuées chez le sujet âgé. Barnet *et al.* (37) trouvent une diminution des MF de la PA en orthostatisme.

- **Effets de l'IMC sur les HF**

Contrairement à d'autres études (382;517;519;565), nous ne trouvons pas de diminution des HF avec l'augmentation de l'IMC, notamment chez les sujets obèses morbides. Deux explications peuvent être données. Les sujets témoins recrutés dans cette étude étaient tous sédentaires, comme les sujets obèses. Le déconditionnement physique pourrait expliquer la baisse des HF rapportées dans ces études chez les sujets obèses. La capacité vitale diminue chez le sujet obèse parallèlement à la masse grasse (166), ce qui conduit à une augmentation de la fréquence respiratoire. En respiration imposée à 12 cycles par minutes, ces patients doivent réduire leur fréquence respiratoire et augmenter leur volume courant. Ces deux facteurs sont associés à une augmentation des variations de la FC synchrones de la respiration (256;494;550).

En conclusion, le contrôle du système cardio-vasculaire par le système nerveux autonome est altéré chez le sujet obèse non diabétique et normotendu. Il existerait donc une dysfonction autonome cardio-vasculaire essentiellement liée à l'insulino-résistance, et à la surcharge pondérale touchant notamment la sensibilité du baroréflexe et le système nerveux sympathique. Le vieillissement est un facteur aggravant. Cette dysfonction autonome cardio-vasculaire pourrait contribuer à l'augmentation du risque de maladie cardio-vasculaire et de mort subite du sujet obèse. L'étude de la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle pourraient être des indices du fonctionnement de ce système de régulation par ailleurs impliqué dans la physiopathologie de l'obésité.

## **DEUXIEME ETUDE CLINIQUE**

**Etude de la variabilité de la fréquence cardiaque  
et de la pression artérielle au cours d'une charge  
orale en glucose chez des sujets obèses  
normotendus**

## 1. Introduction

Nous avons montré dans l'étude précédente (394) que les indices de modulation sympathique pouvaient être altérés chez le sujet obèse hyperinsulinémique et normotendu, au repos mais surtout lors de la stimulation du SNS par l'orthostatisme. Nos résultats suggèrent que l'insulino-résistance pourrait jouer un rôle propre dans la diminution de la réactivité sympathique chez le sujet obèse, indépendamment des effets de la corpulence ou de l'âge. On sait en effet que l'hyperinsulinisme peut favoriser la désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (30;150;170;185;358).

Une diminution de l'effet activateur de l'insuline sur le système nerveux sympathique est une autre éventualité à envisager. Cette hypothèse fait l'objet de cette deuxième étude dans laquelle nous avons analysé l'évolution des paramètres de la variabilité de la FC et de la PA après l'ingestion d'une charge glucosée.

Notre objectif est d'évaluer la réponse du système cardio-vasculaire à l'hyperinsulinémie induite par l'augmentation post-prandiale de la glycémie et de dépister les sujets présentant un défaut de réactivité du SNS.

## 2. Sujets et méthodes

### 2.1. Recrutement des sujets

Soixante-dix patients ayant un surpoids ou une obésité, et 23 sujets témoins ont été recrutés. Leur consentement a été recueilli par écrit. Sept sujets ont préalablement été exclus en raison d'extrasystoles supraventriculaires ou en raison d'enregistrements non stationnaires.

Le groupe surpoids et obésité comportait 22 hommes et 48 femmes. Les sujets en surpoids (IMC : 25 - 30 kg/m<sup>2</sup>) ou obèses (IMC > 40 kg/m<sup>2</sup>) ont été réparti en 3 groupes: 1) un groupe surpoids (IMC : 25 - 29,9 kg/m<sup>2</sup>) n = 23 ; un groupe d'obésité modérée (IMC : 30 - 39,9 kg/m<sup>2</sup>) n= 24, un groupe d'obésité morbide (IMC  $\geq$  40 kg/m<sup>2</sup>, n= 23).

Les sujets ont été recrutés à l'occasion d'un programme de prise en charge de l'obésité. Leur poids devait être stable au cours du mois précédent l'inclusion (variation inférieure à 1 %). La pression artérielle systolique devait être inférieure à 140 mmHg et la pression artérielle diastolique inférieure à 80 mmHg. Les sujets devaient être

sédentaires (aucune activité physique sportive ou de loisir régulière et travail non physique).

Le groupe témoin comportait 23 sujets sédentaires (6 hommes et 14 femmes) en bonne santé. Aucun des sujets n'avait d'hypertension artérielle ou de traitement antihypertenseur. Le dosage de la glycémie ou l'hyperglycémie provoquée par voie orale a permis d'exclure un diabète. La fonction thyroïdienne était normale. Aucun sujet ne recevait de traitement et tous étaient actifs mais sédentaires. Les fumeurs étaient exclus

Les sujets ne devaient consommer ni alcool, ni café pendant les 12 heures précédant l'enregistrement. Les sujets ont signé un consentement éclairé avant l'inclusion.

Les sujets devaient être à jeun, et ne devaient pas avoir consommé d'alcool ou de café dans les 12 heures qui précédaient l'étude.

## **2.2. Méthodes**

### **5.1.1. Méthode d'enregistrement**

La méthode d'enregistrement est identique à la première étude. Cependant l'analyse des fréquences a été faite conformément aux recommandations du Comité Européen et Américain sur la méthode d'analyse, l'interprétation et l'utilisation clinique de la variabilité de la fréquence cardiaque (500).

Les bornes des bandes de fréquences analysées qui étaient donc différentes de la première étude étaient les suivantes :

- Basses fréquences (BF) (very low frequencies des anglo-saxons) : < 0,040 Hz.
- Moyennes fréquences (MF) (low frequencies des anglo-saxons) : de 0,040 Hz à 0,150 Hz.
- Hautes fréquences (HF) (high frequencies des anglo-saxons) : de 0,150 Hz à 0,400 Hz.



### 5.1.2. Analyse statistique

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type. Nous avons utilisé les logiciels Statview version 5.0 (SAS institute, Cary, NC) et BMDP statistical software (Berkeley, CA, University of California press, 1992) pour l'analyse statistique. La normalité des variables a été vérifiée en calculant les coefficients d'asymétrie et d'aplatissement (Skewness et Kurtosis).

Une analyse de la variance a été utilisée pour comparer les moyennes de plusieurs groupes. Un test *a posteriori* (test de Student Newman Kells) a permis d'analyser les différences inter-groupes. Les relations entre les paramètres ont été étudiées à l'aide de régressions linéaires et le cas échéant de régressions multiples. Le seuil de probabilité de 0,05 a été pris comme limite de signification. Les valeurs ont été rapportées en moyennes  $\pm$  SD. Un  $p < 0,05$  était pris comme seuil de signification pour l'ANOVA et  $p < 0,01$  pour les comparaisons entre les sujets en surcharge pondérale ou obèses et les sujets témoins (Test de Student-Newman-Keuls).

### 5.1.3. Protocole d'étude

#### Les 3 positions :

Des séquences de 256 points d'enregistrement ont été analysées dans les 3 positions précédemment décrites: décubitus respiration libre (DRL), décubitus respiration imposée (DRI) et en orthostatisme respiration libre (ORL).

#### La charge glucosée :

Après 10 minutes de repos, les sujets absorbaient 75 g de glucose. L'enregistrement de la FC et de la PA était mis en place immédiatement après l'ingestion.

Différentes séquences de 256 points ont été analysées après le test de charge: à 10, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, et 120 minutes. Des séquences de 1024 points ont été analysées entre la 30<sup>ème</sup> et la 60<sup>ème</sup> minute pour évaluer de façon plus précise les basses fréquences.

Nous avons utilisé comme principal indice, la valeur maximale des valeurs obtenues au cours de la charge et les aires sous la courbe. L'aire sous la courbe a été calculée selon la méthode des trapèzes (259).

Des tests ont été effectués préalablement pour éliminer toute modification de la variabilité de la FC et de la PA après l'ingestion d'eau.

## 6. Résultats

### 6.1. Description des sujets

L'âge, le sex-ratio, la fréquence cardiaque et la pression artérielle de repos n'étaient pas différents dans les trois groupes de sujets obèses et chez les sujets témoins (Tableau 1). Nous n'avons pas trouvé de différence liée au sexe pour les paramètres de variabilité de la FC et de PA. La distribution de l'âge et de l'IMC n'étaient pas différente dans les deux sexes, les données ont donc été rassemblées.

**Tableau 1** : Description des sujets

	Témoins	Surpoids	Sujets obèses		P (ANOVA)
Classes d'IMC	18,5-24,9 (n=23)	25-29,9 (n=23)	30-39,9 (n=24)	≥ 40 (n=23)	
Age (ans)	31,8 ± 9,5	38,3 ± 8,7	37,9 ± 13,6	35,3 ± 1,0	NS
Sexe ratio	18/5	18/5	17/7	15/8	NS
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22,5 ± 2,3	28,2 ± 1,7*	35,7 ± 2,5*	48,4 ± 8,2*	<0,001
Glycémie (g/l)	0,90 ± 0,12	0,88 ± 0,012	0,96 ± 0,10	1,02 ± 0,15	0,004
Insuline (mU/ml)	6,0 ± 2,6	9,4 ± 4,9	17,2 ± 9,8	41,5 ± 31,1	<0,0001
PAS (mmHg)	108,7 ± 16,4	112,4 ± 24,0	114,1 ± 13,0	112,2 ± 15,0	NS
PAD (mmHg)	59,0 ± 9,0	63,6 ± 13,9	59,9 ± 8,9	59,4 ± 7,8	NS
FC (bpm)	64,3 ± 10,5	67,0 ± 9,5	68,1 ± 9,8	70,0 ± 11,0	NS

IMC signifie indice de masse corporelle ; HOMA, homeostatic model assessment; PAS, pression artérielle systolique ; PAD, pression artérielle diastolique ; FC, fréquence cardiaque.

### 6.2. Variations des MF, des HF et du ratio MF/HF au repos et en orthostatisme

- Au repos, en décubitus (DRL)

Les puissances spectrales totales de la FC et de la PA n'étaient pas différentes dans les quatre groupes.

Les MF (u.n.) de la PAS et de la PAD étaient plus basses dans les deux groupes de sujets obèses que dans la groupe témoin (symbole \* dans le tableau 2).

Les HF en unités normalisées comme les puissances spectrales des HF, augmentaient graduellement dans les quatre groupes pour la PAS et la PAD. En revanche, les HF de la FC n'étaient pas différentes dans les quatre groupes. Les ratios MF/HF de la PAS et PAD, étaient également diminués dans les deux groupes d'obésité modérée et morbide.

- En orthostatisme (ORL)

*Les valeurs des MF de la FC* étaient augmentées de façon significative par rapport à la position de repos (symbole  $\neq$  dans le tableau 2), dans les quatre groupes ( $p < 0,05$ ) mais cette augmentation (delta) était plus faible dans le groupe d'obésité morbide ( $p < 0,01$ ). Les MF de la PA étaient augmentées de façon significative uniquement dans le groupe d'obésité modérée pour la PAD ( $p < 0,05$ ) et dans les deux groupes d'obésité pour la PAS. Cette augmentation (delta) n'était cependant pas statistiquement différente dans les 4 groupes.

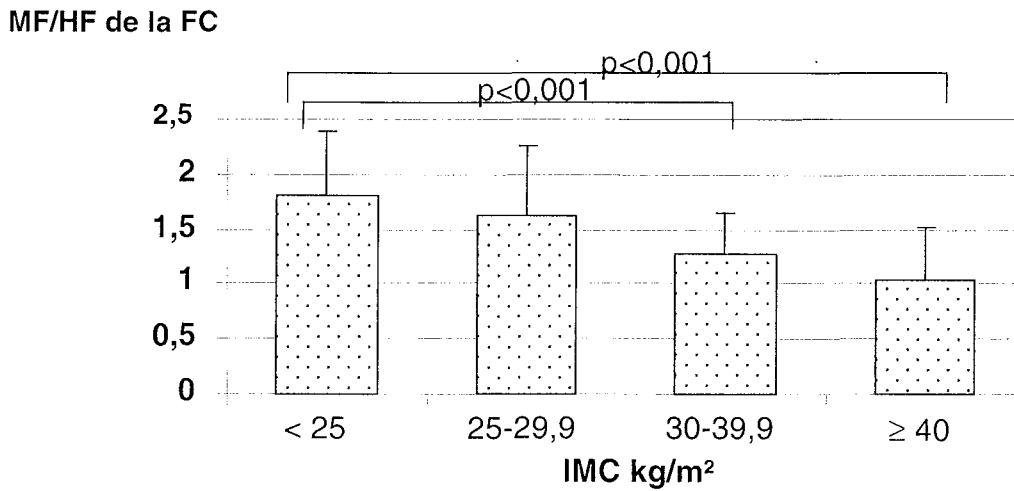
*Les MF (u.n.) de la FC, et de la PAS (u.n.)* étaient plus basses dans les deux groupes de sujets obèses que chez les sujets témoins (symbole \* dans le tableau 2) alors que les valeurs MF de la PAD (u.n.) n'étaient pas différentes. Les puissances spectrales des HF n'étaient pas différentes dans les quatre groupes dans cette position, alors que les HF en u.n. de la FC augmentaient graduellement avec l'IMC. Les ratios MF/HF de la FC (Figure 1, Tableau 2) étaient significativement abaissés dans les deux groupes de sujets obèses. Les puissances totales n'étaient pas différentes.

**Tableau 2 :** Variabilité de la FC et de la PA en décubitus respiration libre (DRL) et en orthostatisme respiration libre (ORL). Les puissances spectrales totales sont exprimées en mmHg/ $\sqrt{\text{Hz}}$ , pour la PA et en bpm/ $\sqrt{\text{Hz}}$ , pour la FC.

	Témoins	Surpoids	Sujets obèses		p (ANOVA)
Classes d'IMC (kg/m <sup>2</sup> )	18,5-24,9 (n=23)	25-29,9 (n=23)	30-39,9 (n=24)	≥ 40 (n=23)	
<b><u>DRL</u></b>					
<b>PS Tot (0-0,500 Hz)</b>					
PAS	137,5 ± 20,0	143,0 ± 24,7	150,3 ± 19,2	145,1 ± 18,1	NS
PAD	77,7 ± 10,4	81,7 ± 13,4	81,7 ± 19,9	78,3 ± 10,6	NS
FC	91,0 ± 19,7	95,0 ± 14,4	96,7 ± 20,8	97,5 ± 24,0	NS
<b>MF u.n.</b>					
PAS	62,4 ± 9,1	62,1 ± 8,4	59,8 ± 8,8	53,8 ± 9,9*	0,006
PAD	63,9 ± 8,4	65,1 ± 7,7	60,9 ± 7,6	56,6 ± 9,9*	0,004
FC	47,9 ± 11,1	49,2 ± 9,1	46,3 ± 9,5	43,8 ± 9,4	NS
<b>HF u.n.</b>					
PAS	0,38 ± 0,09	0,39 ± 0,09	0,40 ± 0,08	0,45 ± 0,11	0,035
PAD	0,36 ± 0,08	0,36 ± 0,08	0,38 ± 0,07	0,43 ± 0,11	0,036
FC	0,51 ± 0,10	0,52 ± 0,08	0,53 ± 0,10	0,55 ± 0,11	NS
<b>MF/HF</b>					
PAS	1,79 ± 0,62	1,71 ± 0,60	1,59 ± 0,54	1,28 ± 0,54*	0,020
PAD	1,09 ± 0,64	2,02 ± 0,74	1,64 ± 0,48	1,42 ± 0,54*	0,006
FC	1,02 ± 0,48	1,04 ± 0,44	0,92 ± 0,33	0,83 ± 0,32	NS
<b><u>ORL</u></b>					
<b>PS Totale</b>					
PAS	154,1 ± 26,9	164,2 ± 32,6	169,3 ± 22,0	165,0 ± 17,4	NS
PAD	96,7 ± 20,6	102,2 ± 16,3	99,2 ± 11,2	94,6 ± 16,1	NS
FC	112,1 ± 20,3	114,0 ± 19,6	113,1 ± 23,7	112,3 ± 21,0	NS
<b>MF u.n.</b>					
PAS	64,1 ± 7,8	62,0 ± 7,9	63,8 ± 4,3¥	57,8 ± 11,2*	0,040
PAD	69,8 ± 7,6	67,0 ± 7,6	67,0 ± 5,4¥	64,1 ± 9,0¥	0,11
FC	63,2 ± 7,3¥	59,2 ± 10,7¥	54,7 ± 8,6¥*	48,5 ± 10,9¥*	<0,001
<b>HF u.n.</b>					
PAS	0,39 ± 0,10	0,38 ± 0,08	0,36 ± 0,04	0,42 ± 0,12	NS
PAD	0,33 ± 0,09	0,32 ± 0,08	0,33 ± 0,06	0,36 ± 0,10	NS
FC	0,41 ± 0,11	0,43 ± 0,12	0,45 ± 0,09	0,50 ± 0,11	0,041
<b>MF/HF</b>					
PAS	1,9 ± 0,64	1,74 ± 0,58	1,80 ± 0,33	1,55 ± 0,71¥	NS
PAD	2,53 ± 0,98	2,47 ± 1,50¥	2,11 ± 0,50¥	1,96 ± 0,71¥	0,18
FC	1,82 ± 0,57¥	1,61 ± 0,65¥	1,28 ± 0,38¥*	1,04 ± 0,47¥*	<0,001

IMC signifie indice de masse corporelle ; DRL, décubitus respiration libre ; ORL, orthostatisme respiration libre ; PAS, pression artérielle systolique ; PAD, pression artérielle diastolique ; FC, fréquence cardiaque. MF, moyennes fréquences ; HF, hautes fréquences ; PS Totale : puissance spectrale totale. U.n. : unités normalisées. ¥ : pour la comparaison entre les positions ORL et DRL. \* pour la comparaison avec le groupe témoin (Test de Student-Newman-Keuls).

**Figure 1:** Moyennes des ratios MF/HF de la FC en position debout (n=93)

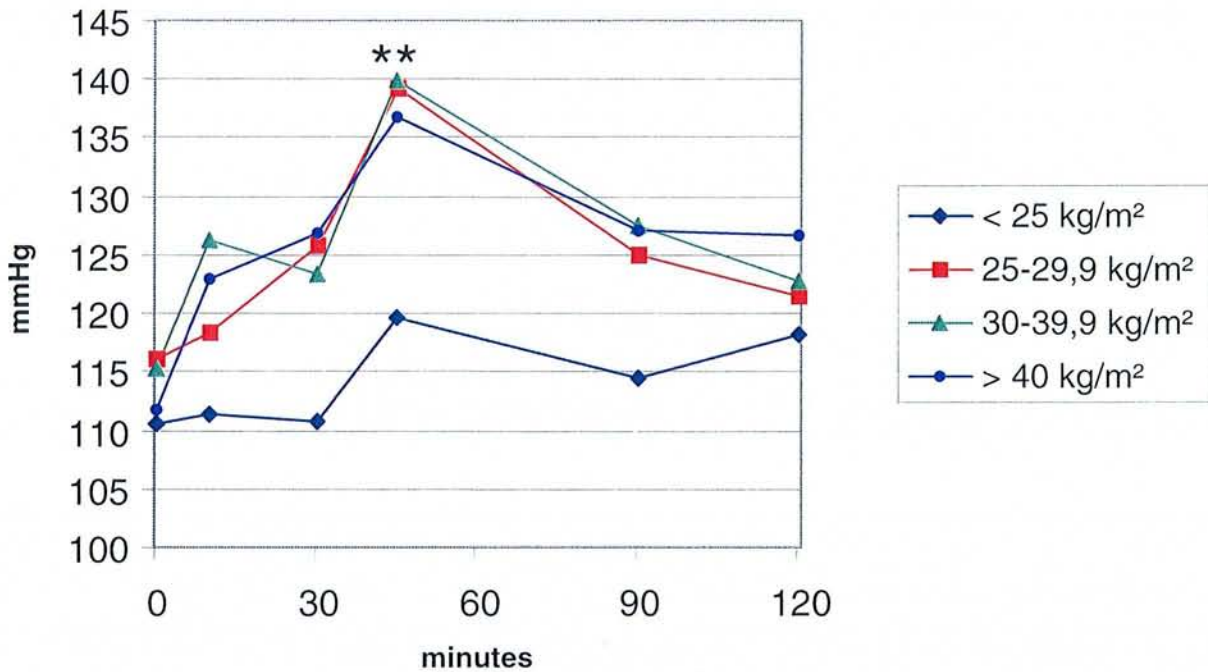


### **6.3. Variations de la FC et de la PA après la charge glucosée**

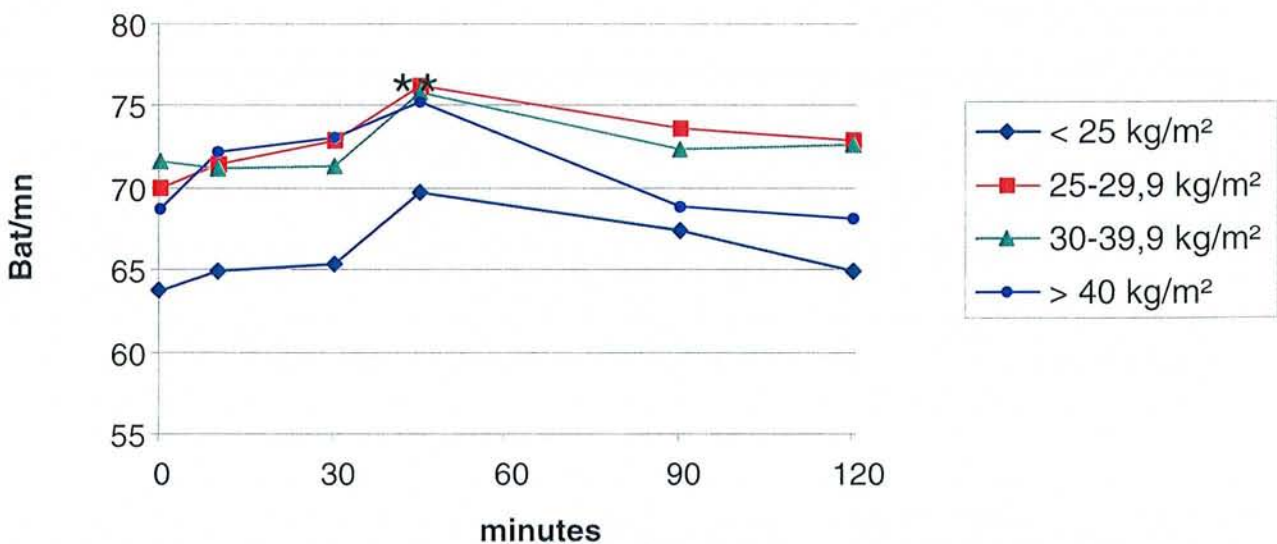
Après la charge en glucose, la PA s'élevait de façon significative dans les trois groupes de sujets, en surpoids ou obèses mais ( $p < 0,01$ ) pas chez les témoins (figure 2). La FC augmentait de façon plus importante dans ces trois groupes que chez les témoins ( $p < 0,05$ ) (figure 3).

L'âge était associé à une augmentation significative mais modeste de la PA ( $r = 0,29$  ;  $p = 0,050$ ).

**Figure 2 :** Evolution de la pression artérielle systolique (mmHg) après la charge en glucose. Analyse de variance par mesures répétées effectuée sur la partie ascendante de la courbe  $p < 0,01$



**Figure 3 :** Evolution de la fréquence cardiaque après la charge en glucose. Analyse de variance par mesures répétées effectuée sur la partie ascendante de la courbe  $p < 0,01$



## 6.4. Variations des MF et du ratio MF/HF après la charge glucosée

### 1) Les moyennes fréquences (Tableau 3, Figure 4)

- Les MF de la FC et de la PA (u.n. et  $\sqrt{\text{Hz}}$ ) augmentaient significativement dans les 4 groupes ( $p < 0,0001$ ).
- Les aires sous la courbe entre 0 et 120 minutes (ASC 0-120) des MF  
L'ASC des MF de la FC et de la PA, en valeur absolue ou relative, étaient plus élevées dans le groupe d'obésité modérée (30-39,9 kg/m<sup>2</sup>) que dans le groupe témoin ou d'obésité morbide ( $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>). Les valeurs dans ce groupe n'étaient pas différentes des témoins (figure 5).  
Comme la valeur de base peut influencer l'aire sous la courbe, nous l'avons calculée en considérant uniquement l'augmentation au-dessus de la ligne de base. Les différences constatées étaient identiques.
- Les valeurs maximales des MF (u.n. et  $\sqrt{\text{Hz}}$ ) de la FC et de la PA étaient également plus élevées dans le groupe de sujets d'obésité modérée (30-39,9 kg/m<sup>2</sup>) alors que ces valeurs n'étaient pas différentes des témoins pour le groupe d'obèses morbides.

### 2) Le rapport MF/HF

- Le rapport MF/HF de la FC et de la PA (u.n. et  $\sqrt{\text{Hz}}$ ) augmentaient significativement dans les 4 groupes ( $p < 0,0001$ ).
- Les aires sous la courbe entre 0 et 120 minutes (ASC 0-120) du ratio MF/HF  
Par comparaison avec le groupe témoin, le ratio MF/HF de la PAS et de la PAD (Tableau 3) était en moyenne plus basse dans le groupe d'obésité modérée (30-39,9 kg/m<sup>2</sup>) et dans le groupe de sujets obèses morbides IMC  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>. Les aires sous la courbe du ratio MF/HF de la FC étaient diminuées dans le groupe d'obésité morbide, mais à la limite de la signification ( $p = 0,06$ ).
- Si on considère la valeur maximale du ratio MF/HF de la FC et de la PA (Figure 6), en moyenne, cette valeur était moins élevée dans les deux groupes de sujets obèses que dans le groupe témoin.

### 3) L'augmentation des MF rapportée à l'insulinémie

L'augmentation des MF pour un delta d'insulinémie a été évaluée en rapportant l'aire sous la courbe des MF sur l'aire sous la courbe d'insulinémie. En regard du niveau élevé d'insulinémie, l'augmentation des MF était moins importante dans les deux groupes de sujets obèses ( $p < 0,05$ ) (figure 5).

**Tableau 3** : Aire sous la courbe de la charge en glucose (ASC 0-120 min) de la FC (bpm.min  $\sqrt{\text{Hz}}$ ) et de la PA (mmHg.min  $\sqrt{\text{Hz}}$ ) des paramètres du spectre.

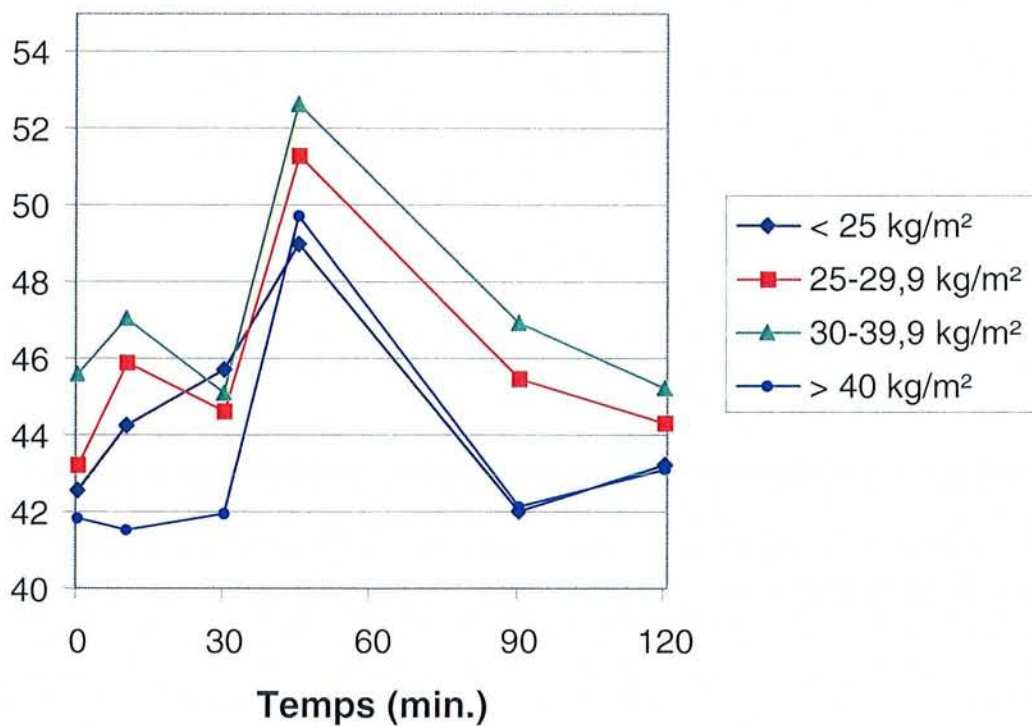
		Témoins	Surpoids	Sujets obèses		p (ANOVA)
Classes d'IMC (kg/m <sup>2</sup> )		18,5-24,9 (n=8)	25-29,9 (n=15)	30-39,9 (n=11)	≥ 40 (n=11)	
ASC ins (mU.min/ml)		1904 ± 1118	5711 ± 2144	11743 ± 7762	13904 ± 5665	<0,001
ASC Total	PAS	3507 ± 883	3818 ± 888	5385 ± 1178**	3858 ± 895##	<0,001
	PAD	2108 ± 528	2301 ± 493	2985 ± 674*	2271 ± 671#	0,009
	FC	3132 ± 1202	2962 ± 945	4187 ± 1501	3431 ± 1851	NS
ASC MF	PAS	1134 ± 269	1446 ± 416	2033 ± 624**	1359 ± 428##	0,018
	PAD	792 ± 189	986 ± 282	1202 ± 331**	870 ± 300##	>0,001
	FC	969 ± 362	102 ± 405	1558 ± 541*	1138 ± 670#	0,049
ASC MF u.n.	PAS	3631 ± 507	4320 ± 760*	4443 ± 606*	3821 ± 762#	0,005
	PAD	4267 ± 839	4909 ± 784	4807 ± 555*	4179 ± 784#	0,004
	FC	3412 ± 786	3931 ± 558	4437 ± 595**	3574 ± 779##	<0,001
ASC MF/HF	PAS	316 ± 263	200 ± 98*	190 ± 58*	142 ± 43**	0,044
	PAD	299 ± 141	241 ± 97	203 ± 49*	165 ± 45**	0,015
	FC	157 ± 77	129 ± 53	150 ± 4	106 ± 42	NS

IMC signifie indice de masse corporelle ; PAS, pression artérielle systolique ; PAD, pression artérielle diastolique ; FC, fréquence cardiaque. MF, moyennes fréquences ; HF, hautes fréquences ; PS Totale: puissance spectrale totale. u.n. : unités normalisées. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  pour les comparaisons avec le groupe témoin, #  $p < 0,05$  ##  $p < 0,01$  pour les comparaisons avec le groupe de sujets obèses (30-39,9 kg/m<sup>2</sup>).

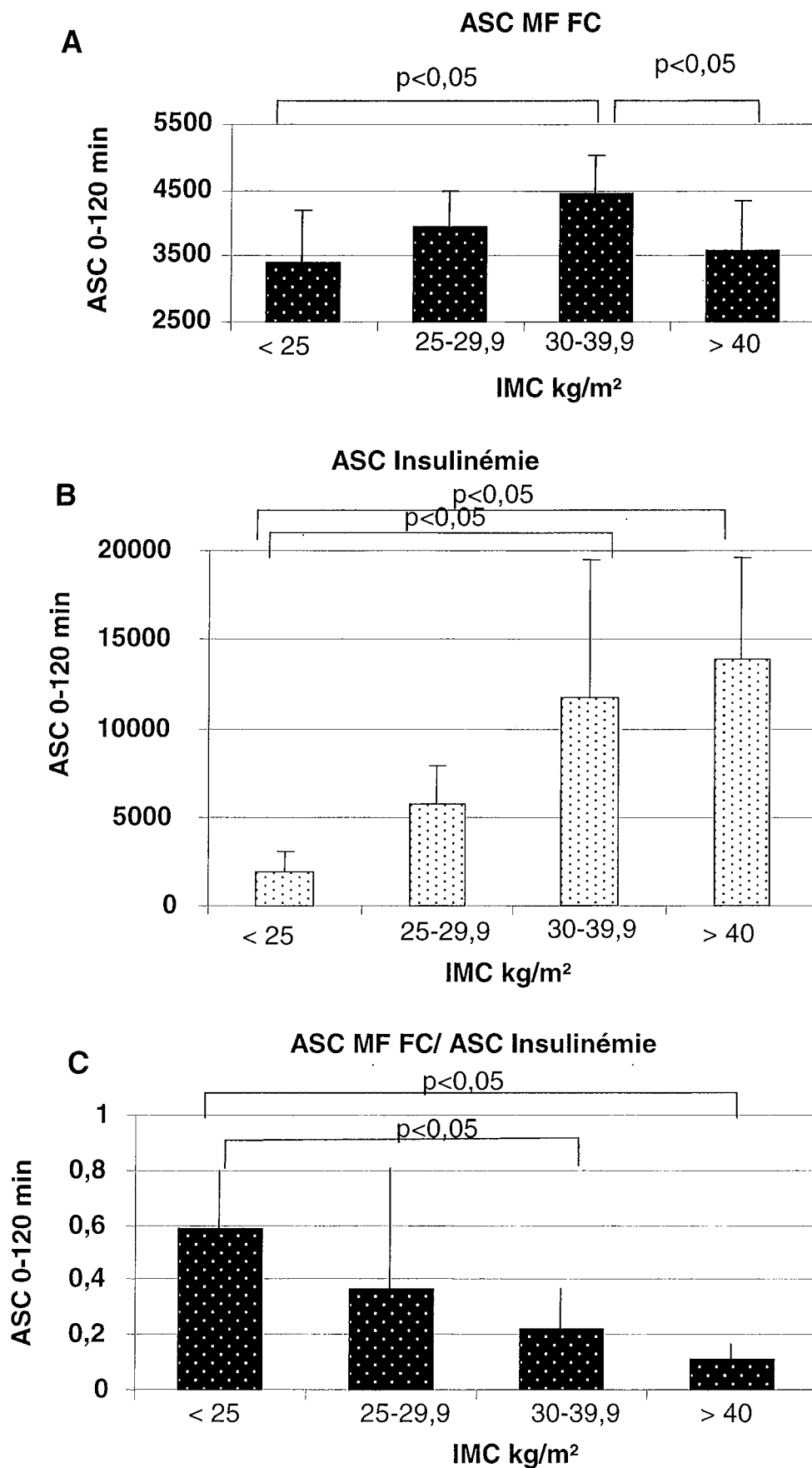


**Figure 4 :** Evolution de la moyenne des MF (u.a.) de la FC après la charge glucosée. Les écart-types n'ont pas été reportés pour la lisibilité de la figure.

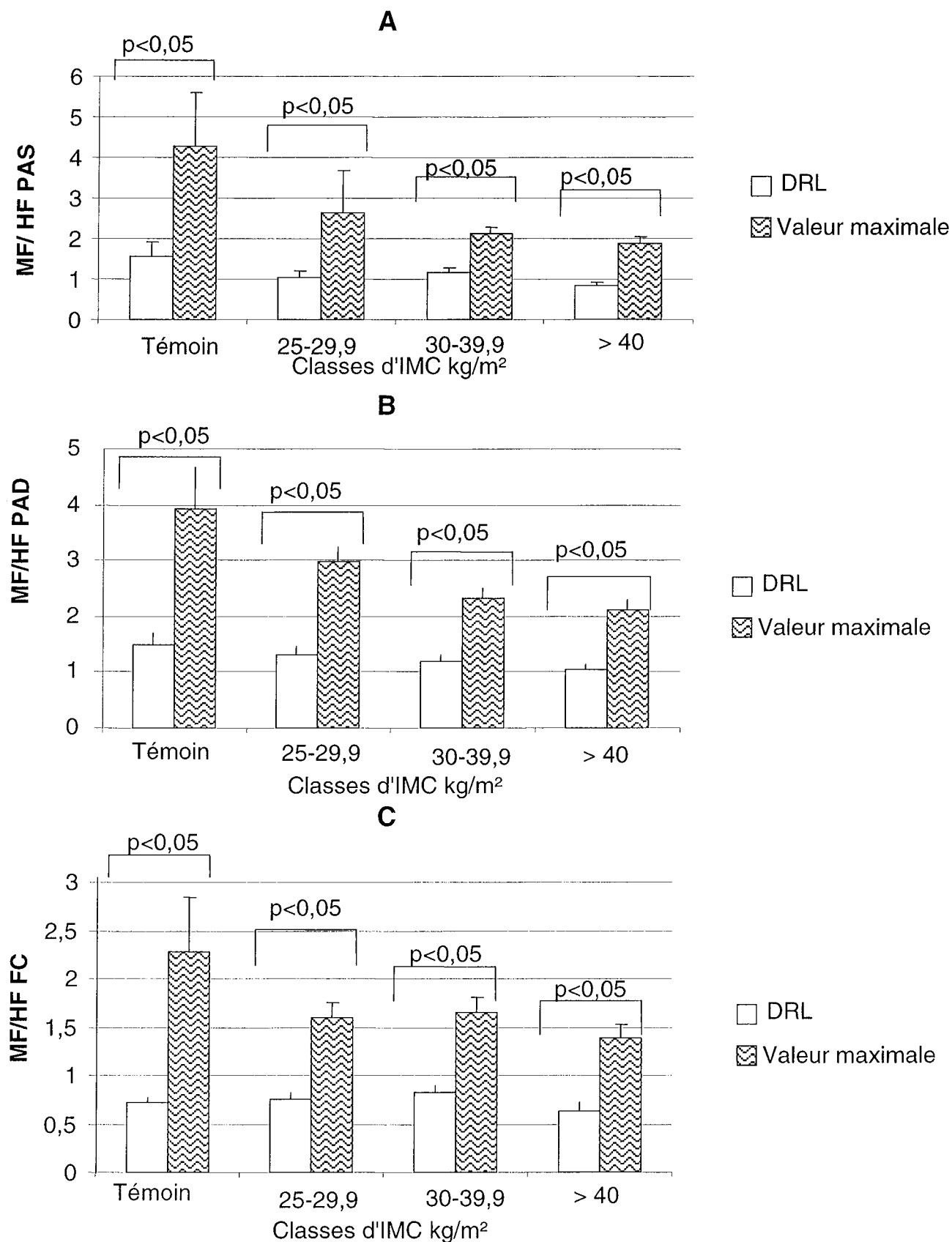
Moyennes fréquences (u.n.)



**Figure 5** : Comparaison des aires sous la courbe (ASC) des MF de la FC (bpm.min/ $\sqrt{\text{Hz}}$ ) (A), de l'ASC de l'insulinémie (insuline mU.min/ml) (B) et du rapport ASC MF/ASC insulinémie (MF/mU d'insuline/ml) (C).



**Figure 6 :** Valeurs du ratio MF/HF de la PAS (A), de la PAD (B), et de la FC (C), au repos et valeurs maximales après la charge glucosée. Les résultats sont exprimées en moyennes  $\pm$  écart type. Les valeurs sont significativement différentes dans les quatre groupes (ANOVA \* $p < 0,05$ ). Test de Student-Newman-Keuls, #  $p < 0,05$ .



### 6.5. Valeurs des Hautes Fréquences en respiration imposée et au cours de la charge glucosée.

En DRI, les HF de la PAS (puissance et u.n.) étaient augmentées chez les sujets obèses. En unité normalisées, les HF des trois paramètres étaient augmentées dans le groupe d'obèses morbides. L'âge était associé à une diminution des HF de la FC et de la PAD, indépendamment de l'IMC (Tableau 5).

Après la charge glucosée, les HF de la FC et de la PA augmentaient de façon significative dans les quatre groupes ( $p < 0,0001$ ). L'aire sous la courbe des HF en unité absolue ou en valeurs relatives de la FC et de la PA étaient significativement plus élevées dans le groupe d'obésité modérée (30-39,9 kg/m<sup>2</sup>) et dans le groupe d'obésité morbide (IMC  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>).

**Tableau 4** : Valeurs des HF de la FC et de la PA en DRI et ASC après la charge en glucose (bpm.min  $\sqrt{\text{Hz}}$  et mmHg.min  $\sqrt{\text{Hz}}$ )

	Témoins	Surpoids	Sujets obèses		p (ANOVA)
Classes d'IMC (kg/m <sup>2</sup> )	18,5-24,9	25-29,9	30-39,9	$\geq 40$	
<b>HF DRI</b>					
PAS (mmHg/ $\sqrt{\text{Hz}}$ )	6,5 $\pm$ 3,3	8,3 $\pm$ 3,2	10,5 $\pm$ 5,7*	10,0 $\pm$ 4,2	0,017
PAD (mmHg/ $\sqrt{\text{Hz}}$ )	4,3 $\pm$ 2,3	4,9 $\pm$ 1,9	6,0 $\pm$ 4,0	6,1 $\pm$ 2,5	NS
FC (bpm/ $\sqrt{\text{Hz}}$ )	11,9 $\pm$ 8,5	12,7 $\pm$ 8,4	13,9 $\pm$ 11,0	12,8 $\pm$ 9,1	NS
<b>HF DRI (u.n.)</b>					
PAS	40,3 $\pm$ 11,8	43,0 $\pm$ 10,2	44,2 $\pm$ 7,1	49,2 $\pm$ 10,1*	0,031
PAD	40,6 $\pm$ 10,6	42,1 $\pm$ 9,0	46,4 $\pm$ 8,2	51,9 $\pm$ 10,6*	<0,001
FC	56,8 $\pm$ 9,2	56,2 $\pm$ 9,4	58,7 $\pm$ 10,1	63,6 $\pm$ 9,2*	0,039
<b>ASC HF</b>					
PAS	597 $\pm$ 294	929 $\pm$ 280*	1328 $\pm$ 406**	1101 $\pm$ 339**	<0,001
PAD	393 $\pm$ 232	523 $\pm$ 159	758 $\pm$ 267**	635 $\pm$ 267*	0,011
FC	894 $\pm$ 631	993 $\pm$ 361	1373 $\pm$ 635	1271 $\pm$ 761	NS

IMC signifie indice de masse corporelle ; PAS, pression artérielle systolique; PAD, pression artérielle diastolique ; FC, fréquence cardiaque. HF, hautes fréquences ; u.n. : unités normalisées. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  pour les comparaisons avec le groupe témoin.

**Tableau 5** : Coefficients de corrélation partielle entre les HF (u.n.) en décubitus respiration imposée (DRI), l'IMC (kg/m<sup>2</sup>) et l'âge dans toute la population (n=85)

	DRI	
	r	p
<b>HF PAS (u.n.)</b>		
IMC	0,310	0,003
Age	-0,172	NS
<b>HF PAD (u.n.)</b>		
IMC	0,413	<0,0001
Age	-0,187	0,056
<b>HF FC (u.n.)</b>		
IMC	0,268	0,008
Age	-0,307	0,003

### 6.6. Basses fréquences (BF)

En DRL, les valeurs des BF de la FC et de la PA n'étaient pas statistiquement différentes dans les quatre groupes. En ORL, les BF de la FC augmentaient de façon significative par rapport aux valeurs obtenues en DRL ( $p < 0,05$ ). Ces valeurs n'étaient pas statistiquement différentes dans les quatre groupes.

Les BF de la FC et de la PA augmentaient de façon significative après la charge glucosée, dans les quatre groupes. Les valeurs maximales étaient significativement différentes uniquement pour la PAS (les valeurs en mmHg/ $\sqrt{\text{Hz}}$  sont de :  $25,8 \pm 7,9$  pour les témoins;  $39,2 \pm 12,1$  pour le groupe surpoids;  $39,0 \pm 12,6$  pour le groupe 30-40 kg/m<sup>2</sup> et  $31,8 \pm 8,5$  pour le groupe d'obésité morbide;  $p = 0,033$ ).

L'ASC des BF de la FC et de la PA étaient significativement plus élevées dans le groupe d'obésité modérée (30-39,9 kg/m<sup>2</sup>). La valeur maximale de BF évaluée sur 1024 points entre la 30<sup>ème</sup> et la 60<sup>ème</sup> minute n'était pas différente de la valeur maximale évaluée sur 256 points. Les deux méthodes étaient bien corrélées ( $r > 0,80$ ).

## **6.7. Analyse spectrale croisée**

L'analyse spectrale croisée a été effectuée dans la zone des moyennes fréquences (entre 0,090 et 0,110 Hz) dans les trois positions et au cours de la charge en glucose (HGPO).

- **La cohérence ( $K^2$ )**

Au repos, la cohérence ( $K^2$ ) était en moyenne de  $0,52 \pm 0,19$ . En position debout, la cohérence était en moyenne significativement plus élevée ( $0,61 \pm 0,22$ ) ( $p=0,0178$ ). Le couplage entre les moyennes fréquences de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque est donc meilleur en orthostatisme.

Pendant la charge en glucose, on observe une augmentation significative de la cohérence, notamment au cours de la première heure: à  $t=10\text{mn}$ ,  $K^2 = 0,58 \pm 0,21$ ; entre 30 et 60 min  $K^2 = 0,63 \pm 0,19$ .

$K^2$  était supérieur à 0,5 chez 34/45 sujets (75%) au repos, chez 37/45 (82%) en ORL et chez 38/45 (84%) après la charge en glucose.

- **Le gain baroréflexe au repos et en orthostatisme et au cours de la charge en glucose**

En moyenne le gain était de  $0,76 \pm 0,07$  Bat/mmHg au repos, et n'était pas augmenté en orthostatisme ( $0,69 \pm 0,07$ ), alors qu'il augmente significativement après la charge en glucose ( $0,86 \pm 0,08$ ,  $p=0,013$ ).

### *Les effets de l'âge et de l'IMC*

Les effets de l'IMC et de l'âge ont été étudiés par des corrélations. Dans ces analyses, seuls les gains pour lesquels la cohérence était supérieure à 0,5 ont été pris en compte.

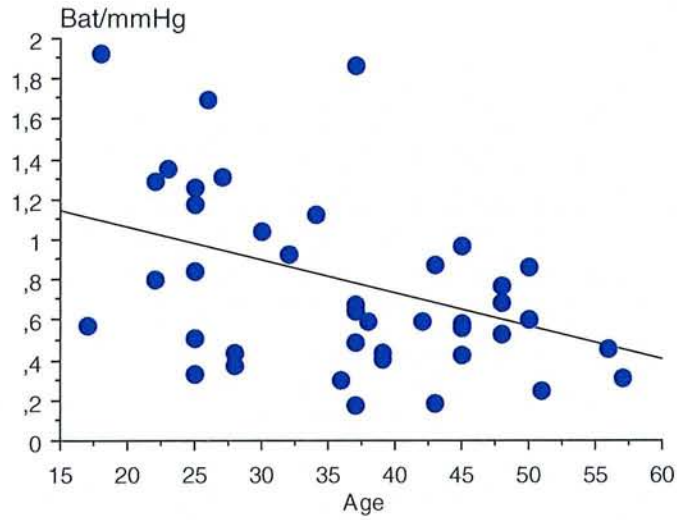
L'IMC n'avait pas d'effet indépendant sur le gain baroréflexe ou sur la cohérence.

L'âge était corrélé négativement au gain au repos (Figure 7) ( $r=-0,370$  ;  $p=0,016$ ), en orthostatisme ( $r=-0,51$  ;  $p=0,001$ ), et après la charge en glucose (Figure 8) (à  $t=10\text{mn}$ :  $r=-0,50$  ;  $p=0,007$ , et entre 30 et 60 min :  $r=-0,57$  ;  $p=0,001$ ).

### *Les effets de l'insulinémie*

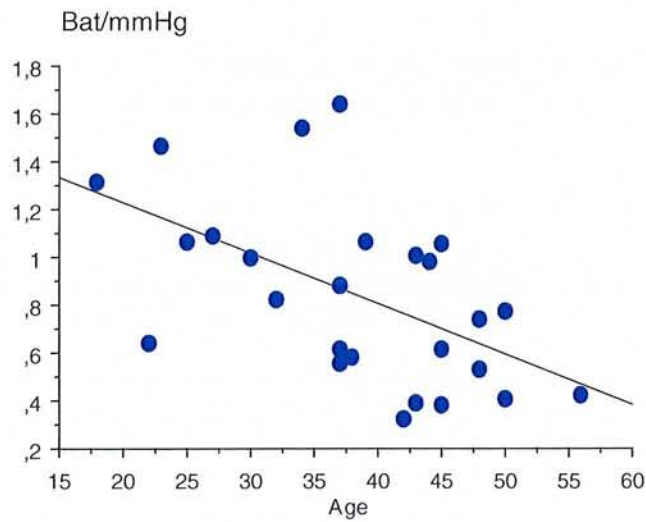
A jeun, l'insulinémie était corrélée négativement au gain au repos indépendamment de l'âge ( $r=-0,30;p=0,045$ ) mais non significativement au gain en orthostatisme ou au cours de l'HGPO. De même, l'ASC de l'insulinémie n'était pas corrélée aux valeurs du gain pendant le test de charge.

**Figure 7 :** Corrélation entre le gain baroréflexe au repos et l'âge.

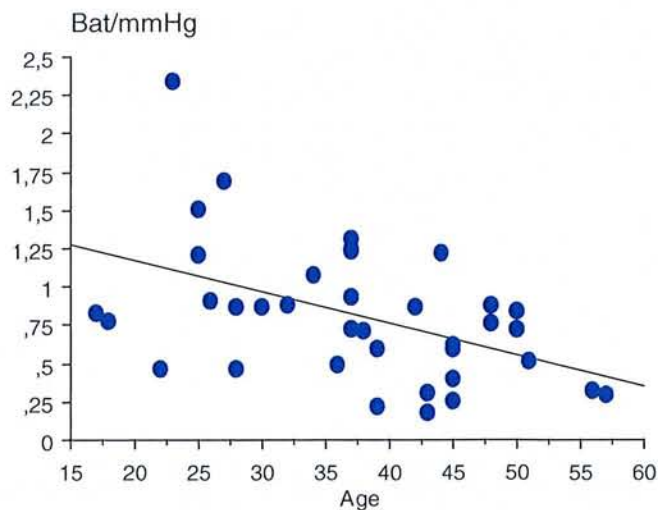


**Figure 8 :** Corrélation entre le gain baroréflexe mesuré au cours de l'HGPO et l'âge, à 60 minutes (A) et à 90 minutes (B).

**A : 60 min**



**B : 90 min**





## 6.8. Discussion

- **Principaux résultats**

Nous montrons dans cette étude qu'une charge en glucose et l'augmentation de l'insulinémie entraîne une augmentation significative des MF, des HF et du ratio MF/HF de la FC et de la PA, chez les sujets de poids normal, mais aussi chez les sujets en surpoids et chez les sujets obèses. Ces résultats montrent que dans l'obésité modérée ou sévère, des concentrations très élevées d'insuline permettent d'obtenir une stimulation du système nerveux sympathique. Néanmoins l'augmentation des MF rapportée à l'augmentation d'insulinémie est beaucoup moins importante chez les sujets obèses, surtout quand l'obésité est extrême (IMC > 40 kg/m<sup>2</sup>). Le système nerveux sympathique serait donc résistant à l'insuline. En l'occurrence, l'accroissement des modulations liées au SNS après l'ingestion de glucose, évaluée par l'aire sous la courbe des MF, est moins prononcée chez les sujets obèses morbides que dans l'obésité commune (IMC: 30-40 kg/m<sup>2</sup>) alors que l'insulinémie n'est pas différente du groupe d'obésité modérée. L'incapacité à augmenter d'avantage l'insulino-sécrétion peut expliquer la diminution des MF dans ce groupe. L'altération de la réponse du système nerveux sympathique à l'augmentation de l'insulinémie pourrait donc être l'un des éléments du syndrome d'insulino-résistance des sujets obèses normotendus.

De nombreuses études réalisées chez l'homme et chez l'animal ont montré que l'insuline active le SNS (12;44;314;538). L'insuline agit au niveau du noyau ventromédian de l'hypothalamus et indirectement sur les centres sympathiques du tronc cérébral (265;306;339;438). L'insuline a aussi un effet vasodilatateur sur le système vasculaire périphérique qui pourrait contribuer à l'activation du baroréflexe et à l'activation du SNS. Cet effet est altéré chez le sujet obèse (13;191). Une diminution de l'effet vasodilatateur de l'insuline pourrait donc expliquer la diminution des MF de la PAS chez les sujets obèses morbides.

Spraul *et al.* ont également montré grâce à la microneurographie que l'activité du SNS était augmentée, au repos chez des sujets d'origine caucasienne et chez des indiens Pimas obèses mais que la réactivité du SNS étaient altérées chez le sujet obèse après une charge en glucose malgré des insulinémies très élevées (484). Une altération de la réponse sympathique a également été décrite au cours d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique (538). Cependant l'épreuve de la charge en glucose nous semble plus physiologique. L'hypersécrétion d'insuline est un mécanisme compensateur qui

permet de contrer l'insulino-résistance du sujet. L'homéostasie glucidique peut être maintenue grâce à cette hypersécrétion. De la même façon, les sujets les plus insulino-résistants peuvent forcer l'insulino-résistance du SNS au prix d'une hypersécrétion insulinique (538). Les concentrations en insuline mesurée au cours de la charge glucidique dépassent généralement les concentrations en insuline mesurées au cours du clamps euglycémique. L'altération de la réponse du SNS après l'ingestion de glucose pourrait être liée à un défaut de stimulation du SNS par l'insuline mais également à une baisse de la sensibilité du système cardio-vasculaire aux catécholamines.

Paolisso *et al.* (368) a également montré que l'augmentation du rapport MF/HF était corrélée négativement à l'IMC dans un petit groupe de sujets présentant un surpoids.

L'augmentation des BF après une charge en glucose est également trouvée par Matsumoto *et al.* (315). Cependant dans notre étude, la valeur maximale des BF observées, analysées sur 1024 points, ou les aires sous la courbe des BF, étaient plus importantes dans le groupe d'obésité modérée alors que dans le groupe d'obésité morbide, l'augmentation n'était pas différente des témoins. L'interprétation de cette augmentation doit être prudente. Néanmoins cette bande de fréquence varie lors de l'exposition au froid, elles pourraient donc être rapportées à la thermorégulation (315;316). La bande de fréquences correspondante serait centrée sur 0,021 Hz (de 0,007 à 0,047 Hz) (315;316). Par conséquent, les sujets présentant une obésité modérée présenteraient par rapport au témoins, une augmentation de l'activité vasomotrice liée à la thermogenèse post-prandiale. Cette activité serait altérée chez les sujets présentant une obésité morbide (IMC > 40 kg/m<sup>2</sup>), ce qui pourrait contribuer à l'augmentation du poids. Lors d'une stimulation de la thermogenèse par des substances comme la capsaïcine, d'autres études (315;316) ont montré que les basses fréquences pourraient être altérées chez les sujets obèses indépendamment des effets de l'insuline.

Les HF n'étaient pas différentes dans les quatre groupes sauf les HF de la PAS qui étaient augmentées dans le groupe d'obésité modérée. Cependant les HF diminuent avec l'âge comme cela a déjà été décrit (156) (153).

- **L'analyse spectrale croisée** effectuée au repos et lors des tests de stimulation nous a permis d'évaluer la sensibilité du baroréflexe.

Les principaux résultats de cette analyse sont les suivants: 1) en orthostatisme et après la charge en glucose, la cohérence (K<sup>2</sup>) augmente de façon significative ; 2) le

gain baroréflexe n'est pas plus élevé en orthostatisme mais augmentait après la charge glucosée ; 3) l'âge était le principal facteur expliquant la diminution du gain baroréflexe, cependant, au repos, le gain baroréflexe est corrélé négativement à l'insulinémie ; 4) après la charge en glucose, la pression artérielle et la fréquence cardiaque augmentaient significativement chez les sujets en surpoids ou obèses mais pas chez les sujets témoins. En outre les sujets ayant une obésité morbide augmentaient également leur pression artérielle alors que la stimulation sympathique est moins importante chez ces patients et que les HF sont plus élevées.

L'adaptation tensionnelle serait donc défaillante ou retardée chez les sujets obèses. Bien que nous n'ayons pas mis en évidence de relation entre la gain baroréflexe mesuré après la charge en glucose et l'IMC, la gain baroréflexe au repos était diminué chez les sujets les plus insulino-résistants. Par conséquent, comme cela a été suggéré par Grassi *et al.* (176), et comme nous l'avons montré dans l'étude précédente, une altération du baroréflexe est probable chez ces patients. L'âge reste néanmoins un facteur confondant important. Une diminution de la sensibilité du baroréflexe pourrait expliquer cette augmentation tensionnelle.

Chez le sujet obèse insulino-résistant, l'effet vasodilatateur de l'insuline est également altéré (245;247;537), ce qui pourrait aussi favoriser l'augmentation tensionnelle. Comme le suggèrent les variations de moyennes fréquences, on peut supposer que l'hyperinsulinisme est responsable d'une hyper-stimulation du SNS. L'hypertonie sympathique joue un rôle prédominant dans le développement de l'hypertension artérielle du sujet obèse (212). Le mécanisme communément admis est la théorie dite de l'autorégulation (183). L'accentuation de la réponse vasoconstrictrice des vaisseaux sous l'influence du sympathique reste au centre de la physiopathologie de l'hypertension artérielle du sujet obèse. Les relations entre le système sympathique, la sensibilité baroréflexe et la réponse vasodilatatrice périphérique pourraient être perturbées dans l'obésité, même en l'absence d'hypertension artérielle.

- **En conclusion**

Cette étude montre que dans l'obésité commune, l'hyperinsulinisme qui suit une charge en glucose s'accompagne d'une augmentation de la réponse sympathique. Rapportée aux variations d'insulinémie, cette réactivité est altérée au cours de l'obésité, notamment dans l'obésité morbide. Chez ces patients, une dysfonction sympathique pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie de l'obésité.

# **TROISIEME ETUDE CLINIQUE**

**La relation entre le système nerveux  
sympathique et la leptine: effets de la restriction  
calorique et de l'amaigrissement**

## 1. Introduction

Comme l'ont montré plusieurs travaux chez l'animal, la leptine stimule le système nerveux sympathique (SNS). Cette hormone joue un rôle important dans la régulation de la balance énergétique par son effet sur la satiété mais également par son effet sur la thermogénèse (195). Elle a aussi un rôle régulateur sur le système cardio-vasculaire et une action vasopressive (104;197;465).

La relation entre la leptine et le SNS a été peu étudiée chez l'homme (370;554). Paolisso *et al.* (369) ont été les premiers à aborder cette question en utilisant l'analyse spectrale de la variabilité de la fréquence cardiaque. Ils ont rapporté qu'il existait une corrélation positive entre la leptinémie et la composante sympathique des modulations de la fréquence cardiaque, chez le sujet de poids normal. A notre connaissance cette relation n'a pas été étudiée au cours de l'obésité. Or une diminution de l'activité du SNS pourrait contribuer à la prise de poids ou à la résistance à l'amaigrissement (294). Le rôle de la leptine dans ce domaine n'a pas fait l'objet d'une attention particulière.

La leptinémie augmente avec la masse grasse et est donc généralement élevée chez le sujet obèse. Malgré cette forte concentration, cette hormone n'exerce donc pas l'effet escompté sur le contrôle pondéral (92). Cette absence d'effet est souvent interprétée comme un état de résistance à l'action de l'hormone. Le concept est néanmoins difficile à définir en pratique clinique. Le rapport de la leptinémie sur la masse grasse pourrait être un marqueur de cette « leptino-résistance » (490). Il est intéressant d'analyser dans cette perspective les effets de la leptine sur le SNS : sont-ils conservés, diminués ou abolis ? L'action stimulante de la leptine sur le SNS est préservée dans certains modèles animaux d'obésité (104;197), comme la souris Agouti (109). Cette souris synthétise en excès la protéine Agouti, antagoniste du récepteur de type 4 des mélanocortines (MC4R), empêchant ainsi la leptine d'exercer son rôle inhibiteur sur la sécrétion de neuropeptide Y (109). Par contre, l'action de la leptine sur le SNS et son action vasopressive sont conservées (396). La résistance à la leptine pourrait donc être sélective sur la régulation de la prise alimentaire et ne pas toucher l'action stimulante de la leptine sur le système sympathique et son action vasopressive. Différents mécanismes de résistance à la leptine ont été décrits chez l'animal (33;282;440;524). Mais ils restent hypothétiques chez l'homme. Néanmoins, la leptine a été impliquée dans la physiopathologie de l'hypertension du sujet obèse (188;195;202;312;371;464).

Les variations respectives de la leptinémie et des indices du SN autonome au cours d'une restriction calorique n'ont jamais été étudiées. Cette situation dynamique de

modification de la masse grasse est susceptible d'apporter des informations intéressante sur la boucle de régulation leptine-SNS. Nous avons eu l'opportunité d'envisager les effets d'un médicament de l'obésité, la sibutramine. Cette molécule qui inhibe la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, pourrait par conséquent modifier la variabilité de la fréquence cardiaque en raison de son effet stimulant sur le système sympathique (25;106). Les conséquences sur la relation leptine-SNS ne sont pas connues.

Les objectifs de ce travail sont donc 1) d'analyser la relation entre leptine et les paramètres de la variabilité de la fréquence cardiaque chez des sujets obèses en fonction de la composition corporelle en masse grasse, 2) d'étudier les effets de l'amaigrissement et de la sibutramine sur la variabilité de la fréquence cardiaque, 3) d'analyser les répercussions de l'amaigrissement sur la relation entre la leptine et les indices de la variabilité de la fréquence cardiaque reflétant le fonctionnement du système nerveux sympathique.

## **2. Sujets et méthodes**

### ***2.1. Sujets***

Quatre-vingt-quinze femmes ont été recrutées dans le service de Diabétologie-Maladies métaboliques et Nutrition du CHU de Nancy (Hôpital Jeanne d'Arc, Dommartin-les-Toul). L'étude a été réalisée au centre d'investigation clinique (CHU-INSERM, CHU de Nancy, Hôpital J.d'Arc, Dommartin-les-Toul). Elles étaient âgées de 18 à 65 ans et avaient un IMC compris entre 30 et 40 kg/m<sup>2</sup>. Leur poids était stable depuis 3 mois (perte de poids < 3kg).

Les principaux facteurs d'exclusion étaient : l'hypertension artérielle, les troubles graves du comportement alimentaire, l'obésité d'origine endocrine, le diabète, une tachycardie (plus de 100 battements/min), les anomalies à l'ECG, toute pathologie intercurrente et tout traitement pouvant interférer sur le système nerveux autonome (médicaments antihypertenseurs).

Les patientes étaient examinées, pesées et mesurées avec précision (respectivement 0,1 kg et 0,5 cm), de même que le tour de taille et de hanches: La pression artérielle était prise avec un sphingomanomètre à mercure dans des conditions standardisées. Un ECG était réalisé au repos.

## **2.2. Méthodes**

### **2.2.1. Principes de l'analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque sur 24 heures**

#### **2.2.1.1. Mesure de la fréquence cardiaque**

Le tracé électrocardiographique (ECG) est enregistré sur 24 heures par un système Holter à 2 canaux. Six timbres sont apposés sur le thorax du sujet et reliés par des fils à un boîtier d'enregistrement contenant une cassette audio, sur laquelle est enregistré le tracé ECG. Chaque tracé est ensuite analysé grâce au logiciel ELATEC (module VFC version 3.02) qui permet de distinguer les complexes QRS sinusaux des complexes extrasystoliques et des artéfacts, ces derniers étant éliminés pour l'analyse de la variabilité. Tous les paramètres de détection et de classification sont réglés et validés par l'utilisateur, pour permettre un traitement optimal adapté à chaque cas.

#### **2.2.1.2. Mesure de la variabilité de la fréquence cardiaque**

Nous avons utilisé deux approches pour mesurer la variabilité de la fréquence cardiaque.

- **Analyse temporelle**

A partir d'un enregistrement Holter ECG des 24 heures, on détermine la fréquence cardiaque à chaque instant et les intervalles entre les complexes QRS successifs normaux. Différents indices sont calculés.

- ✓ SDNN est l'écart type de tous les intervalles RR normaux (ou NN : Normal to Normal) sur la période globale de 24 heures. Ce paramètre estime la variabilité globale, sa valeur est exprimée en millisecondes. La variance totale de la variabilité augmente avec la durée de l'enregistrement. Il faut donc veiller à ne comparer que des SDNN obtenus à partir d'enregistrements de durée similaire.

✓ SDANN est l'écart-type de la moyenne des intervalles NN calculée sur 5 minutes. Cet indice estime les modifications de la fréquence cardiaque dues à des cycles de durée supérieure à 5 minutes. Il est exprimé en millisecondes

✓ pNN50 et le rMSSD correspondent à l'analyse par triplets qui prend en compte 3 complexes QRS et les 2 intervalles qu'ils définissent. Le pNN50 est le pourcentage de triplets pour lesquels il existe une différence de plus de 50 millisecondes entre les 2 RR individualisés. Le rMSSD est la racine carrée de la moyenne de la somme des carrés des différences entre les 2 RR individualisés. Il est exprimé en millisecondes.

Ces deux indices estiment les variations de la fréquence cardiaque de haute fréquence. Ces différents indices sont calculés sur la période nocturne et sur la période diurne.

- **Analyse spectrale**

Comme pour l'analyse à court terme (voir chapitre méthode page 56), on utilise la transformée de Fourier. L'analyse n'est pas faite sur la fréquence cardiaque mais sur la durée de l'intervalle RR. Les puissances spectrales sont exprimées en millisecondes au carré (ms<sup>2</sup>).

La définition et l'interprétation des bandes d'analyse est identique à celle de l'analyse à court terme (500).

- La bande HF (hautes fréquences) va de 0,150 à 0,400 Hz, est lié au système parasympathique, elle est donc influencée par les variations respiratoires.
- La bande MF (moyenne fréquences, MF ou Low Frequency) comprise entre 0,040 et 0,150 Hz correspond essentiellement aux modulation du sympathique mais les MF ont aussi une composante vagale.
- Le rapport MF/HF peut être considéré comme un indice de la balance sympatho-vagale.
- Les bandes BF (basses fréquences ou VLF, Very Low Frequency), de 0,004 à 0,040 Hz sont d'interprétation discutée.

- **Correspondance entre les paramètres de l'analyse temporelle et de l'analyse spectrale**

SDNN et la puissance spectrale totale sont mathématiquement très proches, à condition que l'analyse spectrale soit réalisée sur de longues périodes et non sur des



segments de 5 minutes. Dans ce cas cette analyse ne prend pas en compte les variations supérieures à 5 minutes qui sont importantes dans la période diurne.

RMSSD et pNN50 sont fortement corrélés aux HF (234) (0,15-0,40 Hz) ( $r > 0,85$ ).

### **2.2.1.3. L'analyse de la dynamicité de l'intervalle QT**

#### *Calcul*

L'intervalle QTe (QT end) et Qta (QT apex) a été mesuré à partir d'un électrocardiogramme 12 pistes. Le QTe débute au pied du QRS et se termine par l'intersection de la tangente de la portion descendante de l'onde T avec la ligne isoélectrique moyennée. Le Qta est se termine à l'apex de l'onde T. QTe et QTa sont calculés battement par battement. Ces intervalles sont ensuite couplés aux intervalles RR précédents. On peut construire un nuage de points QT/RR et calculer le coefficient de régression et l'équation de la droite liant les deux variables. On obtient la pente de la droite de régression,  $r_{QT}$ .

#### *Interprétation du $r_{QT}$*

Les modifications de la balance sympatho-vagale peuvent induire des modifications de l'intervalle QT indépendamment de la fréquence cardiaque. Ainsi, pour une fréquence cardiaque donnée, la stimulation vagale et l'acétylcholine peuvent entraîner un allongement de l'intervalle QT (84;117;274). La stimulation du système sympathique, par exemple lors de l'exercice physique, entraîne une diminution de la durée de l'intervalle QT (157). Cependant la stimulation  $\beta$ -adrénergique (isoprénaline) entraîne un raccourcissement moins important de l'intervalle QT que l'exercice ou l'atropine (299). La pente de la courbe QT/RR est donc plus importante lors d'une stimulation sympathique  $\beta$ -adrénergique.

### **2.2.1.4. Critères principaux**

Les moyennes fréquences (MF), exprimées en unités normalisées suivant les recommandations internationales, reflétant au moins en partie les modulations du SNS et le rapport MF/HF, indice de la balance sympatho-vagale ont été choisis comme principaux critères. La dynamicité du QT a été évaluée sur la pente du QTe/RR ( $r_{QTe}$ ) et sur la pente du QTa/RR ( $r_{QTa}$ ).

## 2.2.2. La mesure de composition corporelle

La composition corporelle a été mesurée par absorptiométrie biphotonique sur un appareil LUNAR® DPX-IQ system (LUNAR® Corporation, 313 w. Beltline HWY, Madison, WI 53713, USA, version 4.1d du logiciel). L'appareil estime la masse grasse, la masse maigre et la masse osseuse (exprimées en kg) et donne les pourcentages de masse grasse et de masse maigre. Pour les sujets dont la largeur dépassait la largeur de la zone d'enregistrement, le bras gauche a été placé à l'extérieur de la table. En considérant que les bras gauche et droit ont la même composition, nous avons recalculé les valeurs manquantes à partir du bras droit.

En raison de problèmes techniques, 37 sujets n'ont pas eu de mesure de composition corporelle au temps 6 mois.

### 2.2.2.1. Analyses biochimiques

L'insulinémie a été mesurée à l'inclusion par une méthode radioimmunologique (Insulin IMX. Abbott laboratories, Tokyo, Japan). Les coefficients de variation intra-essais étaient de 4% et inter-essais de 6%. La réaction croisée avec la proinsuline était de 0,05%.

La glycémie a été mesurée par la méthode de la glucose oxidase (Beckman Instruments Inc, Fullerton, CA).

L'index HOMA (Homeostasis model assessment) a été calculé pour évaluer la sensibilité à l'insuline, selon Mathiews *et al.* (319), Cette formule est la suivante :  $HOMA = \text{insulinémie à jeun (mU/ml)} \times \text{glycémie à jeun (mmol/l)} / 22,5$ .

Le HDL-cholesterol a été analysé après précipitation des lipoprotéines contenant l'apoB avec du phosphotungstate de sodium / chlorure de magnésium (Boehringer Mannheim, FRG). Le cholestérol total et les triglycérides ont été mesurés avec des kits commercialisés (Boehringer, Mannheim, FRG) adaptés pour l'analyseur Hitachi 911 (Japan). Le LDL-cholesterol a été calculé selon la formule de Friedewald *et al.* (154).

La leptine a été mesurée à l'inclusion et à 6 mois par une méthode radioimmunologique (LINCO Research Inc., St Louis, MO, USA). Les coefficients intra-essais et inter-essais étaient respectivement de 4,5 et 8%.

### **2.3. Protocole**

Les patients étaient vus une première fois lors d'une visite préinclusion. Les patients pouvant être inclus étaient suivis pendant trois semaines sans médicament ni conseils diététiques. A la visite d'inclusion, les patients ayant maintenu leur poids stable, étaient randomisés trois par trois dans chaque groupe de traitement : placebo, sibutramine 10 mg, sibutramine 20 mg, une fois par jour pendant 6 mois. Pour des raisons de tolérance, les patients du groupe sibutramine 20 mg recevaient une dose de 15 mg pendant les deux premières semaines puis une dose de 20 mg.

Lors de la visite d'inclusion, des conseils diététiques étaient donnés par une diététicienne. La restriction calorique était de 30% des apports caloriques. La sibutramine et le placebo provenaient du laboratoire Knoll Pharmaceuticals (Nottingham, United Kingdom). Cette étude a été approuvée par le comité de consultation pour la protection des personnes et des biens de Nancy.

### **2.4. Analyse statistique**

Les valeurs sont exprimées en moyenne et écart type. L'analyse statistique a été réalisée sur les logiciels Statview version 5 et BMDP (Berkeley, CA, University of California press, 1992).

La normalité des variables a été vérifiée par un test de Skewness et de Kurtosis. Des régressions linéaires ont été faites pour évaluer les coefficients de corrélation entre les variables. Des régressions multiples ont été utilisées pour tester plusieurs variables indépendantes ou variables d'ajustement. La valeur de  $p < 0,05$  était la valeur seuil de signification.

### 3. Résultats

#### 3.1. Paramètres anthropométriques et biologiques

##### 3.1.1. Description

Les principales caractéristiques anthropométriques et biologiques des sujets et les principaux indices de variabilité de la fréquence cardiaque sont reportés dans le Tableau 1. Soixante dix-neuf patientes avaient un IMC compris entre 30 et 34,9 kg/m<sup>2</sup> et 16 avaient une obésité sévère (IMC compris entre 35 et 39,9 kg/m<sup>2</sup>). La masse grasse variait de 26,2 à 58,4 kg, la leptine de 15 à 81,5 ng/ml et le rapport leptine/masse grasse de 0,44 à 1,74 ng/ml/kg.

**Tableau 1 :** Paramètres cliniques, biologiques et de composition corporelle (n=95)

Variables	Moyennes ± SD	Extrêmes
Age	40,4 ± 11,4	19,0 - 62,0
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	33,2 ± 2,3	30,0 - 40,0
T/H	1,17 ± 0,07	1,00 - 1,32
leptine (ng/ml)	37,3 ± 11,9	15,0 - 81,5
leptine/MG (µg/l/kg)	0,90 ± 0,26	0,44 - 1,74
Insulin (mU/l)	22,5 ± 22,8	3,7 - 70,0
HOMA	5,66 ± 7,53	0,88 - 28,8
Glycémie (g/l)	0,91 ± 0,14	0,45 - 1,29
Cholestérol (g/l)	2,08 ± 0,37	1,20 - 3,40
HDL-cholestérol (g/l)	0,55 ± 0,12	0,29 - 0,93
Triglycérides (g/l)	1,36 ± 0,84	0,31 - 4,02
% masse grasse	46,6 ± 3,7	37,5 - 56,4
Masse grasse (kg)	41,5 ± 5,9	26,2 - 58,4

T : taille, H : hanche, MG : masse grasse, HOMA : homeostasis model assessment

##### 3.1.2. Paramètres corrélés à la leptine

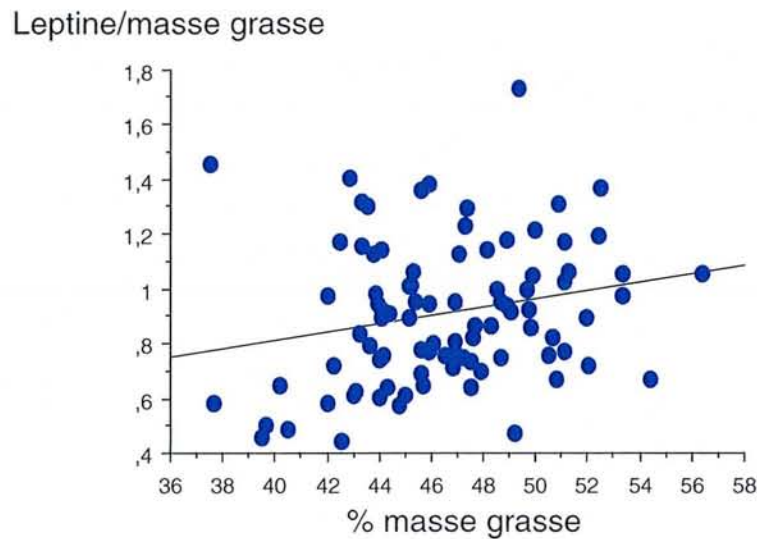
Le Tableau 2 montrent les coefficients de corrélation entre la leptine ou le rapport leptine/masse grasse et les paramètres anthropométriques ou métaboliques. La leptinémie après 12 heures de jeun était corrélée significativement et positivement avec la masse grasse du sujet, en valeur absolue et en %, et avec le rapport taille/hanche (Tableau 2). L'insulinémie était corrélée significativement à la concentration de leptine.

Le rapport leptine /masse grasse était uniquement corrélé avec la masse grasse en % ( $r=0,22$  ;  $p=0,037$ ) (figure 1). Par conséquent, plus la masse grasse est importante, plus le rapport leptine/masse grasse est élevé.

**Tableau 2 :** Corrélations entre la leptinémie et les paramètres anthropométriques et de composition corporelle à l'inclusion.

<b>Variables indépendantes</b>	leptine		leptine/masse grasse	
	<b>r</b>	<b>p</b>		
Age	-0,21	0,019	-0,12	NS
IMC	0,29	0,001	-0,03	NS
T/H	0,32	0,0004	0,06	NS
<b>Composition corporelle</b>				
Masse grasse (kg)	0,45	<0,0001	0,06	NS
Masse grasse %	0,53	<0,0001	0,22	0,036
Masse maigre (kg)	-0,10	NS	-0,21	0,044
<b>Paramètres biologiques</b>				
Insuline	0,25	0,011	0,19	0,06
HDL-cholesterol	0,09	NS	-0,06	NS
Triglycérides	0,04	NS	-0,01	NS
Glycémie	0,02	NS	-0,01	NS

**Figure 1 :** Régression linéaire entre le rapport leptinémie/masse grasse et le % de masse grasse ;  $r=0,22$  ;  $p=0,037$



## 3.2. Pression artérielle et paramètres de variabilité

### 3.2.1. Description

La PAD, la PAS, la FC et les principaux indices de variabilité de la FC sont rapportés dans le Tableau 3.

**Tableau 3** : Pression artérielle, fréquence cardiaque, principaux paramètres de variabilité de la fréquence cardiaque et le rQT (n=95)

Variables	Moyennes $\pm$ SD	Extrêmes
PAD (MMHG)	74,4 $\pm$ 9,1	55,0 - 95,0
PAS (mmHg)	122,8 $\pm$ 12,5	89,0 - 145,0
FC (Bat/min)	72,2 $\pm$ 7,9	55,0 - 93,0
SD de la FC	136,9 $\pm$ 33,3	71,2 - 255,0
SDNN (ms)	97,8 $\pm$ 32,4	45,7 - 203,9
SDANN (ms)	123,7 $\pm$ 33,1	60,4 - 228,4
PNN50 (%)	9,3 $\pm$ 7,6	0,1 - 31,9
RMSSD	33,6 $\pm$ 15,4	10,8 - 80,1
Puissance Totale (ms <sup>2</sup> )	3258 $\pm$ 178	550 - 8294
MF/HF	5,40 $\pm$ 2,39	0,92 - 12,49
MF (n.u.)	0,82 $\pm$ 0,08	0,48 - 0,93
RQTe	0,84 $\pm$ 0,11	0,44 - 0,96
RQTa	0,92 $\pm$ 0,04	0,82 - 0,98

### 3.2.2. Paramètres corrélés à la leptine

La pression artérielle diastolique était corrélée à la leptine ( $p=0,040$ ) et au rapport leptine/masse grasse ( $p=0,022$ ). Cette relation restait significative après ajustement sur l'insuline, le rapport taille sur hanche, le % de masse grasse et l'âge ( $r= -0,24$  ;  $p=0,027$  avec la leptine; et  $r= -0,21$  ;  $p=0,036$  avec le rapport leptine/masse grasse). Ni la fréquence cardiaque ni la pression artérielle systolique n'étaient corrélées à la leptine ou au rapport leptine/masse grasse.

Les MF (u.n.), le rapport MF/HF, SDNN, le rQTa et le rQTe étaient corrélés négativement avec la concentration de leptine. Les relations entre les MF, le rapport MF/HF, le rQTe et la leptine, étaient également significatives après ajustement sur la masse grasse. L'indépendance de cette relation statistique avec la masse grasse a été confirmée en calculant le rapport leptinémie/masse grasse (Tableau 4).

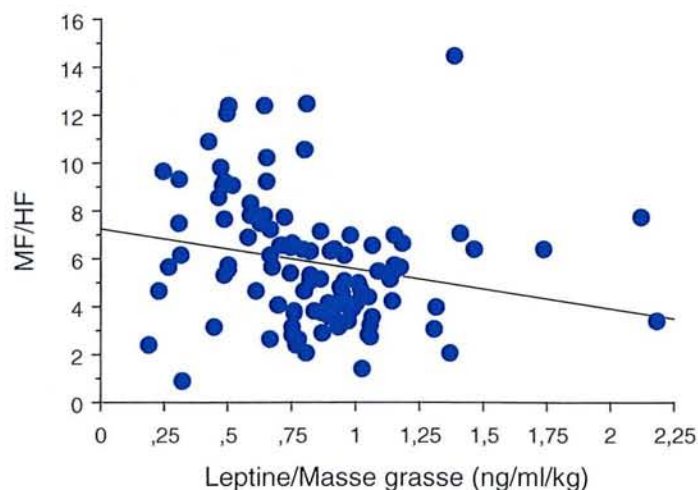
Les MF et le rapport MF/HF diminuaient graduellement avec ce rapport (figure 2). Aucun des paramètres considérés comme des indices d'activité du parasympathique, RMSSD, pNN50, et HF (u.n.) n'était significativement corrélé à la leptine.

Les MF (u.n.) était négativement corrélées à l'insulinémie ( $r=-0,25$  ;  $p=0,028$ ) alors que la corrélation entre le rapport MF/HF et l'insulinémie n'était pas significative après ajustement sur l'âge ( $r= -0,19$  ;  $p = 0,08$ ). Les MF étaient également corrélées négativement à l'IMC mais de façon non significative après ajustement sur l'âge ( $r = -0,21$  ;  $p = 0,08$ ).

**Tableau 4 :** Corrélations entre la leptinémie et les composantes de la variabilité de la fréquence cardiaque ajustées sur l'âge à l'inclusion.

	leptine		leptine/masse grasse	
PAD	-0,20	0,040	-0,22	0,022
PAS	0,05	NS	0,05	NS
FC	0,17	NS	0,16	NS
<b>Variabilité FC</b>				
<i>Analyse spectrale</i>				
Puissance totale	-0,09	NS	-0,10	NS
MF (u.n.)	-0,30	0,002	-0,28	0,004
MF/HF	-0,36	<0,001	-0,33	0,0007
<i>Analyse fréquentielle</i>				
SDNN	-0,33	0,026	-0,26	0,07
<b>QT</b>				
rQT <sub>e</sub>	-0,31	0,037	-0,31	0,038
rQT <sub>a</sub>	-0,34	0,024	-0,25	0,090

**Figure 2 :** Analyse en régression linéaire entre le rapport leptinémie/masse grasse et le rapport MF/HF ;  $r = -0,21$  ;  $p = 0,027$



### 3.2.2.1. Facteurs expliquant les variations des MF et du rapport MF/HF

Différents modèles ont été testés pour expliquer les MF et le rapport MF/HF. L'âge, la masse grasse (%), l'insuline, le rapport leptine/masse grasse ou la leptine ont été testées comme variables indépendantes.

*Les MF* étaient corrélées négativement et significativement au rapport leptine/masse grasse et de façon indépendante à l'âge et à l'insulinémie. Ce modèle expliquait 38 % de la variance de ce paramètre.

*Le rapport MF/HF* était corrélé négativement et significativement au rapport leptine/masse grasse et de façon indépendante à l'âge. Ce modèle expliquait 33 % de la variance de ce paramètre.

*Le rQTe* était corrélé négativement et de façon indépendante uniquement au rapport leptine/masse grasse. Ce modèle expliquait 17 % de la variance de ce paramètre.

*Des résultats similaires ont été trouvés en remplacement le rapport leptine /masse grasse et la masse grasse (%), par la leptinémie et la masse grasse en kg (données non détaillées).*



**Tableau 5 :** Analyse multivariée entre MF (u.n.), MF/HF et rQT (variables dépendantes) et le ratio leptinémie/masse grasse (MG), à l'inclusion (variables indépendantes) (n= 95).

Variables				
Dépendantes	Indépendantes	$\beta$	F	r <sup>2</sup> du modèle
MF (n.u.)	leptine/MG	$-50,5 \cdot 10^{-3} \pm 25,1 \cdot 10^{-3}$	4,1	0,38
	âge	$-2,1 \cdot 10^{-3} \pm 0,6 \cdot 10^{-3}$	8,6	
	Insulinémie	$-1,1 \cdot 10^{-3} \pm 0,35 \cdot 10^{-3}$	10,4	
	% masse grasse	$-3,4 \cdot 10^{-3} \pm 1,95 \cdot 10^{-3}$		
MF/HF	leptine/MG	$-2,63 \pm 0,90$	8,5	0,33
	âge	$-0,065 \pm 0,238$	7,6	
	Insulinémie	-		
	% masse grasse	-		
rQTe	leptine/MG	$-42,5 \cdot 10^{-3} \pm 19,7 \cdot 10^{-3}$	4,6	0,17
	âge	-		
	Insulinémie	-		
	% masse grasse	-		

### 3.2.2.2. Etude longitudinale : effets de la perte de poids

Cinquante-huit femmes (61%) ont eu l'ensemble des examens à 3 mois et 6 mois (groupe placebo : n= 19, groupe 10 mg sibutramine: n = 19, et groupe 20 mg sibutramine :n = 20). Dans ce sous groupe, les données à l'inclusion n'étaient pas différentes de l'ensemble du groupe (n=95). Les modifications observées à 3 mois et à 6 mois sont rapportées dans le tableau 6 et la figure 3. L'ensemble des paramètres anthropométriques et de la variabilité de la fréquence cardiaque était profondément modifié par la restriction alimentaire et l'amaigrissement.

*Evolution des paramètres anthropométriques (Tableau 6).*

A 3 mois, la perte de poids n'était pas différente dans les trois groupes mais était significativement plus importante dans les deux groupes sibutramine à 6 mois. La diminution de la leptinémie était significative à 6 mois dans les deux groupes traités par sibutramine. La leptinémie n'était pas différente entre ces deux groupes alors que la

perte de poids était plus importante dans le groupe sibutramine 20 mg. Par contre le rapport leptine/masse grasse n'était pas significativement modifié dans les trois groupes.

Au 6<sup>ème</sup> mois, la perte de poids était significative dans les 3 groupes.

### *Evolution des paramètres de la variabilité (Tableau 6 et figure 3)*

#### **A 3 mois**

La puissance spectrale totale, les puissances spectrales des MF et des HF étaient significativement diminuées dans les trois groupes. Par contre en unités normalisées, les MF augmentaient de façon significative dans les trois groupes, de même que le rapport MF/HF alors que les HF (u.n.) diminuaient significativement (figure 3). Tous les paramètres de variabilité en analyse temporelle étaient significativement abaissés.

#### **Entre le 3<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> mois**

Les puissance totale, les puissances spectrales des MF et des HF remontaient de façon très significative, alors que dans le même temps la perte de poids était moins importante dans les trois groupes de traitement ( $p < 0,01$ ). Les valeurs de MF ( $ms^2$ ) et des HF ( $ms^2$ ) étaient plus élevées à 6 mois que lors de l'inclusion, mais la contribution des MF à la variabilité totale était plus basse comme le montrent les valeurs de MF en unités normalisées et le rapport des MF/HF ( $p < 0,001$ ).

#### **Relation avec la perte de poids**

Entre l'inclusion et la troisième mois, la réduction (delta) de la variabilité totale de la fréquence cardiaque était corrélée à la perte de poids ( $r = 0,33; p = 0,025$ ). D'autre part, la perte de poids entre le 3<sup>ème</sup> mois et le 6<sup>ème</sup> mois était significativement corrélée à la valeur des MF (u.n.) à 3 mois, indépendamment de la valeur du poids à cette date. Les sujets ayant les MF les plus basses ont donc moins maigri que les sujets ayant des MF élevées: les LF (u.n.) à trois mois étaient corrélées négativement à la perte de masse grasse en pourcentage ( $r = -0,27; p = 0,041$ ), à la masse grasse en kg ( $r = -0,29; p = 0,034$ ) et à la perte de poids ( $r = -0,25; p = 0,06$ ).

Les modifications de variabilité de la fréquence cardiaque observées au cours de l'amaigrissement ont été également analysées dans toute la population ayant eu un enregistrement holter ( $n = 95$ ) (données non détaillées). Ces variations étaient identiques à celles rapportés chez les patientes ayant bénéficiées d'une analyse de composition corporelle.

### **La relation entre les MF et le rapport leptine/masse grasse à 6 mois**

Une régression multiple a été refaite sur les variables à 6 mois pour analyser les relations indépendantes de chaque paramètre sur les MF (u.n.) et sur le rapport MF/HF (tableau 7). Les MF et le rapport MF/HF étaient corrélées négativement au rapport leptine/masse grasse et à l'âge de façon indépendante. Le traitement n'influçait pas cette relation. L'âge et le rapport leptine/masse grasse expliquait 21% de la variance des MF et 22% de la variance du rapport MF/HF. Par conséquent les femmes qui ont une leptinémie haute à 6 mois avaient également des MF (u.n.) et un rapport MF/HF bas.p

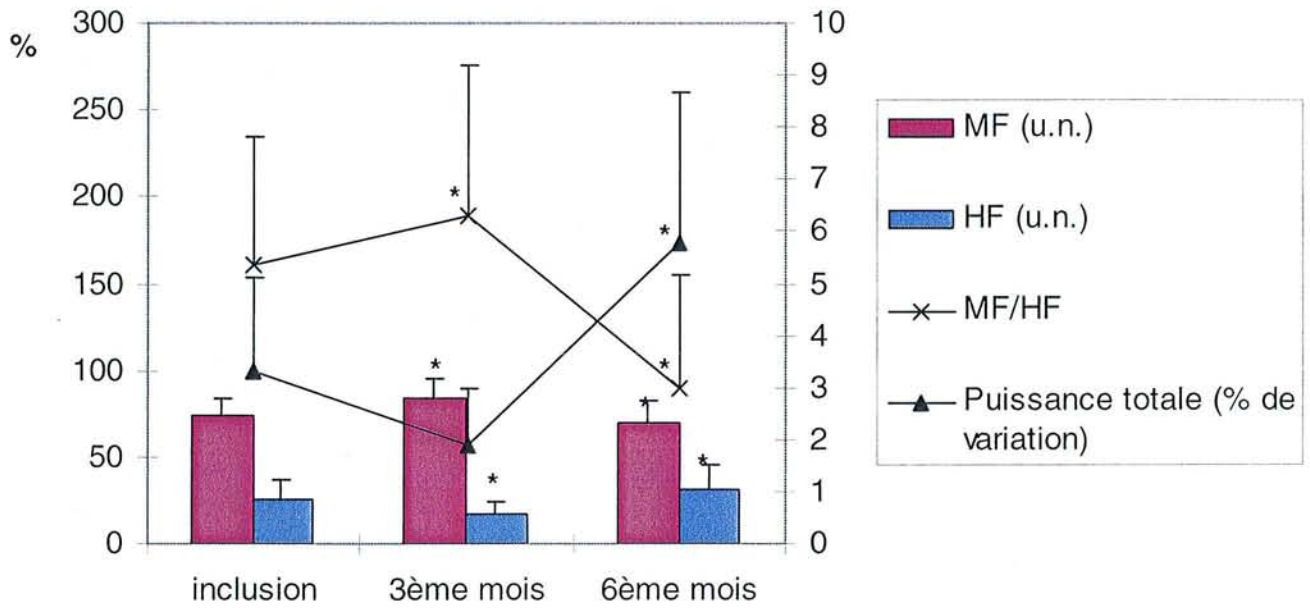
**Tableau 6 :** Evolution des paramètres anthropométriques, des puissances totales, de la leptinémie, des MF et des HF et à l'inclusion, à 3 mois et à 6 mois (n=58)

	Inclusion	3 <sup>ème</sup> mois et delta (M3-M0) *	6 <sup>ème</sup> mois et delta (M3-M0)	p du delta M6-M0	Anova Groupes Traitement à M6
<b>Poids (kg)</b>					
Placebo	89,2 ± 7,9	85,9 ± 13,3 (-3,4 % ± 1,8)	86,7 ± 8,1 (-2,9 % ± 3,5)	0,002	<0,001
10 mg Sibutramine	87,2 ± 6,7	83,2 ± 5,3 (-4,3 % ± 1,3)	80,3 ± 6,8 (-7,0 % ± 4,4)	<0,001	
20 mg Sibutramine	88,7 ± 6,6	81,3 ± 7,7 (-4,4 % ± 1,7)	79,5 ± 10,2 (-10,5 % ± 7,2)	<0,001	
<b>Masse Grasse (kg)</b>					
Placebo	43,2 ± 5,9	40,4 ± 8,0 (-9 % ± 10,7)	40,8 ± 5,8 (-5,9 % ± 2,9)	0,004	<0,001
10 mg Sibutramine	41,8 ± 5,4	37,0 ± 5,2 (-12,6 % ± 6,0)	35,0 ± 6,3 (-16,3 % ± 4,3)	<0,001	
20 mg Sibutramine	42,2 ± 5,2	35,8 ± 5,0 (-14,3 % ± 7,1)	33,8 ± 7,6 (-20,5 % ± 5,7)	<0,001	
<b>Leptine</b>					
Placebo	39,7 ± 13,4		37,1 ± 11,6 (-6,2 % ± 17,2)	NS	< 0,001
10 mg Sibutramine	36,2 ± 10,7		27,8 ± 13,7 (-8,7 % ± 12,4)	0,017	
20 mg Sibutramine	38,5 ± 9,2		29,8 ± 14,6 (-8,1 % ± 17,1)	0,031	
<b>Leptine/masse grasse(ng/ml/kg)</b>					
Placebo	0,92 ± 0,27		0,91 ± 0,27 (-1,1 % ± 0,35)	NS	NS
10 mg Sibutramine	0,88 ± 0,27		0,76 ± 0,27 (-9,9 % ± 0,32)	NS	
20 mg Sibutramine	0,91 ± 0,22		0,85 ± 0,32 (-4,2 % ± 0,35)	NS	
<b>Puissance Totale (ms<sup>2</sup>)</b>					
Placebo	3233 ± 2021	2262 ± 1225 (-33,8 % ± 18,5)	4777 ± 3348 (+62,8 % ± 9,0)	<0,001	NS
10 mg Sibutramine	2371 ± 1503	1651 ± 929 (-43,0 % ± 12,9)	3445 ± 2224 (+46,6 % ± 22,3)	<0,001	
20 mg Sibutramine	3002 ± 1426	1788 ± 929 (-44,6 % ± 16,7)	4352 ± 2480 (+42,0 % ± 25,7)	<0,001	
<b>MF (ms<sup>2</sup>)</b>					
Placebo	968 ± 753	594 ± 317(-30,7% ± 20,4)	1423 ± 1365 (+62,7% ± 87,4)	<0,001	NS
10 mg Sibutramine	651 ± 485	466 ± 273 (-40,1% ± 14,4)	926 ± 793 (+39,1% ± 18,7)	<0,001	
20 mg Sibutramine	767 ± 365	491 ± 258 (-41,8% ± 9,9)	1108 ± 594 (+41,4% ± 20,1)	<0,001	
<b>MF (u.n.)</b>					
Placebo	76,2 ± 9,4	81,6 ± 18,6 (+7,1 % ± 5,3)	70,4 ± 13,0 (-7,5 % ± 7,6)	<0,001	NS
10 mg Sibutramine	72,8 ± 9,3	84,3 ± 20,1 (+15,1 % ± 5,5)	67,6 ± 13,2 (-8,3 % ± 10,8)	<0,001	
20 mg Sibutramine	75,7 ± 8,9	86,7 ± 21,3 (+14,5 % ± 3,5)	70,5 ± 11,1 (-7,3 % ± 5,4)	<0,001	
<b>HF (ms<sup>2</sup>)</b>					
Placebo	376 ± 440	128 ± 120 (-58,1% ± 18,0)	747 ± 896 (126,6% ± 98,6)	<0,001	NS
10 mg Sibutramine	234 ± 198	91 ± 73 (-73,0% ± 11,3)	448 ± 4 31 (86,8% ± 52,7)	<0,001	
20 mg Sibutramine	276 ± 20	87 ± 54 (-66,4% ± 16,1)	562 ± 559 (84,2% ± 40,0)	<0,001	
<b>HF (u.n.)</b>					
Placebo	23,8 ± 9,4	16,6 ± 9,2 (-30,2 % ± 21,8)	29,5 ± 13,1 (+20,1 % ± 5,1)	<0,001	NS
10 mg Sibutramine	27,1 ± 9,1	12,8 ± 4,2 (-52,7 % ± 13,7)	32,4 ± 13,2 (+20,4 % ± 7,3)	<0,001	
20 mg Sibutramine	24,3 ± 8,9	16,3 ± 6,4 (-32,9 % ± 18,9)	29,5 ± 11,2 (+19,6 % ± 3,1)	<0,001	
<b>MF/HF</b>					
Placebo	5,4 ± 1,9	6,3 ± 2,8 (+32,6 % ± 7,9)	3,2 ± 2,1 (-41,5 % ± 24,1)	<0,001	NS
10 mg Sibutramine	5,7 ± 2,2	7,6 ± 2,5 (+33,3 % ± 3,0)	2,8 ± 2,4 (-42,2 % ± 71,7)	<0,001	
20 mg Sibutramine	5,6 ± 2,1	6,8 ± 3,7 (+28,4 % ± 5,3)	2,8 ± 1,2 (-46,9 % ± 24,9)	<0,001	

- Les différences observées entre les groupes de traitement à 3 mois n'étaient pas significatives, excepté pour la perte de poids et la perte de masse grasse, qui étaient plus importantes dans le groupe sibutramine 20 mg.



**Figure 3 :** Evolution de la variabilité de la fréquence cardiaque au cours de l'amaigrissement (n=58). Moyennes des trois groupes de traitement  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$  en comparaison avec les valeurs à l'inclusion.



**Tableau 7** : Paramètres expliquant les MF (u.n.), le rapport MF/HF et rQT (variable dépendante) à l'inclusion et au 6<sup>ème</sup> mois.

Inclusion (n=95)					6ème mois (n=58)			
Dépendante	Indépendante	$\beta$	F	r <sup>2</sup> du modèle	Indépendante	$\beta$	F	r <sup>2</sup> du modèle
MF (n.u.)	leptine/MG	$-50,5 \cdot 10^{-3} \pm 25,1 \cdot 10^{-3}$	4,1	0,38	leptine/MG	$-0,132 \pm 0,057$	5,4	0,21
	âge	$-2,1 \cdot 10^{-3} \pm 0,6 \cdot 10^{-3}$	8,6		âge	$-4,1 \cdot 10^{-3} \pm 1,4 \cdot 10^{-3}$	7,9	
	Insulinémie	$-1,1 \cdot 10^{-3} \pm 0,35 \cdot 10^{-3}$	10,4		% masse	-		
	% masse grasse	-			grasse	-		
	Traitement							
MF/HF	leptine/MG	$-2,63 \pm 0,90$	8,5	0,33	leptine/MG	$-2,52 \pm 0,97$	6,7	0,22
	âge	$-0,065 \pm 0,238$	7,6		âge	$-0,099 \pm 0,032$	9,7	
	Insulinémie	-			% masse	-		
	% masse grasse	-			grasse	-		
	Traitement							
rQTe	leptine/MG	$-42,5 \cdot 10^{-3} \pm 19,7 \cdot 10^{-3}$	4,6	0,17	ND			
	âge	-						
	Insulinémie	-						
	% masse grasse	-						

## 4. Discussion

- **Principaux résultats**

L'augmentation de la leptinémie, indépendamment de la masse grasse, de l'âge ou de l'insulinémie, était associée à une diminution de la pression artérielle diastolique et à une diminution des MF et du rapport MF/HF. Ces deux paramètres de la variabilité de la fréquence cardiaque sont essentiellement liés au système nerveux sympathique ou à la balance sympatho-vagale. Les paramètres de l'analyse temporelle évaluant la variabilité globale (SDNN) et le rQTa étaient également inversement corrélés à la concentration de leptine. Par contre, aucun des indices d'activité du parasympathique n'était associé à la leptinémie. Cette relation semble d'autant plus intéressante que nous l'avons retrouvée après perte de poids, alors que dans le même temps, nous avons observé une diminution des valeurs de MF (u.n.) et du rapport MF/HF.

Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Paolisso *et al.* (371) qui ont trouvé une corrélation positive entre la concentration plasmatique de leptine et le rapport MF/HF dans une population de sujets de poids normal. Cette relation serait donc inverse chez les sujets obèses normotendus.

Les MF (u.n.) étaient également corrélées négativement à l'insulinémie indépendamment du rapport leptine/masse grasse. Il y a donc un effet additionnel de ces deux paramètres. Les sujets ayant un rapport leptine/masse grasse et une insulinémie élevés auraient donc une diminution de l'activité du système sympathique. Ces résultats observés chez des sujets obèses normotendus ayant une leptinémie élevée suggèrent l'existence d'une résistance globale à la leptine, touchant à la fois la régulation de la faim et la stimulation sympathique.

- **Une résistance sélective à la leptine**

En stimulant le SNS, la leptine est susceptible de jouer un rôle important dans la régulation de la pression artérielle (111;313). Cette stimulation pourrait être sélective et ne concerner que certains territoires (529). Chez l'animal, la leptine active de façon sélective le SNS qui innerve le rein, la médullo-surrénale et les pattes postérieures (197). La leptinémie est augmentée chez les sujets obèses, en dehors des cas exceptionnels de déficit en leptine. D'autre part, au cours de l'obésité, l'activité du SNS évaluée par mesure du flux de noradrénaline libérée par les tissus ou par microneurographie (4;172;174;175;529) est élevée. La régulation par rétrocontrôle négatif la synthèse de



leptine du SNS pourrait donc être défaillante chez le sujet obèse du fait de la résistance du tissu adipeux aux catécholamines (65). Chez l'homme, la leptine est corrélée à la pression artérielle et à l'activité sympathique mesurée en microneurographie chez le sujet de poids normal ou en surpoids (480). Par conséquent, la leptine pourrait être une des causes de l'augmentation de la pression artérielle chez le sujet obèse (3;111;312). La résistance à la leptine pourrait donc être sélective dans l'obésité, touchant la régulation de la prise alimentaire mais pas la stimulation sympathique.

Un modèle animal d'obésité, la souris Agouti peut illustrer le mécanisme de résistance sélective à la leptine. Cette souris synthétise en excès la protéine Agouti (ou AGRP « agouti related peptide). Cette protéine bloque les récepteurs MC4R à l'origine de l'inhibition de la synthèse de neuropeptide Y. Cette souris est donc insensible aux effets de la leptine sur la régulation de la faim et de la satiété. Néanmoins, l'injection de leptine dans les ventricules cérébraux provoque une activation du système sympathique rénale. L'augmentation de l'activité sympathique est proportionnelle à la dose de leptine injectée. Par contre, cette injection n'entraîne pas de modification de comportement alimentaire ou de changements de poids (109;396). Cette stimulation contribue chez cette souris à la régulation tensionnelle (366).

- **Une résistance globale à la leptine**

Les sujets ayant un rapport leptine/masse grasse élevé, sans hypertension, comme ceux que nous avons recrutés dans notre étude, pourrait correspondre à un phénotype d'obésité caractérisé par une résistance globale à la leptine, touchant à la fois la régulation de la satiété et l'activité sympathique, et qui ne serait donc pas associé à une hypertension artérielle. La relation négative entre pression artérielle diastolique et le rapport leptine/masse grasse est également en faveur de cette hypothèse.

Un modèle animal d'obésité le rat F-344xBN pourrait illustrer ce type d'obésité (440). Ce rat grossit progressivement et devient obèse en vieillissant, de façon similaire à certaines obésité de l'espèce humaine ; et ceci malgré une leptinémie très élevée. Deux mécanismes distincts semblent expliquer l'apparition d'une leptino-résistance chez ce rat, l'un est périphérique, l'autre est central. Quand la leptine est injectée en intra-ventriculaire, on observe une résistance globale à la leptine, qui est cependant moins importante que lorsque la leptine est injectée en périphérie. Des anomalies dans la transmission du message de la leptine ont été mises en évidence chez ce rat. Une diminution de la phosphorylation de la protéine « cytosolic signal transducer and activator

of transcription » apparaissant avec le vieillissement a été montrée au niveau de l'hypothalamus. La résistance à la leptine injectée en périphérie n'est pas complètement élucidée. Néanmoins, la leptine passe la barrière hémato-encéphalique grâce à un transporteur qui est saturable (33;91;457). Les souris obèses new Zealand et AKS sont résistantes à la leptine injectée en périphérie mais pas en administration centrale (187;524). Ces deux modèles ne s'accompagnent pas d'une stimulation sympathique.

Chez l'homme, l'augmentation de l'activité sympathique n'est pas retrouvée dans certaines ethnies comme les Indiens Pima. Spraul *et al.* (486) ont montré que la relation entre l'activité du SNS et le pourcentage de masse grasse n'existe pas chez les Indiens Pima. Or la prévalence de l'hypertension artérielle est faible dans cette population. Il est tentant de faire un rapprochement avec nos propres données. Nous avons mis en évidence (385), chez des sujets obèses normotendus, une diminution de l'activité sympathique ou de la réponse au système sympathique et une diminution de la sensibilité du baroréflexe (394). Ces résultats peuvent être expliqués par une baisse d'activité du SNS ou par une diminution de la sensibilité des tissus aux catécholamines.

- **Analyse des données longitudinales**

Lors du suivi longitudinal, nous avons observé une réponse biphasique des indices de variabilité de la fréquence cardiaque. Après la phase d'amaigrissement rapide, à trois mois, les puissances spectrales totales, les MF et les HF ont chuté. La composante sympathique de la variabilité (les MF(u.n.)) et la balance sympatho-vagale était augmentée à trois mois, en raison d'une diminution proportionnellement plus importante des HF. Pendant la deuxième phase, entre 3 et 6 mois, la perte de poids était moins importante et les indices de la variabilité sont revenues à un niveau plus proche des valeurs de base. Néanmoins, à 6 mois, la variabilité totale, les MF et les HF étaient plus élevées qu'à l'inclusion. En revanche, les MF (u.n.) et le rapport MF/HF étaient diminués.

### **A trois mois**

L'effet de l'amaigrissement sur l'activité sympathique a été très peu étudié. Lors d'une perte de poids importante, Grassi *et al.* ont montré que l'activité du SNS diminuait fortement, probablement en raison de la chute de l'insulinémie (175). Il pourrait également s'agir d'un mécanisme adaptatif permettant de diminuer la dépense énergétique afin de résister à l'amaigrissement. Au contraire, Verwaerde *et al.* (534) ont observé une augmentation des MF lors de la prise de poids de chiens rendus obèses.

## **A six mois**

A 6 mois, la puissance spectrale totale était significativement augmentée par rapport aux valeurs de base. Cette augmentation est en faveur d'un affaiblissement initial du SNA qui s'améliore après perte de poids. Ces résultats sont en accord avec ceux de Grassi *et al.* (175) qui ont montré que l'amaigrissement permettait d'améliorer la sensibilité du baroréflexe de sujets obèses normotendus après 6 semaines de régime. Cependant nos résultats montrent que l'étude des variations du système nerveux autonome lors de l'amaigrissement nécessite de répéter les mesures après stabilisation du poids.

Malgré l'augmentation de la variabilité de la FC, les MF (u.n.) étaient diminuées à 6 mois par rapport à l'inclusion alors que la puissance des MF étaient augmentée. Ces résultats sont en accord avec ceux de Emdin *et al.* (136) qui ont trouvé une augmentation des MF après amaigrissement chez un petit groupe de sujets obèses. L'amaigrissement influence la balance sympatho-vagale car on observe une diminution de la composante sympathique et une prédominance de la composante vagale, comme le montre l'évolution du rapport MF/HF. Cette adaptation serait favorable sur le plan du risque cardio-vasculaire. En effet, une diminution de la variabilité totale associée à une augmentation de la composante sympathique est au contraire liée à une augmentation du risque de mortalité (164).

## **La sibutramine**

La sibutramine qui a été utilisée pour faciliter l'amaigrissement des sujets est connue pour augmenter l'activité du système nerveux sympathique (21;77). Mais, paradoxalement, elle n'a pas entraîné de modification significative de la variabilité de la fréquence cardiaque. Les effets de l'amaigrissement pourraient donc contrebalancer l'effet activateur connu de la sibutramine sur l'activité sympathique. Ce type de phénomène est déjà décrit pour la FC et la PA.

Cette étude n'avait pas pour objet de démontrer qu'une diminution des modulations du sympathique pourrait prédire la perte de poids comme cela a été montré dans d'autres études (22;486). Il est intéressant de noter que la perte de poids observée entre le 3<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> mois était corrélée aux valeurs des moyennes fréquences à 3 mois.

## ***La relation leptine /masse grasse et Moyennes Fréquences après amaigrissement***

L'amaigrissement n'a pas modifié la relation négative entre le rapport leptine/masse grasse et les modulations sympathiques mise en évidence à l'inclusion. Les sujets obèses normotendus ayant un rapport leptine/masse grasse élevé resteraient donc résistants à l'action de la leptine sur le SNS même après une perte de poids de 10% en moyenne.

Les indices de la variabilité de la fréquence sont le reflet à la fois de l'activité du système nerveux autonome mais aussi de la réponse des organes cibles, le cœur et les vaisseaux. La capacité du cœur ou des vaisseaux à répondre à une stimulation sympathique ou parasympathique dépend des récepteurs et de la transmission du signal dans la cellule. Par conséquent une activité sympathique forte peut s'accompagner d'une réponse faible, du fait d'une diminution d'affinité des récepteurs, d'une désensibilisation ou d'une anomalie dans la chaîne de transduction (407). L'insuffisance cardiaque (107) ou le vieillissement (151;346;531) en sont l'illustration puisqu'on observe dans ces deux cas, une augmentation du tonus sympathique et une diminution des modulations de la fréquence cardiaque des moyennes fréquences. On ne peut donc pas considérer les paramètres de variabilité comme une mesure d'une activité ou d'un tonus. L'hypothèse d'une diminution de la sensibilité des tissus aux catécholamines est possible dans l'obésité (175;394), nous ne pouvons pas exclure cette hypothèse pour expliquer nos résultats. Cette résistance aux catécholamines pourrait évoluer parallèlement à la résistance à l'insuline, comme nous l'avons montré dans nos deux études antérieures (394).

En conclusion, la réponse à une stimulation du système nerveux sympathique pourrait être altéré chez le sujet obèse normotendus ayant une leptinémie élevée. Le fait de remplacer la leptinémie par le rapport leptine/masse grasse ou d'ajuster sur la masse grasse ne modifie pas cette relation. L'amaigrissement obtenu par un régime hypocalorique associé ou non à un traitement par la sibutramine entraîne des modifications importantes de la variabilité de la fréquence cardiaque mais ne modifie pas au bout de 6 mois, la relation négative entre la leptinémie et la composante sympathique de la variabilité de la fréquence cardiaque ou la pression artérielle diastolique. Les sujets obèses normotendus hyperleptinémiques (rapport leptine/masse grasse élevé)

pourraient donc présenter une résistance globale à la leptine, touchant à la fois le contrôle pondéral et l'activité sympathique ou vasopressive de la leptine.

## 5. Conclusion – Perspectives

### Principaux résultats et perspectives

Ces trois études ont permis de mettre en évidence une dysfonction autonome cardiovasculaire touchant principalement le système nerveux sympathique chez les sujets obèses normotendus les plus insulino-résistants. La diminution des modulations du SNS en position debout est en faveur d'une baisse de la sensibilité du baroréflexe comme le montre également l'étude du gain baroréflexe. Après une charge en glucose, la stimulation du système sympathique rapportée à l'augmentation de l'insulinémie est également altérée chez ces sujets obèses. Ces résultats sont en faveur d'une insulino-résistance du SNS. Dans la troisième étude, la baisse des modulations sympathiques est associée à l'augmentation du rapport leptine/masse grasse, et de façon indépendante au degré d'insulino-résistance.

L'hyperinsulinémie et l'hyperleptinémie sont deux mécanismes adaptatifs permettant la limitation de la prise de poids. L'action de ces deux hormones, qui activent le système sympathique, pourraient être défailante chez ces sujets obèses normotendus. L'absence de stimulation du système sympathique ou la résistance des tissus aux catécholamines pourrait précisément expliquer l'absence d'hypertension chez ces patients. La relation négative que nous avons trouvée entre la pression artérielle diastolique et le rapport leptinémie/masse grasse est également en faveur de cette hypothèse. La relation négative mise en évidence entre la leptine et les indices d'activité du SNS après amaigrissement suggère que la réponse du système nerveux sympathique à la leptine pourrait être perturbée de façon primitive chez les sujets les plus leptino-résistants. L'association d'une dysfonction sympathique, d'une résistance à la leptine et d'une insulino-résistance constitue un phénotype particulier d'obésité qui mériterait d'être mieux caractérisé dans l'histoire naturelle de la maladie. Son dépistage précoce, avant même que l'obésité ne soit sévère, permettrait d'élaborer de nouvelles stratégies de prévention et de traitement.

# **TROISIEME PARTIE : L'HYPOTHESE MEMBRANAIRE DE LA RESISTANCE A L'ACTION DES CATECHOLAMINES**

## **1) Etude Clinique préliminaire**

**La dysfonction sympathique chez le sujet obèse normotendu :  
l'hypothèse membranaire de la résistance à l'action des  
catécholamines**

## **2) Travaux de recherche au laboratoire**

**A) Influence de la sphingomyéline sur l'action des catécholamines**

**B) Analyse des effets de la sphingomyéline sur l'expression des  
gènes**

**S.C.D. - U.H.P. NANCY 1**  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique - BP 11  
54601 VILLERS-LES-NANCY Cédex

## **1) ETUDE DE RECHERCHE CLINIQUE**

**Dysfonction sympathique chez le sujet obèse normotendu :  
hypothèse membranaire de la diminution de l'action des  
catécholamines**



## 1. Situation du sujet

Comme nous l'avons déjà rapporté, les modifications de la composition membranaire en phospholipides pourraient influencer la transmission du signal. L'activité de l'adénylate cyclase et la sensibilité des récepteurs aux catécholamines varient en fonction de la composition des phospholipides en acides gras mais également de la nature de leur tête polaire (138). Jansson *et al.* (217) ont étudié des fibroblastes de hamsters transfectés par le gène du récepteur adrénergique  $\alpha 2$  et ont montré que l'activité de l'adénylate cyclase est altérée par la déplétion membranaire en sphingomyéline et en cholestérol.

Les cardiomyocytes de rats cirrhotiques sont moins sensibles à l'action des catécholamines. Ce défaut d'action pourrait être lié à une rigidification membranaire associée à une augmentation du rapport cholestérol/phospholipides (292).

La nature de la tête polaire des phospholipides pourrait donc jouer un rôle dans l'interaction entre les récepteurs adrénergiques ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\beta$ ) et leurs agonistes. Les récepteurs  $\beta$  seraient également affectés par l'action des phospholipases. Là encore, la tête polaire des phospholipides semble jouer un rôle important dans cette interaction (93;199;226). Le microenvironnement lipidique des récepteurs adrénergiques est donc susceptible d'avoir un rôle régulateur sur la transmission du signal (100).

Les récepteurs adrénergiques des cardiomyocytes sont localisés au sein des cavéoles (364;365;461). Ces microdomaines sont particulièrement riches en sphingomyéline (SM). La composition membranaire en SM pourrait donc influencer la régulation  $\beta$ -adrénergique.

La concentration en SM de la membrane de l'érythrocyte peut être considérée comme un marqueur du métabolisme de ce phospholipide dans l'organisme, car cette cellule ne peut pas synthétiser ou dégrader les phospholipides. Le contenu en cholestérol et en phospholipides de sa membrane plasmique dépendrait essentiellement des échanges avec les lipoprotéines (139;225). La composition membranaire de l'érythrocyte pourrait également être un marqueur de la composition membranaire d'autres tissus, comme cela a été établi en particulier pour le tissu adipeux (570).

## 2. Hypothèse

- La dysfonction sympathique observée chez les sujets obèses les plus insulino-résistants et leptino-résistants pourrait être liée à une diminution de la sensibilité des tissus aux catécholamines.
- Cette résistance aux catécholamines pourrait être liée à des anomalies membranaires, notamment à une augmentation de la sphingomyéline membranaire.

## 3. Objectifs

- Rechercher s'il existe une relation entre les indices de modulations du système nerveux sympathique et la composition lipidique ou en phospholipides de la membrane érythrocytaire

## 4. Méthodes

### 4.1. Sujets

Huit sujets témoins de poids normal et 13 sujets obèses normotendus (PAS <140 mmHg et PAD < 80 mmHg) ayant un IMC compris entre 30 et 40 kg/m<sup>2</sup> ont été inclus.

### 4.2. *Composition membranaire des hématies*

#### **Isolement des membranes**

- ✓ Lavage : un échantillon de sang (6 mL) est centrifugé à 120 g (1200 rpm) pendant 15 minutes à 4°C. Le plasma est éliminé. Le culot, redissous dans du NaCl est lavé 2 fois à 520 g pendant 10 minutes, à 4°C, dans une solution de NaCl à 0,9%. Le surnageant est éliminé. Ces lavages permettent de retirer le plasma résiduel ainsi que les éléments figurés du sang tels que les leucocytes et de récupérer le culot d'hématies.
- ✓ Hémolyse : le culot d'hématies est ensuite resuspendu dans 40 mL de tampon hémolyse contenant du NaCl 10 mM (0,58 g/l), (Prolabo, réf: 27810.364), de l'EDTA sel disodique 1mM, (0,37 g/l), (Sigma, réf: E-5134), et du TRIS 1mM, (0,12 g/l), (Sigma, réf: T-8524). Il est maintenu sous agitation (Rotator: 50 tours/min), à 4°C, pendant 30 minutes. L'échantillon est centrifugé à 20000g pendant 15 minutes, à 4°C.
- ✓ Lavage : le culot de membranes obtenu est ensuite soumis à une série de lavages à 4°C dans du tampon hémolyse, afin d'éliminer l'hémoglobine libérée au cours de

l'hémolyse. Le culot est suspendu dans 40 mL de tampon hémolyse. L'opération est répétée 4 à 5 fois jusqu'à obtention d'un culot de membranes parfaitement blanc.

- ✓ La suspension membranaire : le culot est ensuite désagrégé à l'aide d'une seringue (gauge 25 ou 26), puis resuspendu dans du tampon hémolyse (5 mL).
- ✓ 1 mL de suspension membranaire (dilué préalablement au 1/3 dans du tampon d'hémolyse) est prélevé pour le dosage des protéines. Après le dosage des protéines, 450 µg de protéines sont prélevés pour la mesure de fluidité et le reste de l'échantillon de membranes est fractionné en 2 pour les différents dosages (extraction des lipides, dosage des acides gras, dosage des phospholipides), puis conservé à -80°C.

### **Extraction des lipides totaux et des phospholipides**

- ✓ Les lipides totaux sont extraits par la méthode de Rose et Oklander (416), grâce à un mélange chloroforme/méthanol (11:7, v/v). La quantité de membranes à extraire correspond à une quantité de 500 µg de protéines.
- ✓ Les extraits membranaires sont décongelés à 37°C et vortexés. On ajoute 20 µg de lysophosphatidylcholine pour 100 µg de protéines comme standard interne. Les extraits membranaires sont suspendus dans du méthanol (11 ml) et agités latéralement pendant 1 heure.
- ✓ Le chloroforme est ensuite ajouté (7 ml) et le tube est de nouveau agité pendant 1 heure. Les extraits lipidiques sont ensuite filtrés sur une filtre hydrophobe (Whatman 1 ps) et évaporés sous flux d'azote.
- ✓ Ils sont ensuite dissous dans du chloroforme. Les phospholipides sont séparés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) (Gold HPLC System, Beckman, Palo Alto, CA, USA) (492). Les phospholipides sont analysés grâce à un détecteur à diffusion de lumière de type SEDERE (Orléans, France). La quantification est faite par intégration du pic en comparaison avec le pic d'une solution standard.

### **Dosage du cholestérol**

Le cholestérol est dosé par la méthode colorimétrique de Zlatkis et Zak (573).

*Principe* : On ajoute 2 ml d'une solution d'ophtaldéhyde diluée à 0,5 mg/ml d'acide acétique glacial, pour 250 µl d'extrait lipidique. La solution est mise à l'obscurité pendant 15 minutes. On ajoute ensuite une solution d'acide sulfurique. La solution est placée à l'obscurité pendant 15 minutes.

L'analyse est faite par spectrophotométrie à 560 nm. Une gamme étalon est effectuée préalablement avec du cholestérol (1mg/ml de chloroforme).

### 4.3. Etude à court terme de la variabilité de la FC et de la PA

L'analyse spectrale de la variabilité à court terme de la FC et de PA a été étudiée en décubitus respiration libre (Méthode identique à la deuxième étude).

## 5. Résultats

### 5.1. Comparaison des sujets obèses et témoins

Les deux groupes étaient d'âge comparable. L'insulinémie était significativement plus élevée dans le groupe de sujets obèses, de même que la composition membranaire en sphingomyéline.

	Témoins (n= 8)	Surpoids et obèses (n=13)	p
<b>Caractéristiques</b>			
Age	35,5 ± 3,4	37,1 ± 2,5	NS
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22,4 ± 2,2	31,6 ± 4,6	<0,0001
HOMA	1,21 ± 0,63	2,67 ± 0,55	0,052
Insulinémie	5,4 ± 2,1	10,3 ± 5,1	0,018
<b>Composition membranaire des globules rouges</b>			
SM (mg/g)	91,2 ± 15,0	108,5 ± 20,1	0,045
PC	247 ± 53	253 ± 30	NS
PS	117 ± 18	128 ± 30	NS
PI	52 ± 30	46 ± 15	NS
PE	275 ± 48	270 ± 41	NS
Cholestérol	237 ± 59	276 ± 66	NS
Chol/SM	2,8 ± 1,0	2,7 ± 0,8	NS
<b>Analyse spectrale (au repos)</b>			
MF FC (u.n.)	0,55 ± 0,09	0,46 ± 0,09	0,043
MF/HF de la FC	1,29 ± 0,48	0,91 ± 0,37	0,047
MF PAS (u.n.)	0,61 ± 0,07	0,60 ± 0,07	NS
MF PAD (u.n.)	0,64 ± 0,04	0,62 ± 0,07	NS

### 5.2. Analyse des corrélations

La sphingomyéline membranaire des globules rouges était fortement corrélée à l'insulinémie ( $r=0,71$  ;  $p= 0,0003$ ).

Les MF de la FC (u.n.) et le rapport MF/HF de la FC étaient négativement corrélées à l'insulinémie (figure 1) (respectivement  $r = -0,46$  ;  $p = 0,037$  et  $r = -0,43$ ;  $p = 0,058$ ). Ces

corrélations étaient significatives après ajustement sur l'âge. Les MF de la FC (u.n.) et le rapport MF/HF de la FC étaient également significativement et négativement corrélées à la concentration de sphingomyéline membranaire (figure 2) (respectivement  $r = -0,46$  ;  $p = 0,034$  et  $r = -0,45$  ;  $p = 0,039$ ) et positivement au rapport cholestérol/sphingomyéline (respectivement  $r = 0,44$  ;  $p = 0,047$  et  $r = 0,49$  ;  $p = 0,025$ ) et à aucun autre phospholipide membranaire. Les MF de la PAS et de la PAD n'étaient pas corrélées significativement à la SM.

**Figure 1:** Corrélation entre les MF (u.n.) (A) en décubitus respiration libre et l'insulinémie

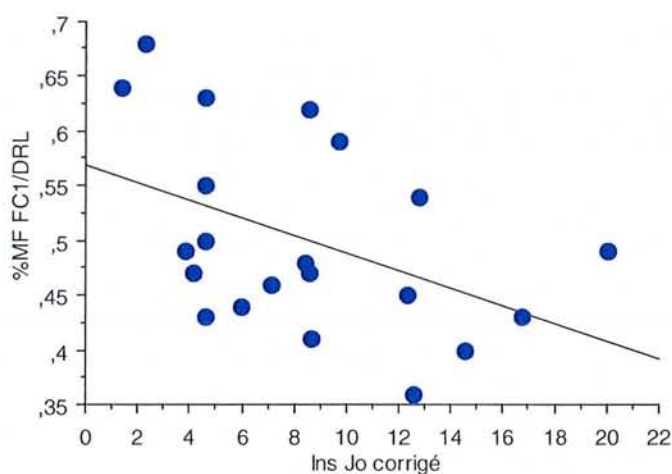
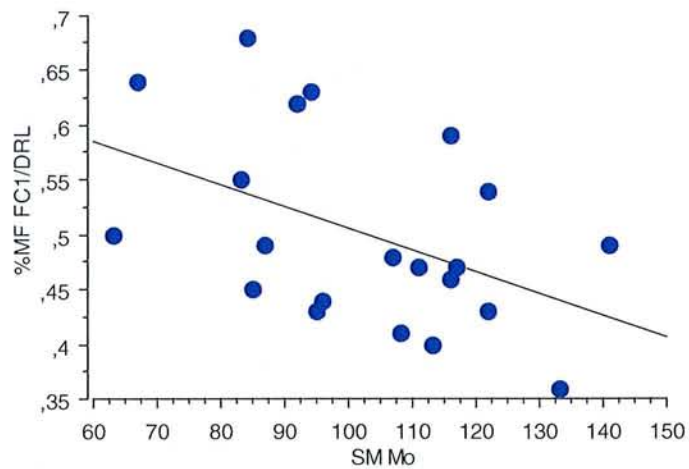
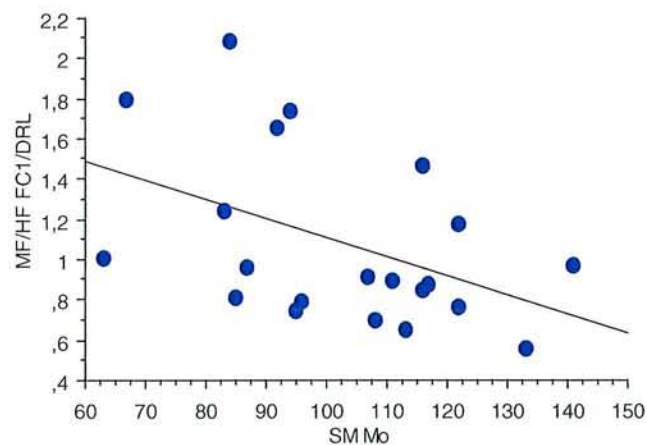


Figure 2 : Corrélation entre les MF (u.n.) (A) et du rapport MF/HF (B) en décubitus respiration libre et la sphingomyéline de la membrane des globules rouges

A



B



L'insulinémie et la sphingomyéline étant très corrélée, une régression multiple pas à pas a été faite. La sphingomyéline était le seul paramètre explicatif significatif des MF (u.n.) et du rapport MF/HF de ce modèle. La sphingomyéline peut expliquer 21% de la variance des MF (u.n.) et 20% de la variance du rapport MF/HF.

**Tableau 1:** Régression multiple pas à pas (n = 21)

Variables					
Dépendantes	Indépendantes	$\beta$	F	r <sup>2</sup>	p
MF (n.u.)	Sphingomyéline âge Insulinémie	$-1,99 \cdot 10^{-3} \pm 0,87 \cdot 10^{-3}$	5,2	0,21	0,034
MF/HF	Sphingomyéline âge Insulinémie	$-9,5 \cdot 10^{-3} \pm 4,3 \cdot 10^{-3}$	4,9	0,20	0,038

## 6. Discussion

Cette étude préliminaire montre que les MF au repos sont corrélées négativement à l'insulinémie et à la SM membranaire des globules rouges. La sphingomyéline et l'insulinémie sont fortement corrélée. Néanmoins l'analyse multivariée montre que la sphingomyéline membranaire pourrait expliquer 21% de la variance des MF de la FC au repos.

L'augmentation de la concentration en sphingomyéline membranaire des globules rouges chez les sujets obèses a été montré dans deux études antérieures de notre groupe (88;570). Les raisons de cette élévation ne sont pas connues. Elle pourrait être liée aux échanges avec les lipoprotéines plasmatiques. En effet la SM est également élevée dans les lipoprotéines VLDL et HDL de sujets diabétique de type 2 même après insulinothérapie intensive (29). L'augmentation de la sécrétion de cortisol pourrait également être en cause puisque la dexaméthazone augmente la SM membranaire des cellules 3T3-L1 et des leucocytes (343;344).

La sphingomyéline membranaire des globules rouges pourrait être le reflet de perturbation métaboliques et de la composition membranaire d'autres cellules.

La sphingomyéline membranaire pourrait jouer un rôle à la fois dans l'insulino-résistance et dans la résistance des tissus à l'action des catécholamines. La relation négative mise en évidence entre la concentration en sphingomyéline membranaire de l'érythrocyte et les MF est en faveur de cette hypothèse.

Cette hypothèse devra être confirmée *in vitro*, c'est l'objet de la deuxième partie de cette thèse.

## **2) TRAVAUX DE RECHERCHE DE LABORATOIRE**

**Effets membranaires et post- membranaires de la  
sphingomyéline sur l'action des catécholamines et sur  
l'expression des gènes**



## 1. Introduction générale

Le déséquilibre de la balance des lipides est d'abord le reflet du déséquilibre de la balance énergétique. Toutefois, une diminution de la lipolyse pourrait favoriser le stockage des graisses. En effet, des anomalies de la régulation de la lipolyse ont été mises en évidence au cours de la phase dynamique de prise de poids chez l'enfant (407) et au cours de l'obésité constituée chez l'adulte (105;551). De plus, la capacité de stockage des lipides dépend également de l'importance de la lipogénèse et de la possibilité de recruter de petits adipocytes. Par conséquent le stockage lipidique dans le tissu adipeux est le reflet à la fois de la sensibilité à l'insuline et de la sensibilité aux catécholamines.

Plusieurs mécanismes ont été évoqués pour expliquer la résistance du tissu adipeux aux catécholamines. Comme pour la résistance à l'insuline, une théorie membranaire a été proposée. Nous envisagerons le rôle de la sphingomyéline dans la première partie du travail de laboratoire.

L'augmentation de la concentration de sphingomyéline membranaire ou cellulaire pourrait également influencer l'expression de certains gènes et modifier le « phénotype » de l'adipocyte . C'est l'objet de la deuxième partie de ce travail de laboratoire.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. *Culture cellulaire*

#### 2.1.1. Lignée cellulaire

Les études ont été effectuées sur 2 lignées cellulaires d'adipocytes: les 3T3-F442A (provenant de l'Unité INSERM 317, Toulouse) et les 3T3-L1 (ATCC, USA). Ce sont des cellules adhérentes dérivant d'un tissu embryonnaire de souris qui évoluent vers un phénotype d'adipocyte, lorsque les conditions de culture sont appropriées.

### **2.1.2. Milieu de culture**

Les cellules sont cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant du glucose (4,5g/l), de la gentamycine (0,1g/l) et 10 % de sérum de veau « donateur » décomplémenté (SVD) (Life Technologies, Cergy Pontoise) pour la lignée 3T3-F442A ou 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) pour les 3T3-L1.

### **2.1.3. Entretien de la lignée cellulaire**

La lignée cellulaire est cultivée dans des flacons plastiques de 25 cm<sup>2</sup> (COSTAR, Cambridge, GB) contenant 10 ml de milieu de culture dans un incubateur IG 150 (JOUAN, Saint Nazaire, France) à 37°C, dans une atmosphère saturée en humidité et enrichie à 7% de CO<sub>2</sub> pour les 3T3-F442A et 5% pour les 3T3-L1.

Lorsque les cellules sont en nombre suffisant et avant qu'elles ne soient à confluence, elles sont repiquées pour un nouveau passage. Le milieu est enlevé et les cellules sont détachées par de la trypsine filtrée (2ml) (SIGMA, solution 10X contenant 25 g de trypsine de porc/l dans 0,9% de NaCl) préalablement mise à température ambiante.

Après action de la trypsine pendant 1 à 2 minutes, celle-ci est éliminée et les cellules sont détachées de la boîte mécaniquement puis remises en suspension dans 10 ml du milieu de culture contenant du SVF, ce qui permet d'arrêter l'action de la trypsine résiduelle. Après une centrifugation à 300g pendant 10 minutes (Centrifugeuse JOUAN, Saint Herblain, France), le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans 10 ml de milieu. Le nombre de cellules est déterminé sur une lame de Malassez. 100 000 cellules sontensemencées dans 10 ml de DMEM avec sérum de veau Donor (SVD) (lignée 3T3-F442A) ou de sérum de veau fœtal (SVF) pour les 3T3-L1, dans un flacon de 25 cm<sup>2</sup>. Le milieu de culture est remplacé toutes les 48 heures.

### **2.1.4. Viabilité cellulaire**

La viabilité cellulaire est déterminée grâce au du bleu Trypan (Sigma, St-Quentin Fallavier, France). A un volume de bleu Trypan 0,2 % dilué 10 fois dans un tampon PBS avec glucose (NaCl 135 mM, Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> 6 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, D-glucose 5 mM, pH 7,4) est ajouté un volume de suspension cellulaire.

Le bleu Trypan pénètre dans les cellules mortes, se fixe sur l'ADN et les colore en bleu foncé.

La viabilité cellulaire est définie par le pourcentage de cellules vivantes par rapport au nombre total de cellules comptées sur une lame de Malassez

### **2.1.5. Différenciation adipocytaire**

La différenciation est débutée 24 heures après la confluence. La méthode utilisée est différente pour les deux lignées.

#### *Pour la lignée 3T3-L1*

Le même milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal est enrichi en méthylisobutylxanthine (0,5 mM), dexaméthasone (0,25  $\mu$ M) et insuline (10  $\mu$ g/ml) pendant 48 heures. A 48 heures, le milieu est changé et remplacé par du milieu contenant 10% de sérum de veau foetal et de l'insuline (10  $\mu$ g/ml). L'insuline est enlevée 24 heures avant le test de lipolyse. Le milieu est changé tous les deux jours.

#### *Pour la lignée 3T3-F442A*

Le milieu d'entretien est remplacé par du milieu DMEM contenant 4,5g/l de glucose et 10 % de sérum de veau foetal (SVF) (Eurobio, Les Ullis). On ajoute de l'insuline à la concentration de 1 $\mu$ g/ml (430). Le milieu est changé tous les deux jours.

## **2.2. Analyse de la composition membranaire des adipocytes 3T3-L1**

### ***Extraction des membranes***

Après lavage des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup>, le tapis cellulaire est lavé à deux reprises avec du PBS froid (136 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KCl, 1,46 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 5,5 mM-glucose, pH 7,4). Les cellules sont récupérées dans 5 ml de PBS après grattage du tapis cellulaire. La suspension est centrifugée à 300 x g pendant 10 minutes et le culot est suspendu dans 6 ml de tampon (1 mM d'EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1mM de Phényl méthyl sulfonyl fluoride (PMSF, inhibiteur de protéase, pH 7,4) à 4°C. Les cellules sont ensuite éclatées grâce à une seringue munie d'une aiguille de 26 G, par une succession d'aspirations et d'éjections (à dix reprises), permettant d'éclater 95% des cellules. On ajuste le volume à 18 ml avec le même tampon.

Après une centrifugation à 8500 X g pendant 10 minutes à 4°C, on récupère le surnageant, qui est ensuite centrifugé à 40 000 X g, pendant 30 minutes à 4°C (489). Les

membranes plasmiques forment le culot, qui est suspendu dans 1 ml de tampon EDTA 1 mM, Tris-HCl 1 mM, NaCl 10 mM, pH 7,4.

Cinquante  $\mu$ l sont aliquotés pour le dosage des protéines selon la méthode de Lowry *et al.* (281). 950  $\mu$ l sont conservés à -80°C pour le dosage ultérieur des phospholipides et du cholestérol.

### ***Extraction des lipides membranaires***

Les lipides totaux sont extraits par la méthode de Rose et Oklander (416), grâce à un mélange chloroforme/méthanol (11:7, v/v). La quantité de membranes à extraire correspond à une quantité de 500  $\mu$ g de protéines.

Les extraits membranaires sont décongelés à 37°C et vortexés. On ajoute 20  $\mu$ g de lysophosphatidylcholine pour 100  $\mu$ g de protéines comme standard interne. Les extraits membranaires sont suspendus dans du méthanol (11ml) et agités latéralement pendant 1 heure. Le chloroforme est ensuite ajouté (7 ml) et le tube est de nouveau agité pendant 1 heure. Les extraits lipidiques sont ensuite filtrés sur une filtre hydrophobe (Whatman 1 ps) et évaporés sous flux d'azote. Les extraits lipidiques sont ensuite dissous dans du chloroforme. Les phospholipides sont séparés par HPLC (Gold HPLC System, Beckman, Palo Alto, CA, USA) (492). Les phospholipides sont détectés grâce à un détecteur à diffusion de lumière de type SEDERE (Orléans, France). La quantification est faite par intégration du pic en comparaison avec le pic d'une solution standard.

Le cholestérol est dosé par la méthode colorimétrique de Zlatkis et Zak (573). On ajoute 2 ml d'une solution d'ophtaldéhyde diluée à 0,5 mg/ml d'acide acétique glacial, pour 250  $\mu$ l d'extrait lipidique. La solution est mise à l'obscurité pendant 15 minutes. On ajoute ensuite une solution d'acide sulfurique. La solution est placée à l'obscurité pendant 15 minutes. L'analyse est faite par spectrophotométrie à 560 nm. Une gamme étalon est effectuée préalablement avec du cholestérol (1mg/ml de chloroforme).

## **2.3. Mesure de la fluidité membranaire par polarisation de fluorescence**

### **Principe**

La membrane est une structure fluide constituée de deux feuillets de phospholipides. Les protéines flottent au sein de la membrane. Le cholestérol occupe des espaces entre les chaînes carbonées des phospholipides. Ces différents constituants sont mobiles et peuvent diffuser latéralement ou présenter des mouvements de rotation autour d'un axe perpendiculaire au plan de la membrane. Les mouvements de « flip-flop » correspondent à des mouvements de bascule d'une monocouche à l'autre. La facilité de mouvements des molécules dans ce système est décrite par les coefficients de diffusion qui définissent la fluidité membranaire. Ils dépendent des mouvements intrinsèques de la molécule et de sa position.

Les mouvements de diffusion et de rotation dépendent de l'organisation des molécules de la membrane, de leur nature, et de leur composition en acides gras.

Les sondes fluorescentes incorporées dans la structure membranaire ont des mouvements de rotation. La polarisation de fluorescence permet de mesurer les facultés de rotation de la sonde au sein des membranes biologiques.

### **Mesure**

L'anisotropie de la fluorescence permet une approche semi-quantitative de la fluidité membranaire. Elle reflète la cohésion de l'environnement immédiat des sondes fluorescentes. Excités par une lumière polarisée verticalement, l'absorption par le fluorochrome sera :

- maximale lorsque la direction du champs électrique de l'onde incidente et celle du moment de transition d'absorption seront parallèles,
- nulle lorsqu'elles sont perpendiculaires
- proportionnelle au  $\cos^2\theta$ , lorsqu'elles font entre elles un angle  $\theta$ .

Les molécules orientées dans le bon axe sont excitées de façon préférentielle. La fluorescence est émise dans la direction du moment de transition des fluorochromes. La conjonction de ces deux phénomènes implique que la fluorescence émise tend à avoir la même direction de polarisation que la lumière incidente. Si  $Ox$  est la direction

de polarisation de la lumière incidente, la fluorescence émise a une composante d'intensité  $I_{\parallel}$  le long de  $Ox$  et des composantes d'intensité  $I_{\perp}$  perpendiculaire le long des directions orthogonales  $Oy$  et  $Oz$ .

On définit l'anisotropie de fluorescence  $\langle r \rangle$  comme étant :  $\langle r \rangle = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2 I_{\perp})$

Les sondes fluorescentes avant d'émettre leur fluorescence auront une faculté de rotation qui va dépendre de la cohésion du milieu. Plus l'environnement est fluide, plus les sondes ont la faculté de rotation sera dépolarisée et plus la composante  $I_{\perp}$  de la fluorescence sera élevée entraînant une valeur plus faible de l'anisotropie de la fluorescence émise.

*L'anisotropie est donc en relation inverse avec la fluidité membranaire.*

## Sondes utilisées

Deux sondes fluorescentes polyéniques sont utilisées :

- 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène : DPH
- 1-[4-(triméthylamino)phényl]-6-phénylhexatriène: TMA-DPH

### ✓ 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH)

Le DPH s'insère dans les parties profondes de la membrane et pénètre dans le cytoplasme. Elle a une forme de bâtonnet. Cette sonde n'est fluorescente que lorsqu'elle est dans un milieu hydrophobe. Le DPH intègre facilement les membranes, parallèlement aux chaînes acyles et au niveau des régions profondes de la couche lipidique. Cette sonde donne une information globale sur les compartiments lipidiques de la membrane plasmique et des éléments intracellulaires (64;181).

### ✓ 1-[4-(triméthylamino)phényl]-6-phénylhexatriène (TMA-DPH)

Le TMA-DPH est plus sélectif des membranes que le DPH. Il se fixe au niveau des têtes polaires négativement chargées des phospholipides par l'intermédiaire de son groupement triméthylammonium chargé positivement (82;243). La partie DPH de la molécule est intercalée dans les régions supérieures des chaînes acyles. Les propriétés photophysiques du TMA-DPH sont similaires à celles du DPH.

## Protocole

- ✓ Les adipocytes sont mis en contact avec la sphingomyéline ou avec la sphingomyélinase pendant un temps donné. Après trypsinisation, la suspension cellulaire est centrifugée et le culot de cellules est remis en suspension dans du KRH sans BSA. La concentration cellulaire est ajustée à 250 000 cellules par ml de KRH.
- ✓ Marquage de la suspension cellulaire avec les sondes fluorescentes :
  - La solution mère de DPH est dissoute dans du tétrahydrofurane (THF) et le TMA-DPH dans du diméthylformamide (DMF) à la concentration de  $2 \cdot 10^{-3} M$ . Les solutions sont stockées à l'obscurité à  $4^{\circ}C$ .
  - Le marquage est réalisé grâce à  $0,5 \mu l$  de solution de marqueur ajouté par ml de suspension cellulaire. La dilution finale du marqueur est égale à  $10^{-6} M$ .
  - L'incorporation des sondes dans les cellules est effectuée à l'obscurité.
  - Les mesures d'anisotropie sont effectuées immédiatement après l'incorporation des sondes dans la suspension cellulaire.
  - Dix mesures sont réalisées à l'intervalle de 10 secondes.
  - Pour simplifier l'expression des résultats, une moyenne des valeurs est faite sur 2 minutes: entre 0 et 2 minutes et entre 2 et 4 minutes. Un « blanc » est mesuré dans cette série d'expériences.

### Détermination de l'anisotropie de fluorescence

- ✓ Les mesures sont effectuées sur un appareil de polarisation de fluorescence en excitation continue, (Fluofluidimètre, REGULEST, Florance, France).
- ✓ La longueur d'onde d'excitation (365 nm) est sélectionnée par un filtre interférentiel.
- ✓ L'émission est mesurée à travers un filtre à bande passante centré sur 420 nm pour le DPH et le TMA-DPH.

L'anisotropie de fluorescence est déterminée à partir de la relation suivante :

$\langle r \rangle = (I_{f\parallel} - I_{b\parallel}) - G(I_{f\perp} + 2 I_{b\perp}) / (I_{f\parallel} - I_{b\parallel}) + 2G(I_{f\perp} - I_{b\perp})$  où G est un facteur de correction pour les inégalités du format de T.

## **2.4. Dosage du glycérol dans le surnageant de cultures cellulaires**

Les dosages du glycérol ont été effectués dans le laboratoire de Biochimie, Pr Nicolas, CHU de Nancy.

### **Principe**

Le dosage du glycérol est réalisé par dosage enzymatique (Triglycérides GPO Trinder Sigma, Réf 337-40A 20 x 40 ml), dont le principe est le suivant:

- ✓ Le glycérol est phosphorylé en présence d'ATP pour former du glycérol-1-phosphate (G-1-P) et de l'ADP, la réaction est catalysée par la glycérokinase.
- ✓ Le G-1-P est ensuite oxydé en dihydroxyacétone phosphate avec formation de  $H_2O_2$ .
- ✓ Une peroxydase catalyse enfin une réaction faisant intervenir l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) et de l'amino-4-antipyrine. Le produit de la réaction est une quinonéimine présentant une absorption maximale à 540 nm. L'augmentation d'absorbance à 540 nm est directement proportionnelle à la concentration du glycérol dans l'échantillon.

### **Appareil**

- ✓ La technique a été automatisée sur analyseur multiparamétrique ELAN-IC (Merck, Fontenay sous Bois, puis AU 400, Olympus, Rungis, France).
- ✓ Le calibrant utilisé est le Précimat Glycérol® (Réf 10166588, Roche Diagnostics, Meylan, France) dilué 1/20 dans de l'eau physiologique, soit une concentration de glycérol de 10,5 mg/l.
- ✓ Le contrôle : calibrant Triglycérides GPO (Réf 87319, Biolabo SA, Fismes, France) dilué 1/20 dans de l'eau physiologique : soit une concentration de glycérol de 10,5 mg/l.

La technique a été sensibilisée pour le dosage de faibles quantités de glycérol présentes dans le surnageant de cultures cellulaires par l'augmentation de la prise d'essai (de 40  $\mu$ l au lieu de 10  $\mu$ l).

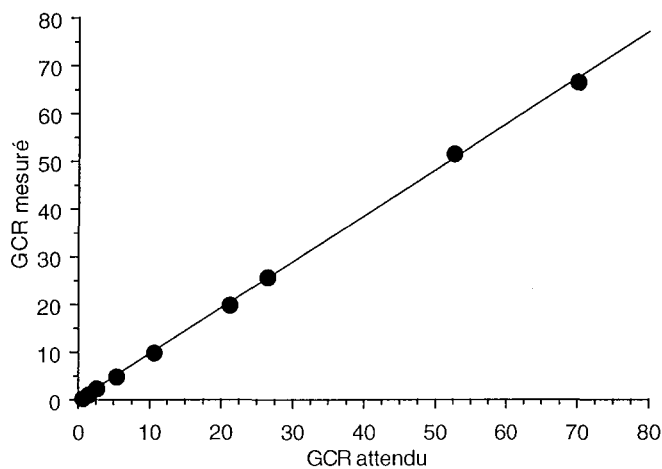
Le milieu de culture cellulaire a été choisi afin de ne pas donner d'interférence avec la technique utilisée et de ne pas contenir de glycérol libre (Milieu DMEM sans phénol, indicateur de pH).

### **Répétabilité et reproductibilité**



- ✓ La répétabilité déterminée à une concentration de 3,31 mg/l est de 0,59% (Calibrant dilué 1/60 dans de l'eau physiologique, n=5) et de 0,50% à une concentration de 7,23 mg/l (pool de surnageant de culture cellulaire, n=10).
- ✓ La reproductibilité à une concentration de 10,5 mg/l est de 2,5% (Contrôle dilué 1/20 dans de l'eau physiologique, n=20).

La technique est linéaire jusqu'à des concentrations de 70 mg/l. L'étude a été obtenue en diluant le calibrant dans de l'eau physiologique. La droite de régression obtenue entre les concentrations attendues (x) et mesurées (y) est  $Y=0,053 + 0,964X$ ,  $R^2 = 1$ .



## La limite de détection

La limite de détection obtenue par mesure répétée d'eau physiologique (n=10,  $\alpha=1\%$ ,  $\beta=5\%$ ) est de 0,15 mg/l et de 0,10 mg/l par dilutions successives du calibrant dans de l'eau physiologique.

## 2.5. Dosage des ARNm en RT-PCR

### 2.5.1. Extraction des ARN

L'extraction des ARN est réalisée grâce à une solution de Trizol selon les instructions du fabricant (Gibco, Cergy Pontoise, France).

- ✓ Après 24 heures d'incubation avec la sphingomyéline ou de l'éthanol, le milieu de culture est enlevé et les cellules lavées avec du tampon phosphate-salin froid (PBS).
- ✓ Un volume de trizol : 5ml par boîte de 8 cm de diamètre est ajouté dans chaque boîte

- ✓ Le tapis cellulaire est gratté et homogénéisé dans le trizol
- ✓ L'homogénat est centrifugé à 12000g pendant 10 minutes à 4 °C.
- ✓ Le surnageant est récupéré et laissé à température ambiante pendant 5 minutes
- ✓ On ajoute 0,2 ml de chloroforme / ml de trizol
- ✓ On agite vigoureusement le tube pendant 15 secondes
- ✓ Le tube est laissé à température ambiante pendant 2-3 minutes
- ✓ Une centrifugation est faite à 12000g pendant 15 minutes
- ✓ La phase supérieure (environ 60% du volume initial de trizol) est récupérée
- ✓ La précipitation des ARN est effectuée en ajoutant 0,5 ml d'isopropyl alcool/ ml de trizol et laissée 10 minutes à température ambiante
- ✓ Une centrifugation à 12000g pendant 10 minutes à 4 °C permet de récupérer le culot qui contient les ARN.
- ✓ Le culot est lavé dans une solution d'alcool à 70° (1ml/ml de trizol) suivi d'une centrifugation à 7500g pendant 5 minutes à 4 °C.
- ✓ Le culot est séché à l'air

### **2.5.2. Dosage des ARN et vérification de l'intégrité de l'ARN**

La concentration d'ARN est mesurée au spectrophotomètre à 260 nm.

Une unité de densité optique représente 40 µg d'ARN.

*Le rapport de la densité optique 260/280* est un indicateur de pureté des ARN. Dans les expériences menées, ce rapport était compris entre 1,6 et 2.

*Une électrophorèse sur gel d'agarose* est réalisée pour vérifier l'intégrité des ARNm. Un gel d'agarose de 0,8% (p/v) est préparé dans un tampon TBE 1X (Dilution du tampon TBE 10X (Laboratoire Central de Biochimie A) constitué de 1M Tris-base (121g) 1M d'acide mM EDTA (Na<sub>2</sub>) (7,44g) dans 1 litre d'eau). Une solution de bromure d'éthidium (5µl) (BET : solution mère 10 mg/ml) sont ajoutés dans un volume final de 100 ml de tampon (concentration : 0,5 µg/ml de BET). L'équivalent de 1 µg d'ARN total est déposé dilué dans 5 µl de tampon bleu. L'électrophorèse dure 30 min à 80 Volts. Les ARN sont examinés sur une table lumineuse (TFL-35M, Appligène). Le BET s'intercale entre les bases de l'ARN et le rend fluorescent. Deux bandes sont visibles correspondant à l'ARN 28S et 18S. En cas de contamination par de l'ADN génomique, celui-ci ne migre pas et est donc visible dans le puits.

### 2.5.3. La rétroconversion

Pour la transcription reverse, nous avons utilisé les réactifs de INVITROGEN (Cergy Pontoise, France) :

- ✓ les amorces aléatoires (random primers) à une concentration de 0,09 DO<sub>260</sub> unités/ µl dans 3mM Tris-HCL (pH 7) et 0,2 mM EDTA.
- ✓ Reverse transcriptase : superscript™ II Rnase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase, solution à 200 U/ µl.
- ✓ Tampon 5X ou 5X First-strand Buffer (Y00146) (250 mM Tris-HCL (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)
- ✓ DTT ou DiThioThréitol (Y00147) : solution mère à 0,1M.
- ✓ 2'-déoxynucléoside 5'-triphosphate ou dNTP set, PCR Grade comportant 4 nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Chaque nucléotide est à la concentration de 100 mM.

Pour 2 µg d'ARN dilués dans 11 µl d'eau stérile, on ajoute 1 µl d'amorces aléatoires, 1 µl de reverse transcriptase, 4 µl de tampon 5X, 2 µl de DTT, 1 µl de dNTP.

- ✓ On ajoute l'amorce aléatoire.
- ✓ Les tubes sont placés dans l'iCycler (BIO-RAD) 10 min à 70 °C (appariement des amorces) puis à 4°C pendant 10 min (suppression des structures secondaires de l'ARN).
- ✓ Un mélange de tampon 5X, DTT, dNTP et de l'enzyme est ensuite ajouté dans chaque tube et homogénéisé.

### 2.5.4. La polymerase chain reaction : PCR semi quantitative

La *PCR semi-quantitative* consiste à quantifier l'ARN du gène étudié en le comparant à un standard. Dans notre expérience, nous avons utilisé la β-actine ou la G3PDH.

La PCR (polymerase Chain Reaction) a été faite dans un volume final de 20 µl incluant de la Taq polymérase 0,25 µl (1,25 U), 2 µl de tampon PCR et 0,5 µl de mélange des quatre déoxynucleotides triphosphates (200 µM de chaque), 2 µl de chaque amorce (20 pM) et 2 µl d'ADN complémentaire (25 ng). Le programme d'amplification comportait 25 à 30 cycles en fonction du gène étudié, de façon à être dans des conditions non saturantes.

- ✓ La dénaturation était faite à 92°C pendant 1 minute.

- ✓ L'appariement des amorces à l'ADN matriciel est effectué entre 55°C et 60°C pendant 1 minute
- ✓ L'extension de l'amorce et recopiage de l'ADN matriciel à 72°C pendant 1 minute. La phase d'extension finale durait 10 minutes à 72°C.
- ✓ Des amorces sens et antisens ont été choisies à partir de banque de données (GenBank Database Document Reader).

Les amorces sens et antisens sont les suivantes:

*Pour PPAR:*

5'-AAA CAT ATC ACC CCC CTG CA-3' et 5'-GCA GCA GGT TGT CTT GGA TG-3'

*Pour la  $\beta$ -actine:*

5'-CCG TGA AAA GAT GAC CCA GA-3' et 5'-GCA CGA TTT CCC TCT CAG CT-3'

*Pour le récepteur  $\beta$ 1:*

5'-TCG TGT GCA CAG TGT GGG CC-3' et 5'-AGG AAG CGG CGC TCG CAG CTG TCG-3'

*Pour le récepteur  $\beta$ 2:*

5'-GCC TGC TGA CCA AGA ATA AGG CC-3' et 5'-CCC ATC CTG CTC CAC CT-3'

*Pour le récepteur  $\beta$ 3:*

5'-ATG GCT CCG TGG CCT CAC-3' et 5'-CCC AAC GGC CAG TGG CCA GTC AGC G-3'

- ✓ 10  $\mu$ l de produit de PCR sont séparés sur un gel d'agarose 2% dans du TBE 1X . Du BET est ajouté dans le gel.
- ✓ La densité optique des bandes est analysée à l'aide GelDoc2000.
- ✓ Le MW-1700-03 SmartLadder (EUROGENTEC) est utilisé comme standard de taille.

### **2.5.5. La PCR en temps réel**

Les extractions d'ARN et la transcription reverse ont été effectuées au laboratoire (EA 34 36) de Nancy et la PCR en temps réel a été effectuée par S. Lelay, sous la direction de I. Dugai INSERM U465.

La PCR en temps réel a été réalisée à partir de 50 ng de produit de Retro Transcription, avec 200nM d'amorces sens et antisens dans un volume final de 25  $\mu$ l et

l'utilisation de réactifs de "Sybr Green PCR core" et à un appareil de détection "ABI PRISM 7700 séquence détection system instrument" (PE Applied Biosystems).

La quantification a été déterminée par le nombre de cycles permettant d'atteindre un seuil de fluorescence. Les valeurs sont exprimées en valeurs relatives par rapport au témoin pour chaque gène. Après ajustement sur l'ARN 18s ou sur la G3PDH, on détermine le nombre de doublements d'amplification par rapport au témoin qui correspond à une puissance de 2 de la différence entre le nombre de cycles de l'échantillon traité  $C_T$  et le témoin selon la formule  $2^{-C_T}$  (378). Une valeur supérieure à 2 est considérée comme significative. L'expression de la G3PDH a été utilisée comme standard entre les différentes manipulations.

## **2.6. Protocole**

### **2.6.1. Sphingomyéline**

On prépare une solution mère de sphingomyéline à 3 mM (2,25 mg/ml d'éthanol). Le mélange est chauffé pendant 10 minutes à 37°C. On ajoute ensuite 5µl de la solution mère par ml de milieu DMEM comportant 3,5% d'albumine bovine, soit une concentration finale dans le milieu de 15 µM. La solution obtenue est mélangée doucement et remise à 37°C pendant 10 minutes.

On utilise plusieurs sources de sphingomyéline : de la sphingomyéline provenant d'œuf de poule (Sigma : S-0756), ou provenant de cerveau de bœuf (Sigma : S-7004) ou provenant d'érythrocytes de bœuf (Sigma : S-1131)).

La sphingomyéline d'œuf de poule contient 61% d'acide palmitique (SM-AP), 13% d'acide stéarique, 26% d'acides gras à chaînes courtes ( $\leq 14C$ ). Cette sphingomyéline ne contient que des acides gras saturés

La sphingomyéline de cerveau de bœuf contient 34% d'acide stéarique (SM-AS), 22% d'acide nervonique et 33% d'acides gras à chaînes courtes ( $\leq 14C$ ).

La sphingomyéline d'érythrocytes de bœuf contient environ 30 % d'acide lignocérique (SM-AL), 25% d'acides gras insaturés, 33% d'acides gras à chaînes courtes.

### 2.6.2. Isoprénaline

Une solution mère de  $10^{-2}$  M d'isoprénaline (Sigma) (2,47 mg/ml) est préparée dans du milieu DMEM contenant 3,5% d'albumine issue de sérum bovin (BSA).

On effectue des dilutions pour obtenir des concentrations de  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M.

### 2.6.3. Forskoline

Après dilution dans une solution d'alcool, une solution mère de  $10^{-2}$  M est préparée dans du milieu DMEM contenant 3,5% de BSA. On effectue ensuite des dilutions pour obtenir des concentrations de  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M.

### 2.6.4. Méthylisobutylxanthine (MIX)

Après dilution dans du KOH, une solution mère de MIX (Sigma)  $10^{-2}$  M est préparée dans du milieu DMEM complété à 3,5% de BSA. Des concentrations de  $10^{-3}$  M à  $10^{-9}$  M sont préparées.

### 2.6.5. Sphingomyélinase

La sphingomyélinase de *Bacillus cereus* (Sigma) (sphingomyélinase dépendante du magnésium) a été ajoutée dans le milieu après dilution, à la concentration finale de 1 mU/ml et laissée dans le milieu pendant le temps du test.

Le milieu de culture étant pauvre en magnésium, il a été enrichi en magnésium à la concentration de 5 mM soit 1,33 g/l.

### 2.6.6. Céramides

Les céramides de cerveau de bœuf sont dissous dans un mélange d'alcool absolu et de dodécane (éthanol:dodécane = 49:1, v/v) à 37°C, à la concentration finale de 0,75  $\mu$ M

dans un mélange d'éthanol:dodécane [1/200, (v/v)]. Le milieu est homogénéisé et incubé à 37°C pendant 10 minutes.

### **2.6.7. Méthyl-bêta-Cyclodextrine**

La  $\beta$ -cyclodextrine (Sigma ) est diluée à la concentration finale de 5 mM. Elle est ajoutée dans le milieu 30 minutes avant le test de lipolyse.

### **2.6.8. Coloration à l'huile rouge**

L'huile rouge (SIGMA, O-0625) marquent les gouttelettes lipidiques des adipocytes. La poudre est dissoute dans 20 ml d'isopropanol jusqu'à saturation. Après agitation pendant 1 heure, la solution est filtrée sur un pré-filtre (Millipore Hip 66883A). Cette préparation est mélangée (2/3, v/v) à une solution de dextrine (SIGMA, D-2006) diluée à 1 % dans de l'eau distillée à 45°C et agitée pendant 1 heure. Le mélange doit être filtré avant utilisation.

Les cellules sont lavées avec du tampon PBS (136 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KCl, 1,46 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 5,5 mM D-glucose, pH 7,4) froid puis fixées avec du formaldéhyde froid à 3,7% préalablement dilué dans du PBS pendant 45 minutes. Le tapis cellulaire est lavé avec de l'eau distillée à 4°C puis avec de l'éthanol froid à 70%, à deux reprises pendant 1 minute.

Le marquage avec la solution finale d'huile rouge se fait pendant 7 min à l'obscurité (2,5 ml de la solution mère pour une boîte de 25 cm<sup>2</sup>). Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec de l'éthanol 70% à 4°C, suivie par un lavage avec de l'eau distillée et un séchage du tapis cellulaire à l'obscurité. Les adipocytes sont ensuite examinées avec un microscope (Axioskop, Zeiss) couplé à une caméra (Hamamatsu Photonics C5310, Japan et un logiciel Sigma Scan Pro software) pour la capture et le traitement des images.

Le tapis cellulaire est remis en suspension dans de l'isopropanol pendant 20 minutes. Le mélange est homogénéisé et sa densité optique est mesurée à 540 nm.

### **2.6.9. Déroulement du test**

L'ensemencement des cellules est fait sur des plaques de 6 puits de 35 mm à raison de 40000 cellules par puits.

Le test de lipolyse est effectué 10 à 12 jours après le début de la différenciation.

- La sphingomyéline dissoute dans de l'éthanol (3mM) est ajoutée à 1ml de DMEM additionnée de 3,5% de BSA. Une quantité identique d'éthanol est ajoutée dans les puits témoins. La sphingomyéline a été ajoutée, 30 minutes, 2 heures ou 24 heures avant le test de lipolyse. *La sphingomyéline ou l'éthanol sont laissés dans le milieu avant et pendant le test de lipolyse.*
- L'isoprénaline est ensuite ajoutée dans le milieu présent dans les puits de façon à obtenir les concentrations finales de 0 à  $10^{-5}$  M ( $10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M). Le milieu est enlevé au bout de 90 minutes d'action de l'isoprénaline pour doser le glycérol.

#### **2.6.10. Expression des résultats**

Pour comparer les différentes manipulations, nous avons exprimé les résultats de chaque manipulation en pourcentage de la valeur maximale obtenue lors du test (valeur du plateau).

#### **2.6.11. Statistiques**

Chaque expérience a été réalisée au minimum sur trois cultures indépendantes. Les résultats rapportés sont des moyennes  $\pm$  S.E.M.

La comparaison des courbes dose-réponse et des cinétiques ont été faites par une analyse de variance à mesures répétées, suivi d'un test a posteriori de Fisher (test ajusté). Un test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé dans les autres cas. La valeur seuil de signification est  $p < 0,05$ .



# **A : Evaluation des effets membranaires de la sphingomyéline sur la lipolyse : Effets de l'enrichissement ou de la déplétion**

## **1. Hypothèses**

L'adipocyte est une cellule particulièrement sensible à l'action des catécholamines. La sphingomyéline (SM) pourrait modifier l'action des catécholamines par plusieurs mécanismes : 1) La composition membranaire en sphingomyéline et en cholestérol pourrait influencer l'action des catécholamines en modifiant ses propriétés physiques ; 2) En jouant sur les interactions des molécules intervenant dans la chaîne de transduction du message au sein de la membrane ; 3) Les métabolites de la sphingomyéline pourraient intervenir dans la régulation de la lipolyse (322) ; 4) Enfin, un effet sur l'expression des gènes impliqués dans la lipolyse peut également être envisagé.

La composition de la membrane en sphingomyéline est également susceptible d'influencer l'homéostasie du cholestérol cellulaire, en raison des interactions fortes qui existent entre ces deux molécules.

La sphingomyéline pourrait donc influencer la régulation de la lipolyse en agissant sur la chaîne de transduction du message au sein de la membrane ou sur les étapes post-membranaires.

## **2. Objectifs**

Les objectifs de cette étude sont de vérifier sur un modèle cellulaire *in vitro* que des variations de composition membranaire en sphingomyéline peuvent modifier la sensibilité des cellules adipeuses aux catécholamines et d'analyser les mécanismes en cause. La fluidité de la membrane sera également étudiée.

Le modèle cellulaire choisi est l'adipocyte en culture de la lignée 3T3-L1 et 3T3-F442A.

Les modifications de composition membranaire en sphingomyéline ont été réalisées

1) En enrichissant la membrane en SM, en ajoutant dans le milieu de la SM sous forme aqueuse après dissolution dans de l'alcool. Différents temps d'incubation ont été analysés.

2) Une deuxième approche a été de soustraire de la sphingomyéline de la membrane en faisant agir une sphingomyélinase exogène.

### **3. Résultats**

#### **3.1. Effets de l'enrichissement membranaire en sphingomyéline**

##### **3.1.1. Effets sur la lipolyse basale**

L'enrichissement de la membrane en SM pourrait altérer la diffusion du glycérol à travers la membrane.

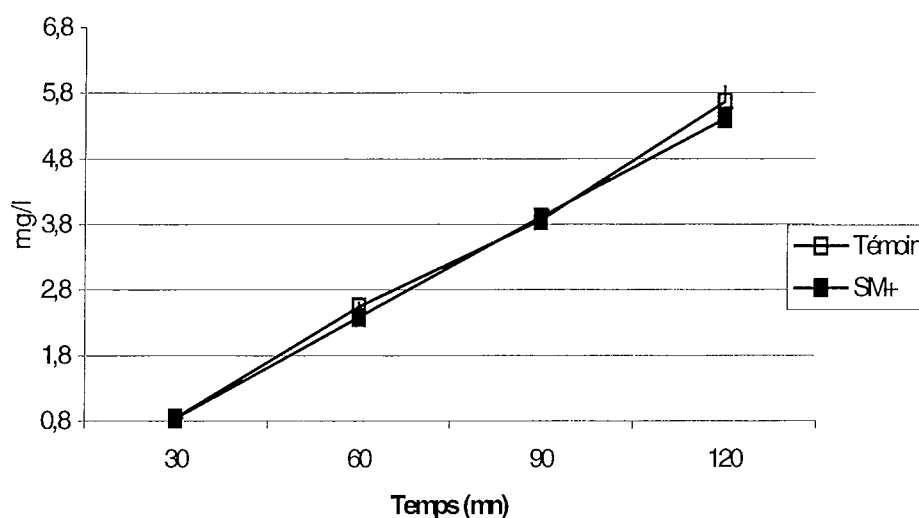
- **Méthodes**

Dans un premier temps, nous avons donc déterminé l'effet de la sphingomyéline sur la libération du glycérol basal, en analysant la cinétique des concentrations en glycérol dans le surnageant de culture d'adipocytes enrichi ou non en sphingomyéline (3mM). Les puits témoins étaient traités par la même dose d'éthanol. Les adipocytes étaient en fin de différenciation (10 à 12 jours après le début de la différenciation). Un échantillon de 100 µl de milieu (sur 2 ml) a été prélevé à chaque temps (toutes les 30 minutes) (figure 2). Un facteur de correction a été apporté pour tenir compte de la diminution du volume.

- **Résultats**

Nous n'avons pas observé d'effet de la SM sur la lipolyse basale au bout de 2 heures d'incubation (pour la SM-AP:  $5,67 \pm 0,22$  mg/l vs  $5,41 \pm 0,16$  mg/l,  $p=NS$ ).

**Figure 1** : Cinétique des concentrations en glycérol dans le milieu de culture d'adipocytes après enrichissement du milieu en sphingomyéline d'oeuf (SM-AP). Moyennes  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes.



### 3.1.2. Effet membranaire de la sphingomyéline d'œuf (SM-AP) sur la régulation de la lipolyse stimulée : effets du temps de traitement

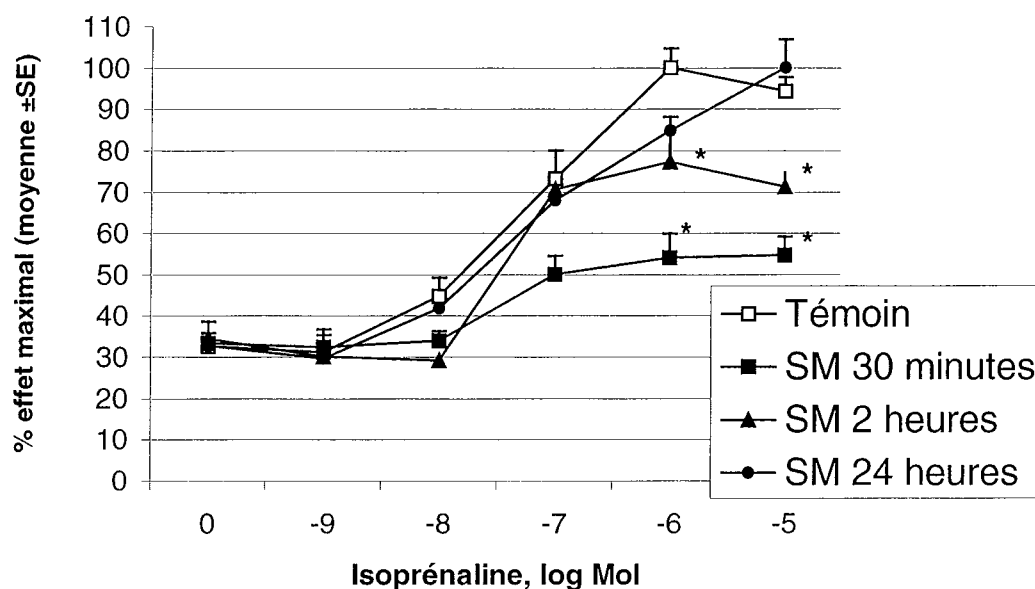
- **Méthodes**

Nous avons étudié la courbe dose-réponse de l'isoprénaline sur la lipolyse en présence ou non de sphingomyéline d'œuf (SM-AP). Celle-ci a été ajoutée dans le milieu 30 minutes, 2 heures et 24 heures avant l'introduction de l'isoprénaline. Le milieu a été recueilli 90 minutes après l'ajout de l'isoprénaline.

- **Résultats**

Nous avons observé (Figure 2) une diminution significative de l'effet maximal de l'isoprénaline, de 45% quand la SM est ajoutée 30 minutes avant l'isoprénaline et de 21% quand elle est ajoutée 2 heures avant. Par contre aucun effet n'a été observé quand la SM était ajoutée 24 heures avant l'isoprénaline. L'effet de la sphingomyéline est donc transitoire. La concentration d'isoprénaline responsable de 50 % de l'effet maximal, calculée graphiquement (EC<sub>50</sub>), n'était pas modifiée par la sphingomyéline.

**Figure 2** : Cinétique des concentrations en glycérol dans le milieu de culture d'adipocytes après enrichissement du milieu en sphingomyéline d'oeuf (SM-AP) 30 minutes, 2 heures et 24 heures avant l'isoprénaline. Moyennes  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes



### 3.1.3. Analyse des effets de la sphingomyéline ajoutée 30 minutes avant la forskoline et le méthylisobutylxanthine

- **Méthodes**

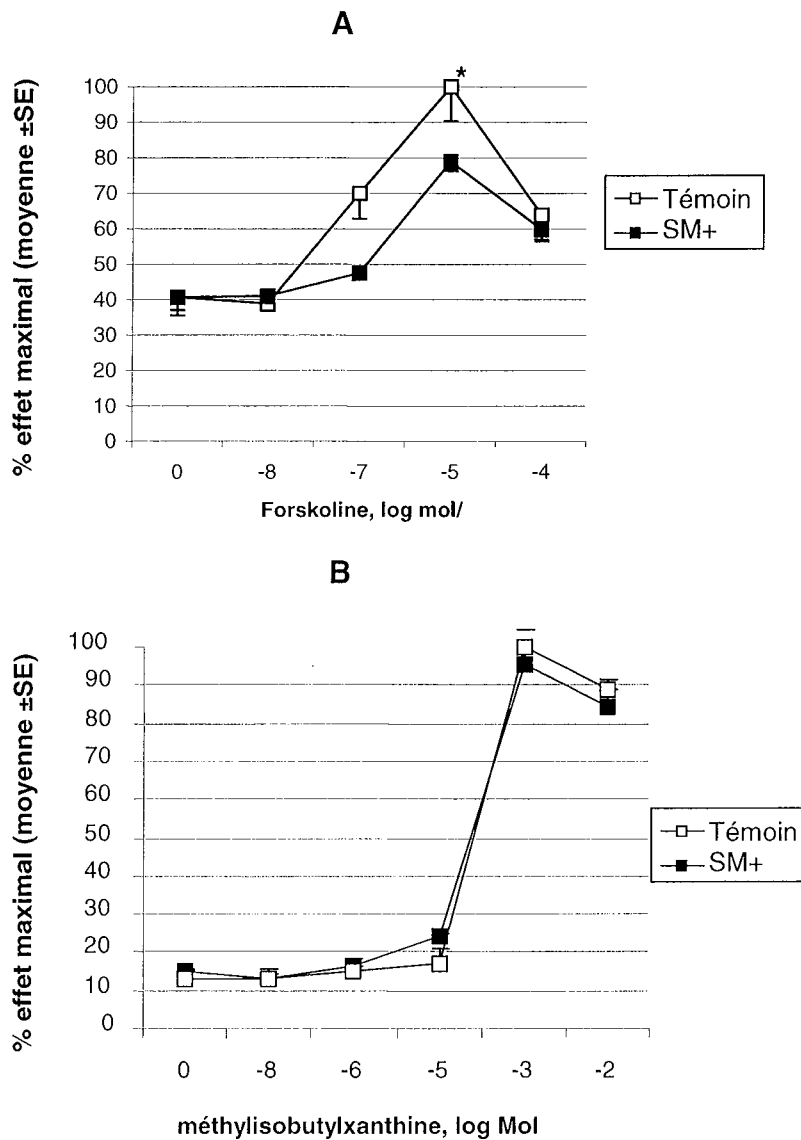
Nous avons observé un effet maximal de la SM sur la lipolyse stimulée par l'isoprénaline, quand la SM était présente dans le milieu 30 minutes avant l'introduction de l'agoniste. Nous avons donc étudié l'effet de la forskoline et de la méthylisobutylxanthine après le même temps d'action.

La forskoline est un activateur direct de l'adénylate cyclase. La méthylisobutylxanthine est un inhibiteur de la phosphodiesterase qui augmente la concentration d'AMPc dans la cellule, ce qui entraîne une activation de la protéine kinase A et de la lipase hormono-sensible.

## • Résultats

La sphingomyéline d'œuf (SM-AP) entraîne une diminution significative de l'effet maximal de la forskoline de 20% ( $p < 0,05$ ) alors que l'effet du méthylisobutylxanthine n'est pas modifié (figure 3). L'EC50 de la forskoline n'est pas modifié par la SM-AP.

**Figure 3 :** Analyse des effets de la sphingomyéline d'œuf (SM-AP) ajoutée 30 minutes avant la forskoline (activateur de l'adénylate-cyclase) (A) ou le méthylisobutylxanthine (B) sur la lipolyse. Moyennes  $\pm$  SEM de quatre manipulations indépendantes ;  $p = 0,032$  pour la forskoline.



### **3.1.4. Synthèse des résultats**

La sphingomyéline ajoutée dans le milieu exerce un effet inhibiteur sur la lipolyse stimulée par l'isoprénaline. Cet effet, qui est transitoire est maximal quand la sphingomyéline est ajoutée 30 minutes avant l'isoprénaline. La sphingomyéline exerce également un effet inhibiteur sur la lipolyse stimulée par la forskoline. Néanmoins cet effet paraît moins important (20%) que celui de l'isoprénaline (45%). Aucun effet n'était observé sur l'action de la méthylisobutylxanthine, inhibiteur de la phosphodiesterase. La sphingomyéline exerce donc un effet en amont de l'AMPc. La concentration d'agoniste entraînant 50% de l'effet maximal (EC50) n'était pas modifiée dans ces différentes expériences, la sensibilité des récepteurs n'est donc pas affectée.

Pour étayer l'hypothèse d'une action membranaire de la sphingomyéline, nous avons analysé la composition membranaire après 30 minutes d'incubation avec la sphingomyéline.

### **3.1.5. Etude de la composition membranaire des adipocytes après 30 minutes d'incubation avec la sphingomyéline**

- **Méthodes**

La composition membranaire a été déterminée 30 minutes après avoir mis le milieu enrichi ou non avec la SM.

- **Résultats**

La concentration en sphingomyéline dans la membrane plasmique augmente en moyenne de 14,9 % ( $p=0,014$ ). L'augmentation de la phosphatidylsérine est à la limite de la significativité. Le cholestérol membranaire était modérément augmenté mais de façon significative (4,3%).

**Tableau 1** : Composition de la membrane plasmique des adipocytes 3T3-L1 après 30 minutes d'incubation avec la sphingomyéline d'œuf (SM-AP). Moyennes  $\pm$  SEM de cinq cultures indépendantes.

	Témoin ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Sphingomyéline ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	p	Témoin % des PL totaux	Sphingomyéline % des PL totaux	p
PE	377,7 $\pm$ 34,2	352,7 $\pm$ 48,3	NS	44,1 $\pm$ 2,8	40,6 $\pm$ 4,4	NS
PI	61,1 $\pm$ 4,2	65,0 $\pm$ 4,7	NS	7,1 $\pm$ 0,7	7,5 $\pm$ 0,7	NS
PS	99,1 $\pm$ 5,5	112,5 $\pm$ 2,6	0,051	11,6 $\pm$ 0,6	13,0 $\pm$ 0,1	0,014
PC	261,9 $\pm$ 26,3	269,7 $\pm$ 21,7	NS	30,5 $\pm$ 2,3	31,3 $\pm$ 3,2	NS
SM	56,9 $\pm$ 3,0	65,4 $\pm$ 2,6	0,014	6,7 $\pm$ 0,5	7,6 $\pm$ 0,5	0,050
PL totaux	856,7 $\pm$ 35,2	865,4 $\pm$ 24,2	NS			
Cholestérol	68,1 $\pm$ 0,7	71,5 $\pm$ 1,1	0,019			

SM :Sphingomyéline ; PE : phosphatidyl-éthanomamine; PI:Phosphatidyl-Inositol; PS : Phosphatidyl-Sérine; PC :Phosphatidyl-Choline; Cer: Céramides.

### 3.1.6. Effets de la sphingomyéline sur la fluidité membranaire

- **Méthodes**

Nous avons déterminé la fluidité de la membrane des adipocytes après 30 minutes, 2 heures et 24 heures d'incubation avec de la sphingomyéline d'œuf (SM-AP).

- **Résultats**

L'anisotropie de la sonde DPH était significativement augmentée quand les cellules étaient traitées par la SM (Tableau 2 et Figure 4). Après 30 minutes, la sphingomyéline d'œuf (SM-AP) rigidifie la membrane des adipocytes. Après deux heures de traitement par la sphingomyéline, l'anisotropie de la fluorescence émise par le DPH augmentait de façon significative ( $p < 0,05$ ). La sphingomyéline garde un effet rigidifiant après deux heures d'incubation. En revanche, aucun effet significatif n'a été trouvé après 24 heures.

**Tableau 2:** Effet de la sphingomyéline sur l'anisotropie de la fluorescence émise par le TMA-DPH et le DPH au début de leur incorporation dans les adipocytes traités pendant 30 minutes, 2 heures et 24 H par la sphingomyéline. Les mesures sont effectuées à 37°C. Moyennes  $\pm$  erreur standard.  $p < 0,05$

Temps de traitement par la SM	Temps après l'incorporation de la sonde	Anisotropie « r » de la TMA-DPH		Anisotropie « r » de la DPH	
		Ethanol seul	Ethanol SM AP	Ethanol seul	Ethanol SM-AP
30 min	2 minutes	0,273 $\pm$ 0,002	0,274 $\pm$ 0,002	0,152 $\pm$ 0,002	0,160 $\pm$ 0,002* (+5,2%)
	4 minutes	0,269 $\pm$ 0,002	0,269 $\pm$ 0,003	0,148 $\pm$ 0,002	0,155 $\pm$ 0,002* (+4,7%)
2 heures	2 minutes	0,252 $\pm$ 0,002	0,251 $\pm$ 0,002	0,143 $\pm$ 0,003	0,152 $\pm$ 0,009 (+6,3%)*
	4 minutes	0,252 $\pm$ 0,002	0,250 $\pm$ 0,003	0,136 $\pm$ 0,002	0,143 $\pm$ 0,007 (+5,1%)*
24 heures	2 minutes	0,258 $\pm$ 0,002	0,259 $\pm$ 0,002	0,148 $\pm$ 0,003	0,150 $\pm$ 0,007
	4 minutes	0,254 $\pm$ 0,002	0,252 $\pm$ 0,003	0,141 $\pm$ 0,002	0,142 $\pm$ 0,007 NS



### 3.1.7. Effets de l'enrichissement membranaire en sphingomyéline sur l'expression des récepteurs $\beta$ -adrénergiques après 30 minutes de traitement.

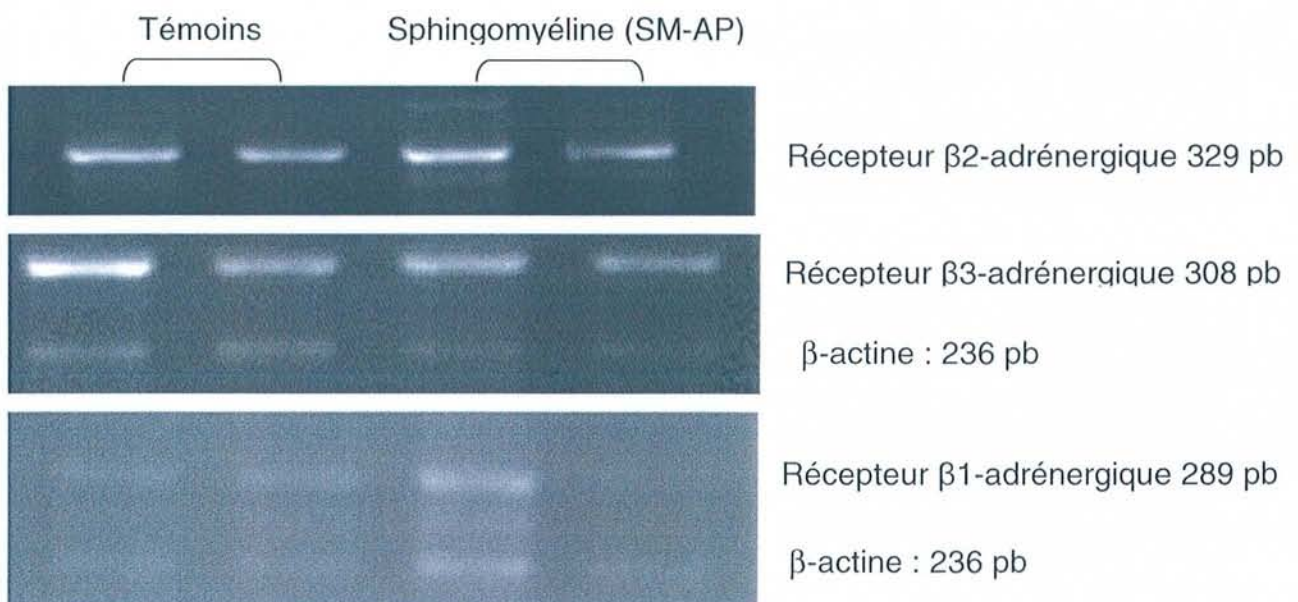
#### • Méthodes

Nous avons vérifié l'effet de la sphingomyéline sur l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques en dosant les ARNm après 30 minutes d'incubation avec la SM entraînant l'effet le plus important sur la lipolyse (sphingomyéline d'œuf; SM-AP).

Une méthode de PCR semi quantitative a permis d'amplifier les ARN m des trois récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. La  $\beta$ -actine a servi de standard interne.

#### • Résultats

Aucune différence n'a été mise en évidence en rapportant les densités optiques de chaque ARNm à celui de la  $\beta$ -actine.



### 3.2. Effets de la déplétion en sphingomyéline de la membrane: effets de la sphingomyélinase

#### 3.2.1. Hypothèses

La sphingomyélinase exogène, ajoutée dans le milieu dégrade la sphingomyéline membranaire. Cette dégradation entraîne une fuite du cholestérol à l'intérieur de la cellule (477). Un travail antérieur de notre équipe a montré que la sphingomyélinase

exogène entraîne une diminution de la concentration membranaire en sphingomyéline de 24%, du cholestérol de 52% et une augmentation de la fluidité membranaire de 13% de préadipocyte 3T3-L1, après 1 heure d'action (7) (travail de thèse de N. Al-Makdissy). La sphingomyélinase entraîne une déstructuration de la membrane et une dégradation des micro-domaines (442). Ces perturbations pourraient modifier les propriétés physiques de la membrane et perturber l'action des catécholamines sur la lipolyse.

Nous avons testé l'effet de la sphingomyélinase sur la lipolyse et sur la fluidité membranaire d'adipocytes de la lignée 3T3-L1. Nous avons vérifié au préalable que la sphingomyélinase n'interférait pas avec le dosage du glycérol.

### 3.2.2. Effet de la sphingomyélinase sur la fluidité membranaire

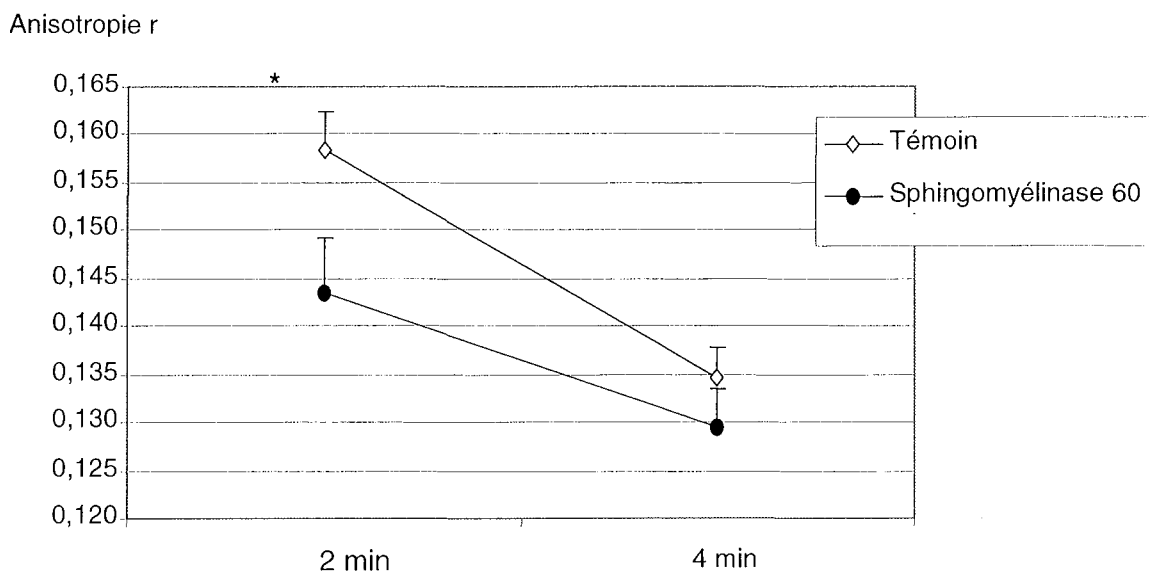
#### • Méthodes

L'effet de la sphingomyélinase sur la fluidité membranaire a été analysé dans notre laboratoire sur des pré-adipocytes. Cette étude a montré que la sphingomyélinase avait un effet maximal après 1 heure. Ce temps a donc été choisi pour étudier l'effet de cette enzyme sur la lipolyse.

#### • Résultats

L'anisotropie de la DPH était plus basse de 12% durant les deux premières minutes après l'introduction de la sonde (figure 4).

**Figure 4 :** Effet de la sphingomyélinase exogène après 60 minutes d'action sur la fluidité membranaire mesurée par la DPH sur des adipocytes. Moyennes  $\pm$  SEM de quatre expériences. ANOVA mesures répétées  $p < 0,05$ .



### 3.2.3. Effets de la sphingomyélinase sur la lipolyse basale

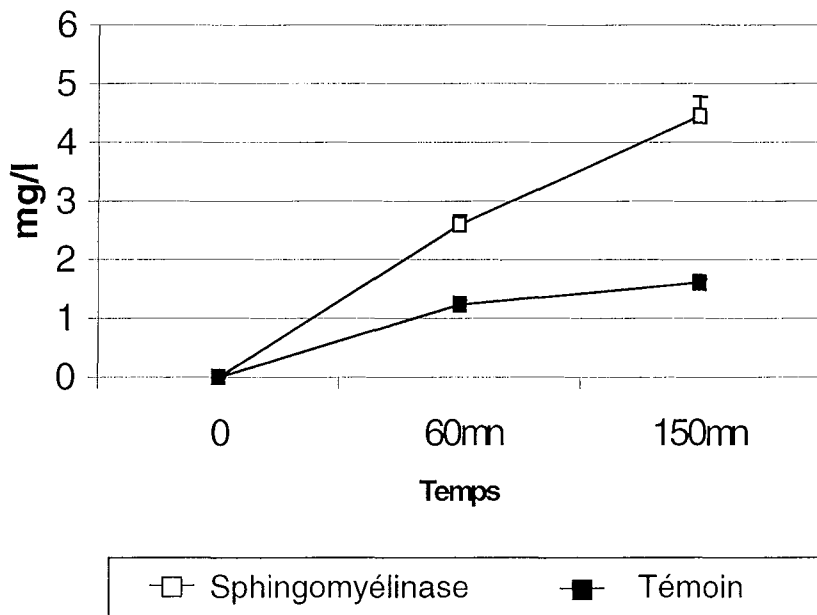
- **Méthodes**

Nous avons évalué l'effet de la sphingomyélinase sur la lipolyse basale au cours d'une cinétique, en prélevant une fraction du milieu au temps 30 minutes, puis à 60 minutes et 150 minutes d'incubation.

- **Résultats**

Après 30 minutes d'action de la sphingomyélinase on notait une augmentation du glycérol basal significative de 78% ( $p < 0,05$ ). La concentration en glycérol dans le milieu était, en moyenne multipliée par 2,1 après 60 minutes d'action et par 2,8 au bout de 2 H 30 ( $p < 0,01$ ), en l'absence de toute stimulation (Figure 5).

**Figure 5 :** Effets de la sphingomyélinase à 30 minutes ( $p < 0,05$ ), 60 minutes et 150 minutes sur le glycérol basal ( $p < 0,01$ ). Moyennes  $\pm$  SEM de trois manipulations indépendantes



### 3.2.4. Effets de la sphingomyélinase sur la lipolyse stimulée par l'isoprénaline

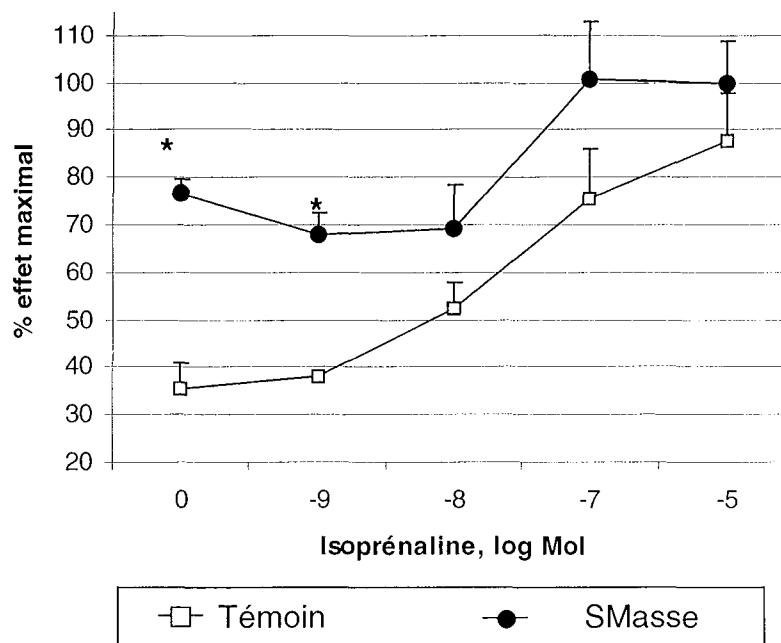
- **Méthodes**

L'étude de la fluidité membranaire suggère que l'effet de la sphingomyélinase est maximal au de 60 minutes, Les résultats des mesures de fluidité membranaire ont montré un effet maximal après 60 minutes d'action de la sphingomyélinase. Nous avons donc évalué la lipolyse stimulée par l'isoprénaline 60 minutes après l'introduction de la sphingomyélinase dans le milieu. L'enzyme a été maintenue dans le milieu pendant toute la durée de test de lipolyse.

- **Résultats**

La concentration en glycérol dans le milieu était augmentée de façon significative pour la lipolyse basale et pour la concentration d'isoprénaline  $10^{-9}$  ( $p < 0,01$ ) (figure 6). En revanche, la concentration maximale n'était pas différente.

**Figure 6 :** Effets de la sphingomyélinase ajoutée 60 minutes avant l'introduction de l'isoprénaline sur la lipolyse stimulée. Moyennes  $\pm$  SEM de trois manipulations indépendantes.



### 3.3. Effets de la déplétion en cholestérol : effets de la $\beta$ -cyclodextrine

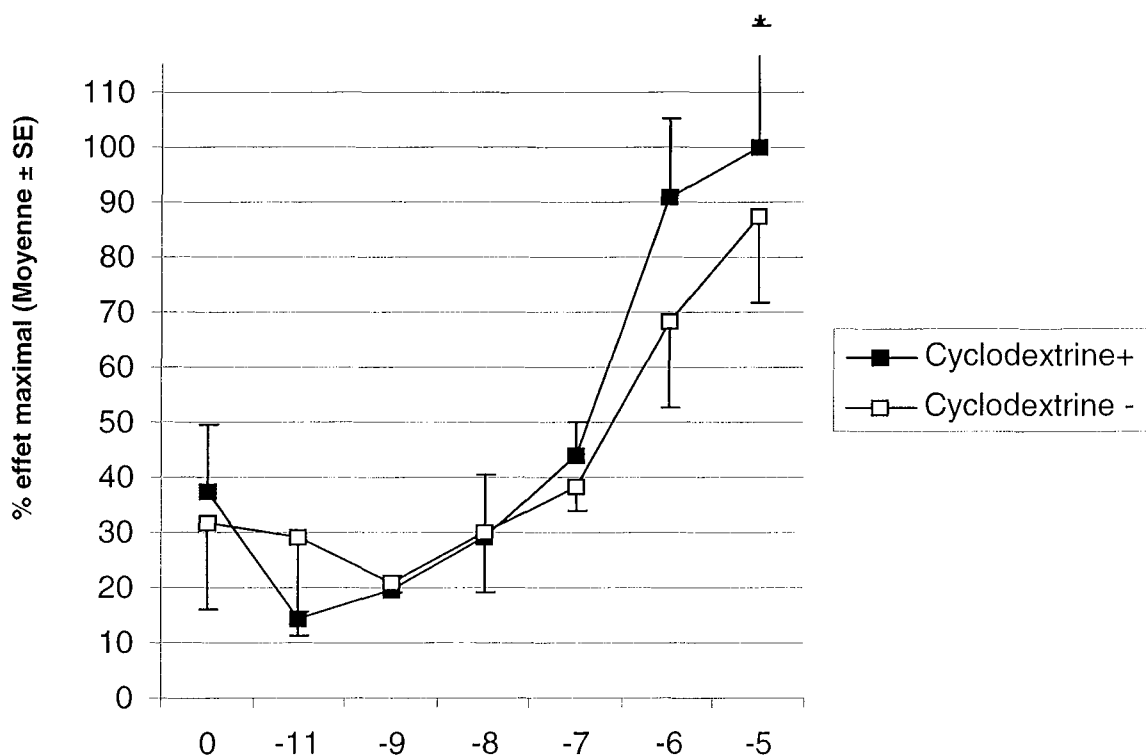
- Principe - Méthodes

La cyclodextrine est un chélateur du cholestérol membranaire. La diminution de la concentration en cholestérol membranaire entraîne une augmentation de la synthèse de sphingomyéline par la cellule (266). La cyclodextrine ne modifie pas la composition membranaire en sphingomyéline. La cyclodextrine a été utilisée à une concentration de 5 mM ajoutée 30 minutes avant l'isoprénaline. La fluidité membranaire des cellules n'a pas pu être étudiée, en raison d'une trop grande fragilité des cellules quand celles-ci étaient mises en suspension.

- Résultats

La cyclodextrine n'a pas modifié la lipolyse de base. Par contre l'effet maximal de l'isoprénaline était modérément augmentée (+13%) mais de façon significative ( $p=0,025$ ) (figure 7).

**Figure 7 :** Effet de la  $\beta$ -cyclodextrine sur la lipolyse stimulée par l'isoprénaline, Moyennes  $\pm$  SEM de cinq manipulations indépendantes



### 3.4. Synthèse des résultats obtenus avec la sphingomyéline, la sphingomyélinase et la cyclodextrine sur la lipolyse basale et stimulée par l'isoprénaline

Les principaux résultats obtenus par les modifications de composition membranaire sur la lipolyse basale et stimulée sont résumés dans le tableau 3. Les effets rapportés sur la composition membranaire, sont basés sur les résultats du laboratoire (effets de la sphingomyéline et de la sphingomyélinase) ou rapportés dans la littérature (effets de la cyclodextrine).

Traitement	Basale	Stimulée	Effets sur la composition membranaire	
			Sphingomyéline	Cholestérol
Sphingomyéline 30 minutes	→	↓	↑	↗
Sphingomyélinase 60 minutes	↑↑	→	↓↓	↓↓
Cyclodextrine 30 minutes	→	↑	→	↓↓

### 3.5. Effets des céramides sur la régulation de la lipolyse

#### 3.5.1. Hypothèses

La sphingomyéline de la membrane plasmique subit un cycle décrit sur le fibroblaste cutané et durant environ 40 minutes (241). A chaque cycle, une partie de la sphingomyéline est dégradée (environ 8%). Les céramides produits lors de la dégradation de la SM peuvent activer plusieurs voies métaboliques. Les cascades des MAP kinases (mitogen protein kinases) et SAP kinases (stress-activated protein kinases) sont les principales voies activées par les céramides. Néanmoins de très nombreux effets biologiques ont été imputés aux céramides (235;383). Les céramides peuvent être phosphorylés par une céramide kinase ou être dégradés par des céramidases. La sphingosine a également de nombreux effets biologiques (352). Les produits de la dégradation de la sphingomyéline pourraient donc intervenir dans la régulation de la lipolyse.

Le  $TNF\alpha$  active la sphingomyélinase, or cette cytokine a un effet sur la lipolyse démontré *in vivo* et *in vitro* (160;391;423). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cet

effet. Le  $\text{TNF}\alpha$  pourrait inhiber l'expression des périlipines (482) et de la protéine Gi ( $\text{Gi}2\alpha$ ) (160). Or les périlipines inhibent la lipolyse activée par le  $\text{TNF}\alpha$  (482). La diminution de leur expression facilite la lipolyse. Une étude récente (322) a montré que les céramides pourraient être impliqués dans cette régulation.

Les céramides pourraient aussi être impliqués dans la régulation de la lipolyse en inhibant la phosphodiesterase. Des analogues des céramides à chaîne courte (C2 et C3) reproduisent en effet l'action du  $\text{TNF}\alpha$  sur les cellules 3T3-L1. Néanmoins, cette action n'a pas été montrée avec les céramides naturels. L'insuline exerce son effet antilipolytique essentiellement en activant la phosphodiesterase, et pourrait donc s'opposer à l'action des céramides.

L'objectif de ce travail était d'analyser l'effet d'une des molécules impliquée dans le cycle de la sphingomyéline. Néanmoins, en ajoutant des céramides dans le milieu, on ne peut pas exclure un effet membranaire des céramides.

### 3.5.2. Effets des céramides sur la lipolyse basale et stimulée

- **Objectifs**

Notre objectif était d'analyser l'action de céramides naturels sur la libération du glycérol à l'état basal et stimulé. L'insuline exerce un effet antilipolytique en activant la phosphodiesterase, nous avons donc analysé l'effet conjoint des céramides et de l'insuline.

- **Méthodes**

Les céramides de cerveau de bœuf étaient dissous dans un mélange d'alcool absolu et de dodécane (éthanol:dodécane= 49:1, v/v) à 37°C, à la concentration finale de 15  $\mu\text{M}$  dans un mélange d'éthanol:dodécane [1/200, (v/v)] pour permettre la pénétration des céramides dans le cytoplasme. Le milieu était homogénéisé et incubé à 37°C pendant 10 minutes, avant d'être mis en contact avec les cellules.

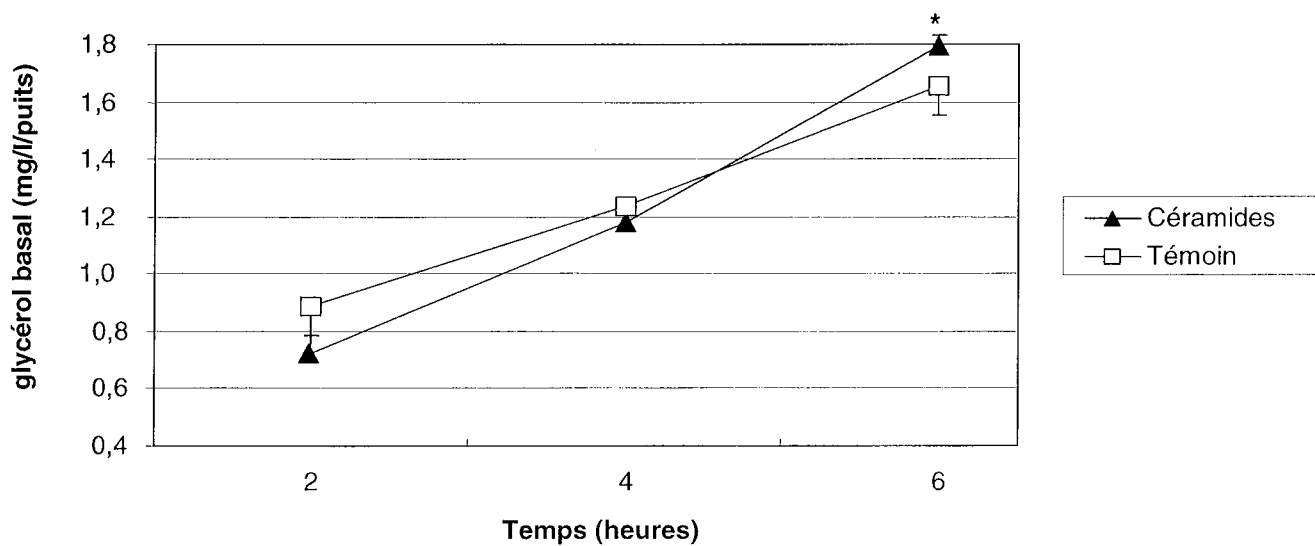
- **Résultats**

#### *Effets sur la lipolyse basale*

Les céramides (15  $\mu\text{M}$ ) n'ont pas eu d'effet sur la lipolyse basale au bout de 2 heures (15,1  $\pm$  0,8 mg/l vs 15,6  $\pm$  0,3; n=12). Par contre les études cinétiques faites sur 6 heures ont montré une discrète augmentation du glycérol de 8% qui est néanmoins significative ( $p < 0,05$ ). Les deux cinétiques sont statistiquement différentes ( $p = 0,037$ ) (Figure 9). L'expérience a été réitérée sur 6 heures en présence ou non d'insuline (166 nmol/l). La

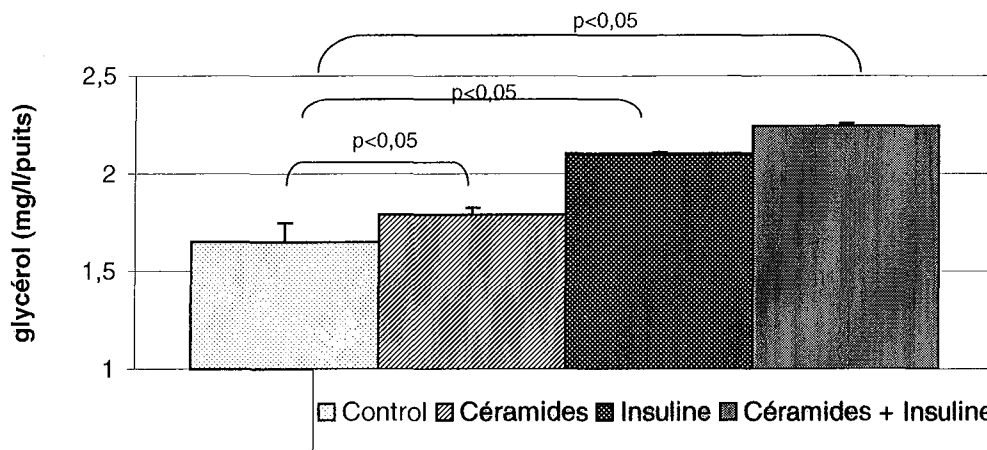
concentration en glycérol était plus élevée quand les cellules étaient traitées par l'insuline et/ ou par les céramides (test de Kruskal Wallis:  $p=0,033$ ). A 12 heures et 24 heures nous avons observé un détachement du tapis cellulaire. Les temps tardifs n'ont donc pas été considérés.

**Figure 9 :** Effets des céramides sur la lipolyse basale, cinétique sur 6 heures. Moyennes  $\pm$  SEM de cinq manipulations indépendantes. Anovapar mesures répétées ( $p=0,037$ ).





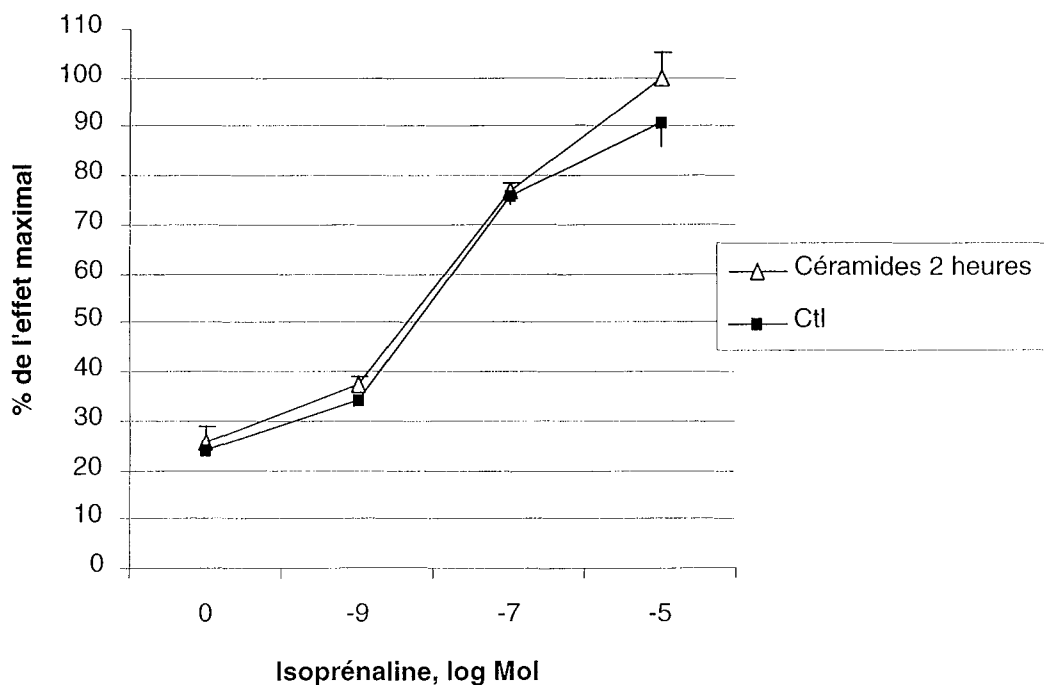
**Figure 10 :** Effets des céramides sur la lipolyse basale au temps 6 heures en présence ou non de céramides ou d'insuline Moyennes  $\pm$  SEM de quatre manipulations indépendantes



#### Effets sur la lipolyse stimulée

Les tests de lipolyse ont été réalisés après un traitement de deux heures par les céramides. Les différences observées n'étaient pas significatives au terme des 90 minutes de stimulation, quelque soit la concentration.

**Figure 11 :** Effets du traitement par les céramides pendant 2 heures sur la lipolyse stimulée par l'isoprénaline.



## 4. Discussion

### • Effet membranaire de la sphingomyéline

Cette étude montre que des modifications de la composition membranaire en sphingomyéline peuvent modifier la réponse lipolytique des adipocytes. L'augmentation de la concentration en sphingomyéline entraîne une diminution de la réponse lipolytique maximale alors que la déplétion membranaire en sphingomyéline entraîne au contraire une augmentation de la lipolyse basale.

La sphingomyéline diminue la réponse maximale de la lipolyse stimulée par l'isoprénaline, en moyenne de 45%, lorsqu'elle est incubée 30 minutes avant le test de stimulation. La sphingomyéline entraîne également une diminution, toutefois moins importante (-20%) de la lipolyse stimulée par la forskoline. Par contre, la sphingomyéline ne modifie pas la réponse au méthylisobutylxanthine qui augmente la concentration intracellulaire en AMPc. L'effet que nous observons n'est donc pas lié à une inhibition de la lipase hormono-sensible ou à un effet sur la protéine kinase A mais est localisé au niveau de la membrane.

La stimulation maximale est diminuée alors que la concentration correspondant à 50% de la stimulation maximale (EC50) ne varie pas. La sensibilité des récepteurs n'est donc pas altérée. D'autre part, nous n'avons pas observé d'effet sur l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques au bout de 30 minutes d'action. Cela suggère que la sphingomyéline exerce ses effets au sein même de la membrane en perturbant la transmission du signal. D'autre part, l'effet de la sphingomyéline est transitoire, il disparaît après 24 heures d'incubation, ce qui conforte cette hypothèse.

Les modifications de composition membranaire que nous avons observées dans notre modèle cellulaire sont proches de celles que l'on retrouve chez les sujets obèses insulino-résistants (568;570). Par conséquent, l'enrichissement membranaire en sphingomyéline pourrait être une cause de résistance à l'action des catécholamines du tissu adipeux *in vivo*.

L'augmentation de la sphingomyéline membranaire a modifié la réponse lipolytique de la forskoline. L'effet observé était cependant moins important qu'avec l'isoprénaline. La sphingomyéline pourrait donc agir directement sur l'activité de l'adénylate cyclase mais aussi perturber les interactions entre le récepteur, la protéine G et cette enzyme.

Plusieurs études ont montré que l'environnement lipidique, notamment en phospholipides peut influencer l'activité de l'adénylate cyclase (138). Cette enzyme pourrait changer de conformation selon la composition de la membrane plasmique en phospholipides. Il existe des interactions entre le groupement polaire des phospholipides

et l'adénylate cyclase qui pourrait interférer avec le site de régulation de la protéine (11;206). Le rapport cholestérol/phospholipide dans la membrane pourrait également être essentiel. Ainsi, la résistance aux catécholamines des hépatocytes de rat cirrhotique pourrait être expliquée par une augmentation du rapport cholestérol/sphingomyéline membranaire (292). L'acide gras de la sphingomyéline pourrait aussi influencer cette activité enzymatique. Dans notre expérience, la sphingomyéline riche en acide lignocérique (C24) avait moins d'effet inhibiteur sur la lipolyse alors qu'elle entraînait une rigidification plus importante de la membrane. Cet effet pourrait être due à une différence de diffusion de la sphingomyéline au sein de la membrane. La sphingomyéline associée à l'acide palmitique diffuse probablement plus rapidement dans la membrane et pénètre plus rapidement dans la cellule. Or le site catalytique de l'adénylate cyclase est localisé au niveau du feuillet interne de la membrane.

L'enrichissement de la membrane en sphingomyéline s'accompagne d'une augmentation du cholestérol. Nous ne pouvons pas exclure que l'effet observé soit lié à l'augmentation du cholestérol membranaire. Les résultats que nous avons obtenus avec la cyclodextrine vont dans ce sens. En effet, la cyclodextrine chélate le cholestérol de la membrane sans affecter la sphingomyéline. La synthèse de sphingomyéline serait au contraire stimulée par le traitement par la cyclodextrine (données de la littérature (266;353)). Or, nous avons constaté une augmentation de la lipolyse stimulée quand nous avons traité les cellules par la cyclodextrine. La lipolyse basale n'était pas affectée.

Un effet propre de la rigidification membranaire peut également être discuté. Certaines études faites chez l'animal montrent que la rigidification de la membrane pourrait, à elle seule, affecter l'affinité des récepteurs adrénergiques (318). Cependant, cette rigidification est obtenue en enrichissant les membranes en acides gras saturés; il est donc impossible de distinguer l'effet lié aux changements de propriétés physiques de la membrane de l'effet propre des acides gras saturés ou insaturés (325;375;392). Cette rigidification de la membrane pourrait perturber les interactions entre les différentes molécules de la cascade de la lipolyse ou diminuer l'accessibilité des récepteurs  $\beta$ . Un effet sur la sensibilité des récepteurs adrénergiques a été montrée mais il est variable selon le type cellulaire étudié (470). Ainsi, la rigidification membranaire pourrait soit augmenter soit diminuer l'affinité des récepteurs pour leur agoniste. Elle pourrait aussi diminuer leur accessibilité.

Nos résultats montrent que l'affinité des récepteurs  $\beta$  n'est pas affectée par l'enrichissement membranaire en sphingomyéline puisque la sensibilité des adipocytes à l'isoprénaline évaluée par l'EC50 n'était pas modifiée.

L'activité de la lipase hormono-sensible pourrait être modulée par les phospholipides (462) (355;356) et en particulier par la sphingomyéline (462). Mais l'effet de la sphingomyéline que nous avons observé n'est pas lié à un effet sur cette enzyme puisque la réponse à la méthylisobutylxanthine n'était pas modifiée.

La sphingomyélinase contrairement à la sphingomyéline est responsable d'une augmentation de la lipolyse. Seule la lipolyse basale est augmentée alors que l'effet maximal de l'isoprénaline ( $V_{max}$ ) n'était pas modifié. Cela est en faveur d'un mécanisme de saturation de l'enzyme. L'activité de la LHS est en effet l'étape limitante de la lipolyse. La sphingomyélinase est responsable d'une déplétion de la membrane en sphingomyéline et en cholestérol. Elle détruit les cavéoles et désorganise la membrane (475;476). Elle génère également des produits de dégradation de la sphingomyéline, comme les céramides et la sphingosine.

Différents mécanismes peuvent expliquer l'augmentation de la lipolyse basale. La sphingomyélinase pourrait entraîner une augmentation de la production d'AMPc dans la cellule. Néanmoins cet effet a été constaté pour hépatocytes (217) mais pas pour les fibroblastes. Une augmentation de la diffusion du glycérol à travers la membrane peut également être envisagée. Le glycérol passe la membrane plasmique grâce à un des canaux appelés aquaporine. C'est essentiellement l'aquaporine 1 qui est chargée du transport du glycérol. L'insuline inhibe l'expression du gène (232) tandis que les activateurs de PPAR $\gamma$  activent son expression (233). Lors de la stimulation de la lipolyse adipocytaire, l'aquaporine est transloquée vers la membrane. Il est possible que la déplétion en sphingomyéline membranaire modifie l'accessibilité de ces canaux ou leur translocation. Les modifications de la fluidité membranaire pourraient donc agir à ce niveau.

Les effets de la sphingomyélinase sur l'activité de l'adénylate cyclase ont été étudiés sur différents types cellulaires. La sphingomyélinase diminue l'activité de l'adénylate cyclase des fibroblastes de hamsters transfectés par le gène du récepteur  $\alpha_2$  (217). Par contre dans cette étude, l'activité de l'adénylate cyclase des cellules rénales n'est pas modifiée par ces changements, alors que l'activité de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase est complètement abolie.

Les céramides produits lors de la dégradation de la sphingomyéline pourraient inhiber la phosphodiesterase (322). Nous avons pu reproduire cet effet avec des céramides naturels. Néanmoins cet effet est faible et retardé. Par conséquent il peut difficilement expliquer l'effet de la sphingomyélinase sur la lipolyse basale.

- **Effet des céramides**

Bien que significatif, l'effet des céramides sur la lipolyse basale que nous avons observé était faible. Ces résultats sont cependant conformes à ceux obtenus avec les céramides à chaînes courtes (322) qui augmentent la lipolyse basale proportionnellement à leur concentration dans le milieu. Dans l'étude de Mei *et al.* l'effet n'était significatif qu'à partir de la 12<sup>ème</sup> heure. Dans notre expérience nous n'avons pas prolongé l'exposition des cellules aux céramides en raison d'une souffrance cellulaire qui est observée à 24 heures.

L'effet lipolytique des céramides serait lié à une action indirecte sur la phosphodiesterase (PDE) (322). Le prétraitement des cellules pendant 24 heures par les céramides pourraient bloquer l'effet antilipolytique de l'insuline évaluée au bout de 40 minutes. Or l'insuline joue ce rôle en activant la PDE3B (142). L'effet des céramides pourrait s'exercer en inhibant l'activation de la protéine kinase B qui active la PDE (495). Cependant, un effet des céramides sur la lipase hormono-sensible ou sur la protéine kinase A ne peut pas être exclu.

Paradoxalement, en l'absence de stimulation de la lipolyse, nous avons constaté une augmentation de la concentration en glycérol en présence d'insuline. Ceci est en accord avec l'étude de Rosenstock *et al.* (417) qui montre que le traitement prolongé des cellules par l'insuline facilite la libération du glycérol mais diminue celle des acides gras qui sont réestérifiés. Cet effet de l'insuline serait progressif et immédiat. A l'inverse, le TNF $\alpha$  après un temps de latence, augmente à la fois la concentration de glycérol et celle des acides gras. Dans notre expérience, nous avons observé un effet additionnel des céramides et de l'insuline sur la libération du glycérol. Contrairement à l'étude de Mei *et al.* (142), nous avons fait agir les céramides et l'insuline de façon simultanée. L'effet inhibiteur de l'insuline pourrait être complètement abolie en présence de céramides (322).

- **Fluidité membranaire**

Les valeurs d'anisotropie enregistrées avec la sonde TMA-DPH sont plus élevées que celle observées avec le DPH. La TMA-DPH intègre le feuillet externe de la membrane et reste dans les couches les plus superficielles. Ce feuillet est plus rigide que le feuillet interne en raison d'une asymétrie de distribution des phospholipides. La sphingomyéline et la phosphatidylcholine sont essentiellement situées dans ce feuillet externe et renforcent la cohésion de la membrane (557;558). En revanche, la DPH s'insère plus profondément dans la membrane, région dont la fluidité dépend essentiellement de la partie hydrophobe des phospholipides.

Les valeurs d'anisotropie de la sonde DPH décroissent progressivement et rapidement après avoir ajouté la sonde, alors que l'anisotropie de la sonde TMA-DPH reste constante. Cette sonde reste dans la membrane et ne pénètre pas dans la cellule. Cela nous a incités à étudier spécifiquement l'évolution de l'anisotropie immédiatement après l'addition de ce marqueur dans le milieu et pendant les premières minutes. La vitesse de décroissance de l'anisotropie de la DPH varie en fonction de la fluidité membranaire et de la vitesse de pénétration de la sonde dans la cellule. Dans toutes les expériences réalisées sur les adipocytes cultivés ou non en présence de sphingomyéline, l'anisotropie de la TMA-DPH varie très peu au cours du temps. La TMA-DPH ne pénètre pas dans la cellule (493).

Les propriétés rigidifiantes de la sphingomyéline sont essentiellement liées aux forces d'interaction entre les molécules de sphingomyéline, capables de former des interdigitations renforçant la cohésion de la membrane. Ces interdigitations dépendent essentiellement de la région hydrophobe de la molécule. Il est donc logique que les modifications soient observées uniquement avec la sonde DPH.

En conclusion, l'enrichissement de la membrane en shingomyéline est responsable à court terme d'une inhibition de la lipolyse. Les membranes adipocytaires des sujets obèses les plus insulino-résistants étant plus riches en sphingomyéline, cela pourrait expliquer, en partie, la résistance du tissu adipeux à l'action des catécholamines observée *in vivo*.

## **B : Effets de la sphingomyéline sur la transcription des gènes**

### **1. Introduction**

L'augmentation de la concentration de sphingomyéline (SM) membranaire ou cellulaire pourrait influencer l'expression de certains gènes par deux voies essentielles, une voie dépendant du cycle de la SM et une voie membranaire. La sphingomyéline membranaire pourrait agir indirectement en modifiant l'homéostasie cellulaire du cholestérol (162;474-476) en raison des interactions fortes, qui existent entre le cholestérol et ce phospholipide.

La dégradation de la SM par la sphingomyélinase membranaire produit des céramides, de la sphingosine et de la sphingosine 1 P qui peuvent influencer l'expression génique. La sphingosine 1 P pourrait notamment réprimer l'expression de SREBP (552).

Nous avons étudié les gènes impliqués dans la réponse aux catécholamines, mais aussi certains gènes clefs du métabolisme cellulaire comme PPAR $\gamma$  et SREBP et certains gènes cibles de ces facteurs de transcriptions. Nous envisagerons successivement les gènes impliqués dans la régulation de la lipolyse, les effets sur PPAR $\gamma$ , sur SREBP<sub>2</sub> et sur les gènes cibles de SREBP<sub>2</sub>.

## 2. Effets de la sphingomyéline sur les ARNm des récepteurs $\beta$ -adrénergiques et sur la lipase hormono-sensible (LHS)

### a) Hypothèse

Le TNF- $\alpha$  est un activateur de la sphingomyélinase. El Hadri *et al.* (186) ont montré, que cette cytokine modifiait l'expression des récepteurs adrénergiques d'adipocytes 3T3-L1 en culture après 6 heures d'incubation. Dans cette étude, les ARNm des récepteurs  $\beta$ 3 étaient fortement abaissés, ceux du récepteur  $\beta$ 1 l'étaient modérément, alors que les ARNm du récepteur  $\beta$ 2 étaient fortement augmentés. La densité des récepteurs était modifiée de la même façon. Les trois types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques peuvent donc être modulés de façon différentielle. De même, l'insuline (150) et la dexaméthazone (149) inhibent l'expression du récepteur  $\beta$ 3 mais sont sans effet sur les récepteurs  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2.

L'effet de la sphingomyéline a été étudié après 24 heures d'incubation, et avec 3 types de sphingomyélines, la sphingomyéline d'œuf (riche en SM-AP), la sphingomyéline de cerveau de bœuf (riche en SM-AS et en SM-AN), et la sphingomyéline d'érythrocyte (riche en SM-AL). Nous n'avons pas observé de différence significative en fonction de la longueur de l'acide gras associé, certains résultats ont donc été regroupés.

### b) Résultats

#### Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Les différentes sphingomyélines n'ont pas eu d'effet significatif sur la transcription des gènes des récepteurs adrénergiques  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 (n=4). L'ARNm du récepteur  $\beta$ 1 n'a pu être mis en évidence qu'en augmentant la quantité d'ADN et en augmentant le nombre de cycles de PCR à 40 mais aucune différence n'a été trouvée.

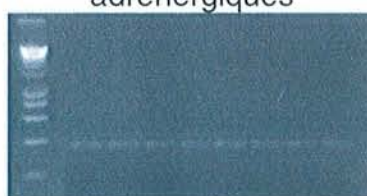
G3 PDH et  $\beta$ -Actine

Récepteurs  $\beta$ 2-  
adrénergiques

Récepteurs  $\beta$ 3-  
adrénergiques



Tém SM SM SM  
AP AS AL



Tém SM SM SM  
AP AS AL



Tém SM SM SM  
AP AS AL



## *La lipase hormono-sensible*

Les effets des différentes sphingomyélines sur l'ARNm de la lipase hormono-sensible (LHS) ont été analysés grâce à une PCR en temps réel (I.Dugail, INSERM465 ) (valeurs relatives par rapport au témoin). Aucun effet n'a été observé avec les trois sphingomyélines, les résultats ont donc été groupés : rapport SM/ témoin moyen =  $1,23 \pm 0,09$ , (n=6). Une valeur supérieure à 2 est considérée comme significative (378).

### **4.1. Effets de la SM sur l'expression de PPAR $\gamma$ et sur la différenciation adipocytaire**

#### **a) Hypothèses**

PPAR $\gamma$  est un récepteur nucléaire particulièrement impliqué dans le stockage des triglycérides dans le tissu adipeux. C'est aussi un facteur de différenciation terminale des adipocytes. Les antagonistes de PPAR $\gamma$  bloquent la différenciation adipocytaire, tandis que les agonistes comme les thiazolidinediones l'induisent (263;507). Plusieurs facteurs de transcription participent à la régulation de l'induction du gène PPAR $\gamma$ . Ce sont les C/EBPs, SREBP1, les glucocorticoïdes et l'AMPc (302).

PPAR $\gamma$ , après avoir formé un hétérodimère avec le récepteur rétinoïdes (RXR) se lie à la région régulatrice de certains gènes et en contrôle la transcription. En l'absence de ligand, le complexe PPAR $\gamma$ -RXR lie un complexe protéique répresseur, qui possède une activité histone désacétylase. Les histones désacétylés inhibent la transcription. Parmi les gènes cibles, il y a les gènes impliqués dans le stockage et la synthèse de triglycérides: la « Fatty acid synthase » (FAS), l'acétylCoA synthétase et peut-être aussi la résistine (190).

#### **b) Protocole**

Une PCR semi-quantitative a été réalisée. Nous avons étudié l'expression de PPAR $\gamma$  d'adipocytes en culture exposés ou non à un traitement par la sphingomyéline pendant 24 heures. Nous avons également étudié l'effet d'un traitement quotidien par la sphingomyéline ajoutée dans le milieu soit au moment de la différenciation cellulaire (J+2), soit au moment de la confluence (J-1).

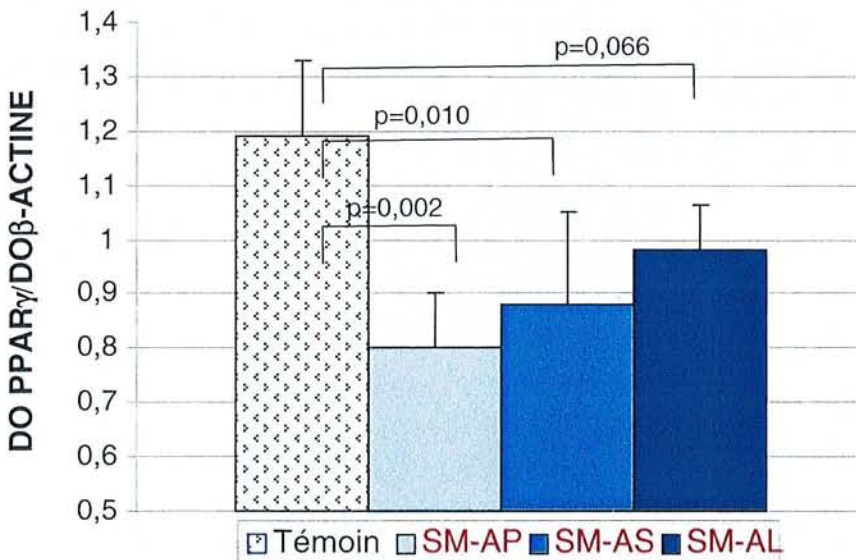
### c) Résultats

Après 24 heures de traitement, la sphingomyéline entraînait une diminution significative de l'expression de PPAR $\gamma$ , sur des adipocytes différenciés à J11 (figure 12). Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les différentes sphingomyélines.

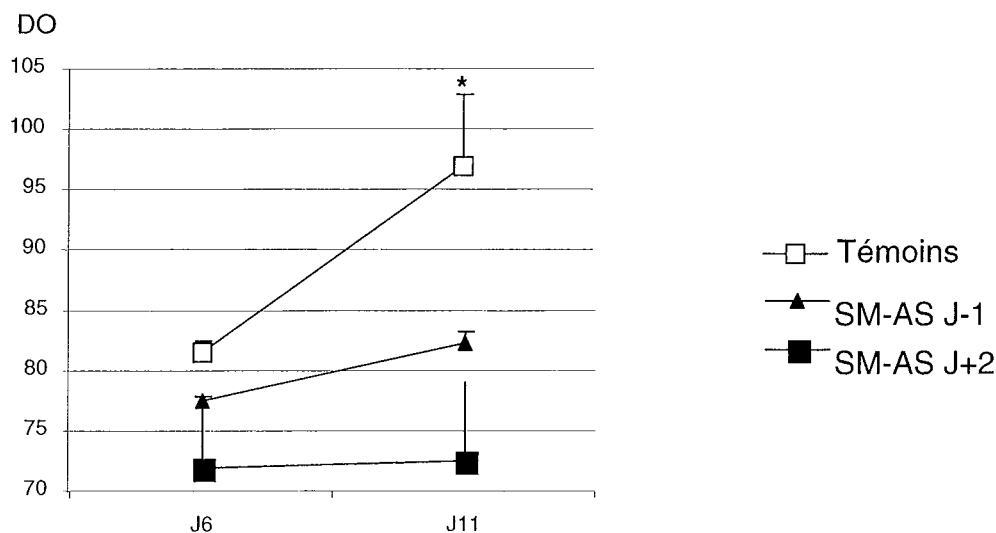
Nous avons noté une augmentation significative de PPAR $\gamma$  des cellules témoins (éthanol seul) entre le 6ème jour et le 11ème jour (figure 13), contrairement aux cellules traitées quotidiennement par la sphingomyéline depuis la confluence ou à partir du 2ème jour après le début de la différenciation.

Nous n'avons pas observé d'effet sur la différenciation adipocytaire mesurée par la densité optique de l'huile rouge (à 540 nm) après lavage du tapis cellulaire, trypsinisation et remise en suspension. La concentration du glycérol dans le surnageant, qui augmente normalement avec la différenciation du tapis cellulaire, n'était pas différente dans le milieu des cellules traitées ou non traitées.

**Figure 12** : Effets de la sphingomyéline sur la transcription de PPAR $\gamma$  (Test de Kruskal Wallis :  $p=0,015$ ) Moyennes  $\pm$  SEM de 5 expériences indépendantes



**Figure 13 :** Effets de la sphingomyéline (SM-ASN) ajoutée au moment de la confluence ou 2 jours après la confluence et pendant toute la phase de différenciation sur l'ARNm de PPAR $\gamma$  des cellules 3T3-L1, au 6<sup>ème</sup> et 11<sup>ème</sup> jour de différenciation. Moyennes  $\pm$  SEM de 3 expériences



#### 4.2. Effets de la SM sur l'expression de SREBP2

Il a été démontré que les modifications du contenu membranaire en sphingomyéline pouvaient modifier l'homéostasie intracellulaire du cholestérol. L'enrichissement ou la déplétion membranaire en sphingomyéline pourrait provoquer des mouvements de cholestérol dans la cellule permettant de rétablir l'équilibre entre SM et cholestérol dans la membrane (474;475).

Nous avons observé (Tableau 6) une augmentation significative de l'ARNm de SREBP2 avec le traitement par la sphingomyéline.

**Tableau 6 :** Effet de la sphingomyéline après 24 heures de traitement sur la transcription des gènes. Moyennes de 6 cultures indépendantes traitées ou non par les sphingomyélines des trois origines (SM-AP, SM-AS, SM-AL). Chaque mesure a été répétée 3 fois.

**(A) Gènes modifiés par le traitement par la sphingomyéline**

Gènes	Rapport sphingomyéline/témoin Une valeur $\geq 2$ est considérée comme significative (260)
	Rapport SM/ Témoin
SREBP 2	2,10 $\pm$ 0,07
Lipoprotéine Lipase	5,77 $\pm$ 1,84
Synthase des acides gras	2,3 $\pm$ 0,31
SCD1	2,5 $\pm$ 0,53
Cavéoline 2	15,9 $\pm$ 3,78
ABC1	5,05 $\pm$ 1,00
SR-B1	2,3 $\pm$ 0,35
Récepteur des LDL	2,57 $\pm$ 0,48
Récepteur de l'insuline	4,77 $\pm$ 1,11
Résistine	2,13 $\pm$ 0,64

**(B) Gènes non modifiés par le traitement par la sphingomyéline**

Gènes	Rapport SM/ témoin	Ecart standard
Lipase hormono sensible	1,23	1,23
Glut 4	0,93	0,93
leptine	1,37	1,37

### 4.3. Effets de la sphingomyéline sur l'ARNm de la lipoprotéine lipase

**a) HYPOTHESE**

La lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme clé du métabolisme énergétique et du métabolisme des lipoprotéines. Par conséquent, la régulation de son expression pourrait avoir des répercussions sur ce métabolisme. PPAR $\gamma$  est considéré comme un des éléments régulateurs de la transcription de la LPL. Il existe en effet un élément de réponse de PPAR $\gamma$  au niveau de la zone promotrice et il existe chez l'homme, une association entre un polymorphisme de PPAR $\gamma$  (Pro12Ala) et une baisse de l'activité de la LPL (453). L'activation de PPAR $\gamma$  par les thiazolidinedione entraîne une augmentation de l'activité de la LPL de l'adipocyte (28). Néanmoins, le gène de la LPL serait aussi contrôlé par SREBP (231;454;467;556).

## **b) Résultats (Tableau 6)**

Nous avons observé une augmentation conjointe des ARNm de SREBP2 d'un facteur de  $2,1 \pm 0,07$  en moyenne et de la lipoprotéine lipase d'un facteur de  $5,8 \pm 1,8$  en moyenne. ce qui est en faveur d'un rôle possible de SREBP sur l'expression de la LPL des adipocytes 3T3-L1.

### **4.4. Effets de la SM sur les gènes cibles de SREBP : les gènes impliqués dans la lipogenèse de novo**

SREBP régule les enzymes clés de la lipogenèse, l'acétyl-CoA carboxylase et la synthèse des acides gras dont les gènes sont activés (131), il s'agit néanmoins de SREBP1 (ou ADD1) et non de SREBP2 (508).

Dans notre étude la transcription de deux enzymes est activée par la sphingomyéline, la synthèse des acides gras d'un facteur de  $2,3 \pm 0,3$  en moyenne et la SCD1 d'un facteur de  $2,3 \pm 0,3$  en moyenne.

### **4.5. Effets de la SM sur les gènes cibles de SREBP : les gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol**

#### **a) Hypothèse**

##### *La cavéoline*

Le gène de la cavéoline des fibroblastes pourrait être inhibé par SREBP1 (48;115). Cependant l'augmentation du cholestérol libre dans les cellules HeLa (152), faisant suite à l'influx de cholestérol sous forme de LDL, entraîne une diminution de l'expression de SREBP et une absence de modification de l'expression de la cavéoline. La régulation pourrait donc être différente suivant le type cellulaire. Par ailleurs on ignore le rôle de SREBP2 sur la régulation du gène de la cavéoline.

##### *L'ATP binding cassette ou ABC1*

L'ATP binding cassette ou ABC1 est une protéine participant à l'efflux du cholestérol (361;362). La mutation de cette protéine est responsable de la maladie de Tangier caractérisée par une réduction importante des lipoprotéines de haute densité (HDL).

##### *Le récepteur des LDL*

La régulation de la synthèse des récepteurs des LDL semble dépendre

essentiellement de SREBP2 (39).

### *SR-B1 (Scavenger receptor class B type I)*

SRB1 est une protéine exprimée essentiellement par l'hépatocyte. Qualifiée de récepteur aux HDL ou de récepteur scavenger des macrophages, cette protéine pourrait faciliter l'efflux de cholestérol (530).

#### **b) Résultats**

Le traitement des cellules par la sphingomyéline entraîne une activation des gènes cibles de SREBP intervenant dans l'homéostasie du cholestérol (Tableau 6). Ce sont les gènes impliqués dans la captation du cholestérol (SRB1, récepteurs des LDL), dans l'efflux ou dans la translocation du cholestérol vers la membrane (ABC1, cavéoline2).

## **4.6. Le récepteur de l'insuline**

### **a) Hypothèse**

L'implication du cycle de la sphingomyéline dans la régulation de l'expression du gène du récepteur de l'insuline n'a pas été étudiée antérieurement. La vitamine D (1,25-dihydroxyvitamin D3) augmente l'expression du gène de l'insuline (261). Or cette vitamine active le cycle de la sphingomyéline. Il est donc possible que les métabolites de la sphingomyéline, sphingosine ou céramide, soit impliqués dans la régulation de l'expression de ce gène. En favorisant la phosphorylation de la sérine du récepteur, la sphingosine-1-P inhibe l'activité tyrosine kinase du récepteur. Cette inactivation pourrait favoriser l'augmentation de l'expression du gène du récepteur.

### **b) Résultats**

Nous montrons que la sphingomyéline est responsable d'une augmentation de l'expression du gène du récepteur de l'insuline d'un facteur de  $4,8 \pm 1,1$  en moyenne.

## **4.7. La résistine**

### **a) Hypothèse**

La régulation de l'expression du gène de la résistine pourrait essentiellement dépendre du facteur transcriptionnel C/EBP $\alpha$ , qui peut induire l'expression de la résistine quand le gène est exprimé dans d'autres cellules que l'adipocyte (190).

## **b) Résultats**

Dans notre étude nous avons observé une augmentation de l'ARNm de la résistine avec le traitement par la sphingomyéline d'un facteur de  $2,1 \pm 0,6$  en moyenne.

## **5. Discussion**

- **Effets de la sphingomyéline sur les ARNm des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et sur la lipase hormono-sensible (LHS)**

Après 24 heures de traitement, la sphingomyéline n'a pas eu d'effet sur l'expression des récepteurs  $\beta 2$  et  $\beta 3$ -adrénergiques et sur la LHS. Cela est en accord avec les tests de lipolyse effectués après 24 heures d'incubation. Néanmoins, ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus dans la littérature avec le  $TNF\alpha$  (186). Cette cytokine agit sur l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, en diminuant l'expression du récepteur  $\beta 1$ , en augmentant celle du  $\beta 2$  et en diminuant celle du récepteur  $\beta 3$ . Les céramides étant probablement les seconds messagers du  $TNF\alpha$ , on pouvait s'attendre à obtenir des effets identiques. Toutefois, la sphingomyéline exogène est faiblement dégradée dans la cellule quand elle est intégrée par endocytose (242). La concentration en céramides générés est donc probablement trop faible pour reproduire l'effet du  $TNF\alpha$ . Il est également possible que l'activité de la sphingomyéline synthase et celle de la céramidase soit augmentée dans la lignée 3T3-L1, comme cela a été décrit dans d'autres lignées de cellules immortalisées (283). D'autre part, l'effet décrit avec le  $TNF\alpha$  a été obtenu sur des cellules de type 3T3-F442A à 8 jours de différenciation alors que nos résultats concernent des cellules 3T3-L1 à 12 jours de différenciation. Or c'est essentiellement le récepteur  $\beta 3$  qui est exprimé à ce stade de différenciation (134). En outre, l'ARNm du récepteur  $\beta 1$  n'a pu être mis en évidence qu'en augmentant la quantité d'ADN et en augmentant le nombre de cycles de PCR. Ce récepteur est donc probablement peu exprimé à ce stade de différenciation.

Les analogues des céramides pourraient également augmenter l'expression de la LHS (322), ce que nous n'avons pas observé avec la sphingomyéline.

- **Effets de la SM sur l'expression de PPAR $\gamma$  et sur la différenciation adipocytaire**

Il n'existe pas de lien connu entre l'expression de PPAR $\gamma$  et la sensibilité aux catécholamines. Toutefois l'expression de PPAR $\gamma$  est un marqueur de sensibilité à l'insuline. Nous avons fait l'hypothèse que l'insulino-résistance et la résistance aux catécholamines pourraient être associées. Les résultats obtenus sur l'expression de PPAR $\gamma$  sont en faveur d'un lien entre le contenu membranaire en sphingomyéline et l'expression de PPAR $\gamma$ . Des études faites dans notre laboratoire ont montré que cette relation existe chez l'homme (568;569). Ces résultats sont également en accord avec les effets du TNF $\alpha$  qui diminue l'expression de PPAR $\gamma$ . Il est donc probable que l'effet de la sphingomyéline s'exerce par l'intermédiaire de ses métabolites: phosphocholine, sphingosine, sphingosine 1P, céramides ou acides gras (483;553;572). Curieusement Mei *et al.* (322) n'ont pas trouvé d'effets des céramides naturels sur l'expression de PPAR $\gamma$ .

- **Effets de la SM sur l'expression de SREBP2**

Nous avons observé une augmentation de l'ARNm de SREBP2 avec le traitement par la sphingomyéline. Il a été démontré que les modifications du contenu membranaire en sphingomyéline pouvaient modifier l'homéostasie intracellulaire du cholestérol. L'enrichissement ou la déplétion membranaire en sphingomyéline entraîne des mouvements de cholestérol dans la cellule qui vont permettre de rétablir l'équilibre entre SM et cholestérol dans la membrane (474;475). L'augmentation des ARNm de SREBP2 avec la sphingomyéline est donc en faveur d'une activation de la voie du cholestérol secondaire à une déplétion relative du stock de cholestérol intra-cellulaire. Cette déplétion est liée à une translocation du cholestérol intra-cellulaire vers la membrane plasmique. Gatt et Bierman (162) ont également suggéré que l'incorporation de la sphingomyéline dans des fibroblastes pourrait influencer la synthèse de cholestérol et la synthèse des récepteurs des LDL. Nos résultats sont en accord avec ceux de Lelay *et al.* (260) montrant que la déplétion de la membrane plasmique en cholestérol est responsable comme l'enrichissement membranaire en SM, d'une augmentation de l'expression de SREBP2.



- **La lipoprotéine lipase (LPL)**

La LPL est une enzyme clé du métabolisme énergétique et du métabolisme des lipoprotéines. Par conséquent, la régulation de son expression pourrait avoir des répercussions sur ce métabolisme. PPAR $\gamma$  est considéré comme un des éléments régulateurs de la transcription de la LPL. Il existe en effet un élément de réponse de PPAR $\gamma$  au niveau de la zone promotrice et il existe chez l'homme, une association entre un polymorphisme de PPAR $\gamma$  (Pro12Ala) et une baisse de l'activité de la LPL (453). L'activation de PPAR $\gamma$  par les thiazolidinedione entraîne une augmentation de l'activité de la LPL de l'adipocyte (28).

Néanmoins, le gène de la LPL serait aussi contrôlé par SREBP (231;454;467;556). Nous avons observé une augmentation conjointe des ARNm de SREBP2 et de la lipoprotéine lipase, qui est en faveur d'un rôle possible de SREBP sur l'expression de la LPL des adipocytes 3T3-L1. Ces résultats sont conformes à ceux de Schoonjans *et al.* (454) montrant que la déplétion membranaire en cholestérol entraîne une augmentation de la transcription de la LPL. Cet effet est reproduit par la transfection conjointe de SREBP-1a, -1c (ADD-1) et de SREBP-2. Cependant Lelay *et al.* (260) n'ont pas trouvé d'effet de la déplétion membranaire en cholestérol sur la LPL.

- **Effets de la SM sur les gènes cibles de SREBP : les gènes impliqués dans la lipogénèse *de novo***

SREBP régule les enzymes clés de la lipogénèse, l'acetyl-CoA carboxylase et la fatty acid synthase (FAS) dont les gènes sont activés (131). SREBP1 (ou ADD1) agit sur un motif de type E-box (CANNTG) de la région promotrice de FAS (508). Cette région promotrice possède également deux motifs SRE (297;298). La concentration en ARNm de l'ATP citrate lyase, l'enzyme permettant la synthèse d'acetyl-CoA est également activée par SREBP. SREBP stimule également la transcription des enzymes permettant la synthèse de NADPH (469), indispensable à la lipogénèse. Il a également été démontré que SREBP 1a et 2 régulaient l'expression de la steroyl-CoA desaturase 1 (SCD1) de l'adipocyte et de l'hépatocyte (38;350;469;497). Cette enzyme permet la désaturation en position delta 9 des acides gras saturés et joue un rôle essentiel dans le maintien des propriétés physiques de la membrane de l'adipocyte. Par conséquent, l'activation de SREBP entraîne une augmentation de la concentration en acides gras monoinsaturés

dans l'hépatocyte (469). Dans notre étude la transcription de deux de ces enzymes est activée par la sphingomyéline, la synthèse des acides gras et la SCD1.

- **Effets de la SM sur les gènes cibles de SREBP : les gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol**

Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques des myocytes sont localisés au sein des cavéoles (461). Cette protéine pourrait donc jouer un rôle dans la régulation adrénérgique. Le gène de la cavéoline des fibroblastes pourrait être inhibé par SREBP1 (48;115). Cependant l'augmentation du cholestérol libre dans les cellules HeLa (152), faisant suite à l'influx de cholestérol sous forme de LDL, entraîne une diminution de l'expression de SREBP et une absence de modification de l'expression de la cavéoline. La régulation pourrait donc être différente suivant le type cellulaire. Par ailleurs on ignore le rôle de SREBP2 sur la régulation du gène de la cavéoline.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Lelay *et al.* (260) montrant que la déplétion de la membrane plasmique en cholestérol est responsable d'une augmentation de l'expression de SREBP2 et de la cavéoline, ce qui suggère un rôle activateur direct ou indirect de SREBP2 sur l'expression de cette protéine.

Comme ABC1, la cavéoline est également impliquée dans le trafic intracellulaire de cholestérol (209), permettant ainsi de maintenir l'équilibre entre cholestérol et sphingomyéline au sein de la membrane plasmique.

Comme ABC1, la cavéoline est également impliquée dans le trafic intracellulaire de cholestérol (209), permettant ainsi de maintenir l'équilibre entre cholestérol et sphingomyéline au sein de la membrane plasmique. L'augmentation de l'expression d'ABC1 est responsable d'une augmentation de l'efflux de cholestérol (257). Cependant la protéine ABC-1 seule ne peut pas induire l'efflux de cholestérol et de phospholipides, l'Apo A-I est indispensable (361;362). La surexpression d'ABC1 permet néanmoins d'augmenter l'efflux du cholestérol (257). SREBP pourrait être impliqué dans la régulation de son expression (336). ABC1 participe au transport intracellulaire du cholestérol, de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique (363). L'oxystérol, dont la synthèse augmente avec la concentration de cholestérol libre intracellulaire, active la transcription de ABC1 (285;376;532;533). Néanmoins nous ne savons pas comment évolue la concentration en oxystérol cellulaire quand le pool de sphingomyéline est augmenté. Assez curieusement, un oxystérol, le 25-OH-cholestérol, active la synthèse de sphingomyéline à partir des céramides (411).

Dans la cellule, l'homéostasie du cholestérol dépend de la synthèse, de l'influx du cholestérol des lipoprotéines de faible densité (les LDL), de l'estérification du cholestérol et du flux de cholestérol libre sortant de la cellule. Le défaut de cette protéine entraîne une diminution de la sortie du cholestérol de la cellule, le cholestérol s'accumule dans la cellule sous forme estérifiée (maladie de Tangier). L'augmentation de l'expression d'ABC1 avec la sphingomyéline pourrait permettre de favoriser la translocation du cholestérol vers la membrane plasmique et donc de favoriser l'efflux en présence d'accepteurs dans le milieu.

La régulation de la synthèse des récepteurs des LDL semble dépendre essentiellement de SREBP2 (39). Les inhibiteurs de l'HMG-coA réductase active à la fois SREBP2 et la synthèse des récepteurs à LDL (441). Certains ligands de SCAP active le clivage de SREBP2 et augmente également la synthèse des récepteurs des LDL (171). Il est donc logique de trouver une augmentation des ARN des récepteurs des LDL.

SRB1 est une protéine exprimée essentiellement par l'hépatocyte. Qualifiée de récepteur aux HDL ou de récepteur scavenger des macrophages, cette protéine pourrait faciliter l'efflux de cholestérol. Notre étude montre que SR-B1 est également fortement exprimée dans l'adipocyte 3T3-L1. L'enrichissement de la membrane en sphingomyéline augmente l'expression du gène de cette protéine. Ce qui pourrait favoriser l'efflux de cholestérol (530).

- **Le récepteur de l'insuline**

Nous montrons que la sphingomyéline est responsable d'une augmentation de l'expression du gène du récepteur de l'insuline. L'interprétation de cette augmentation doit être prudente car nous ne savons pas s'il s'agit de l'isoforme A du récepteur qui est moins active (forme défective en l'exon 11). D'autre part, la traduction et l'activité du récepteur n'ont pas été étudiés.

- **La résistine**

La régulation de l'expression du gène de la résistine pourrait essentiellement dépendre du facteur transcriptionnel C/EBP $\alpha$ , qui peut induire l'expression de la résistine quand le gène est exprimé dans d'autres cellules que l'adipocyte (190). La fixation de C/EBP $\alpha$  s'accompagne d'un recrutement de coactivateurs p300 et CBP et d'une importante augmentation de l'acétylation des histones au voisinage de la région

promotrice du gène, ce qui favorise la transcription.

Bien que les thiazolidine-diones (TZD) inhibent cette expression, la régulation par PPAR $\gamma$  semble indirecte car il n'existe pas d'éléments de réponse à proximité de la région promotrice. Les TZD pourraient agir directement en inhibant l'acétylation des histones.

Les acides gras libres pourraient également inhiber son expression (224), ce qui pourrait expliquer les résultats contradictoires observés concernant le lien entre cette protéine et l'insulino-résistance (216). Dans notre étude nous avons observé une augmentation de l'ARNm de la résistine avec le traitement par la sphingomyéline.

En conclusion, notre étude montre que le traitement prolongé des adipocytes en culture par la SM entraîne des modifications transcriptionnelle de gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire, la lipogenèse et l'homéostasie intra-cellulaire du cholestérol. Ces résultats devront être complétés par l'analyse des protéines. Ces résultats montrent néanmoins que l'enrichissement des adipocytes en sphingomyéline entraîne une dérégulation d'un ensemble de gènes, qui pourrait conduire à une modification du « phénotype » de l'adipocyte.

## 6. Conclusions - Perspectives

Ce travail a permis de montrer que l'enrichissement de la membrane en sphingomyéline (SM), dans une proportion proche de celle rencontrée chez le sujet obèse, pouvait fortement altérer la réponse lipolytique maximale des adipocytes à un agoniste  $\beta$ -adrénergique non sélectif, l'isoprénaline. La réponse à la forskoline était également altérée. Cet effet n'est pas lié à une modification de l'expression des récepteurs  $\beta$ . La SM membranaire pourrait donc modifier les interactions entre le récepteur et son environnement phospholipidique, mais aussi modifier l'activité de l'adénylate cyclase. Nous avons également montré que la déplétion membranaire en SM et en cholestérol entraînait au contraire une augmentation de la lipolyse basale. Cet effet pourrait être lié à l'effet des céramides dont l'action lipolytique a été reproduit avec des céramides naturels. Il semble donc acquis que des modifications membranaires en sphingomyéline et en cholestérol puissent modifier la lipolyse adipocytaire. L'augmentation de la concentration en SM membranaire pourrait donc être l'un des mécanismes de la résistance aux catécholamines chez les sujets obèses.

L'étape suivante sera d'envisager de nouvelles investigations cliniques pour explorer les anomalies de la lipolyse en fonction du contenu membranaire de l'adipocyte en SM et en cholestérol. Cela implique de mettre en place des méthodes adaptées telles que la microdialyse du tissu adipeux. La réponse à l'amaigrissement serait également particulièrement intéressante à considérer.

Le traitement des adipocytes en culture par la SM influence l'expression de gènes impliqués dans le stockage des acides gras, la lipogénèse, et la différenciation adipocytaire. En freinant l'expression de PPAR $\gamma$ , la SM pourrait moduler la différenciation adipocytaire. Il faudra confirmer cette hypothèse en analysant les facteurs transcriptionnels intervenant au cours de cette différenciation et mesurer certains marqueurs de processus. En activant les gènes impliqués dans le stockage des triglycérides, la SM est susceptible de favoriser l'hypertrophie du tissu adipeux. Son action génique va également dans le sens d'un effet freinateur de l'hyperplasie. Cette hypothèse mériterait d'être étudiée *in vivo* car elle représente l'image en miroir de l'action des thiazolidinediones. C'est un argument de plus pour penser que la SM joue un rôle majeur dans le syndrome plurimétabolique du sujet obèse.

Cependant bien des inconnues persistent. L'étude de l'expression des gènes par les dosages des ARNm est une approche qu'il faudra compléter par le dosage des protéines impliquées dans cette régulation.

Notre groupe a établi qu'il existe *in vivo* une association entre l'insulino-résistance et le contenu membranaire en SM des adipocytes. Mais la comparaison n'a pas été faite pour cette cellule entre des sujets obèses et des sujets non obèses. Les sujets de poids normal les plus hyperinsulinémiques ont toutefois aussi un excès de SM dans la membrane de globule rouge. Ensuite, les études actuelles, effectuées chez l'homme, ne permettent pas d'établir un lien de causalité entre les faits observés. Enfin nous ignorons les causes de l'augmentation membranaire en SM des sujet obèses insulino-résistants. La SM de la membrane plasmique est essentiellement d'origine intracellulaire, mais la contribution de la SM provenant des lipoprotéines, notamment celle des LDL, n'est pas connue. Or les sujets obèses insulino-résistants peuvent avoir des lipoprotéines de composition anormale, notamment enrichie en SM (29). Les échanges plasma-membrane pourraient donc être impliqués dans l'enrichissement membranaire en SM.

La détermination des causes de cette augmentation paraît primordiale. Le modèle que nous avons utilisé dans nos travaux *in vitro* est, en effet, assez éloigné de la physiologie. La SM des lipoprotéines subit un métabolisme différent de la sphingomyéline apportée dans le milieu sous forme hydrosoluble. Il faudrait donc évaluer les effets de la SM qui subit la voie de dégradation lysosomiale. La détermination des activités enzymatiques de la sphingomyéline synthase et de la sphingomyélinase, parallèlement à l'étude de la composition membranaire du tissu adipeux viscéral et sous cutané, serait intéressante chez des sujets ayant des degrés divers d'insulino-résistance ou de résistance aux catécholamines. Les mécanismes physiologiques régulant ces activités enzymatiques sont mal connus. Les glucocorticoïdes qui activent la sphingomyéline synthase (343;344) pourraient être en cause.

## Conclusion générale

L'étude de la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle permet d'obtenir des indices de fonctionnement du système nerveux autonome. Les études cliniques que nous avons menées montrent qu'il existe une dysfonction sympathique chez les sujets obèses normotendus en relation avec l'insulino-résistance et l'hyperleptinémie. Mais elles ne permettent pas d'affirmer qu'il existe une diminution d'activité ou une diminution de la réponse des tissus aux catécholamines. Ce travail reste à faire *in vivo*.

Le phénotype clinique d'obésité que nous avons décrit dans ce travail est associé à une augmentation de la sphingomyéline membranaire, mesurée au niveau du globule rouge. Ceci nous a conduit à étudier le rôle de ce phospholipide sur l'action des catécholamines *in vitro*. Ces travaux menés sur des adipocytes en culture ont permis de montrer que la modulation de la concentration en sphingomyéline membranaire peut modifier la réponse des adipocytes aux catécholamines. Les concentrations obtenues sont comparables à celles observées dans les membranes adipocytaires des sujets obèses les plus insulino-résistants, comme cela a été publié dans un autre travail de notre groupe. Cette augmentation de la SM pourrait donc être en partie responsable de la résistance aux catécholamines observée *in vivo*. Cette hypothèse demande à être confirmée par d'autres études *in vivo* mais aussi *in vitro*. L'effet de l'insulino-résistance sur le contenu en SM des membranes du tissu musculaire lisse des vaisseaux ou des cardiomyocytes n'a jamais été étudié. Un travail sur le cardiomyocyte permettrait d'accréditer la thèse d'un effet de la sphingomyéline sur la résistance aux catécholamines du système cardio-vasculaire.

## **BIBLIOGRAPHIE**



1. Acheson KJ, Ravussin E, Schoeller DA et al. Two-week stimulation or blockade of the sympathetic nervous system in man: influence on body weight, body composition, and twenty four-hour energy expenditure. *Metabolism* 1988;37:91-8.
2. Adam-Klages S, Adam D, Wiegmann K et al. FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* 1996;86:937-47.
3. Adamczak M, Kokot F, Wiecek AW. Relationship between plasma renin profile and leptinaemia in patients with essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2000;14:503-9.
4. Adehiman ET, Gardner AW, Goran MI et al. Sympathetic nervous system activity, body fatness and body fat distribution in young and older males. *J Appl Physiol* 1995;78:802-6.
5. Akselrod S, Gordon D, Madwed JB, Snidman NC, Shannon DC, Cohen RJ. Hemodynamic regulation: investigation by spectral analysis. *Am J Physiol* 1985;249:H867-75.
6. Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 1981;213:220-2.
7. Al-Makdissy N , Younsi M, Pierre S, Ziegler O, Donner M. Glucose transport control in 3T3-L1 preadipocytes through modulation of membrane phospholipids and fluidity by sphingomyelinase. Travail de thèse.
8. Alam SQ, Mannino SJ, Alam BS, McDonough K. Effect of essential fatty acid deficiency on forskolin binding sites, adenylate cyclase and cyclic AMP-dependent protein kinase activity, the levels of G proteins and ventricular function in rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:1593-604.
9. Alam SQ, Ren YF, Alam BS. Effect of dietary trans fatty acids on some membrane-associated enzymes and receptors in rat heart. *Lipids* 1989;24:39-44.
10. Anand, B. K. and Brobeck, J. R. Nutrition classics. The Yale Journal of Biology and Medicine. Volume XXIV 1951-1952. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Nutr* 42(10), 354-6. 84.
11. Anand-Srivastava MB. Characterization of ANF-R2 receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase. *Mol Cell Biochem* 1992;113:83-92.
12. Anderson, E. A., Balon, T. W., Hoffman, R. P., Sinkey, C. A., and Mark, A. L. Insulin increases sympathetic activity but not blood pressure in borderline hypertensive humans. *Hypertension* 1992;6 Pt 2: 621-7.
13. Anderson EA, Hoffman RP, Balon TW, Sinkey CA, Mark AL. Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilatation in normal humans. *J Clin Invest* 1991;87:2246-52.
14. Andrieu N, Salvayre R, Levade T. Comparative study of the metabolic pools of sphingomyelin and phosphatidylcholine sensitive to tumor necrosis factor. *Eur J Biochem* 1996;236:738-45.

15. Arase K, Sakaguchi T, Bray GA. Lateral hypothalamic lesions and activity of the sympathetic nervous system. *Life Sci* 1987;41:657-62.
16. Arase K, Sakaguchi T, Takahashi M, Bray GA, Ling N. Effects of feeding behavior of rats of a cryptic peptide from the C- terminal end on prepro-growth hormone-releasing factor. *Endocrinology* 1987;121:1960-5.
17. Armata J, Cyklis R, Garwicz S, Wyszowski J, Zajackowski J. [Hypothalamic obesity in 2 cases of acute leukemia in children]. *Acta Paediatr Belg* 1971;25:342-6.
18. Arner P. Adenosine, prostaglandins and phosphodiesterase as targets for obesity pharmacotherapy. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993;17 Suppl 1:S57-9 .
19. Arnold RS, Newton AC. Inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase by sphingosine. *Biochimistry* 1991;30:7747-54.
20. Aronne L, Mackintosh R, Rosenbaum M, Leibel R, Hirsch J. Cardiac autonomic nervous system activity in obese and never-obese young men. *Obesity res* 1997;5:354-9.
21. Astrup A. Thermogenic drugs as a strategy for treatment of obesity. *Endocrine* 2000;13:207-12.
22. Astrup A, Buemann B, Gluud C, Bennett P, Tjur T, Christensen N. Prognostic markers for diet-induced weight loss in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19:275-8.
23. Astrup A, Christiansen P, Andersen T, Christensen NJ, Quaade F. [Hypothalamic obesity following cerebral hypoxia]. *Ugeskr Laeger* 1987;149:1400-1.
24. Astrup A, Gotzsche PC, van de Werken K et al. Meta-analysis of resting metabolic rate in formerly obese subjects. *Am J Clin Nutr* 1999;69:1117-22.
25. Astrup A, Hansen DL, Lundsgaard C, Toubro S. Sibutramine and energy balance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998;22 Suppl 1:S30-5; discussion S36-7, S42.
26. Astrup AV. [Obesity and diabetes as side-effects of beta-blockers]. *Ugeskr Laeger* 1990;152:2905-8.
27. Atef N, Ktorza A, Picon L, Penicaud L. Increased islet blood flow in obese rats: role of the autonomic nervous system. *Am J Physiol* 1992;262:E736-40.
28. Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, Staels B. Regulation of triglyceride metabolism by PPARs: fibrates and thiazolidinediones have distinct effects. *J Atheroscler Thromb* 1996;3:81-9.
29. Bagdade JD, Buchanan WE, Kuusi T, Taskinen MR. Persistent abnormalities in lipoprotein composition in noninsulin- dependent diabetes after intensive insulin therapy. *Arteriosclerosis* 1990;10:232-9.
30. Bahouth SW, Lopez S. Insulin desensitized beta 1-adrenergic receptor-mediated stimulation of adenylyl cyclase in SK-N-MC cells. *Life Sci* 1992;51:PL271-6.

31. Bailey CJ, Thornburn CC, Flatt PR. Effects of ephedrine and atenolol on the development of obesity and diabetes in ob/ob mice. *Gen Pharmacol* 1986;17:243-6.
32. Balli F. [Hypothalamic obesity in the course of acute lymphatic leukemia. Clinical observations and endocrino-metabolic study]. *Minerva Pediatr* 1971;23:1404-10.
33. Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 1996;17:305-11.
34. Barbe P, Millet L, Galitzky J, Lafontan M, Berlan M. In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3- adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. *Br J Pharmacol* 1996;117:907-13.
35. Barbe P, Stich V, Galitzky J et al. In vivo increase in beta-adrenergic lipolytic response in subcutaneous adipose tissue of obese subjects submitted to a hypocaloric diet. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:63-9.
36. Barenholtz Y , Thomas ET. Sphingomyelin : biophysical aspects. *Chem Phys Lipids* 1999;102:29-34.
37. Barnett SR, Morin RJ, Kiely DK et al. Effects of age and gender on autonomic control of blood pressure dynamics. *Hypertension* 1999;33:1195-200.
38. Bene H, Lasky D, Ntambi JM. Cloning and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: transcriptional activation by sterol regulatory element binding protein and repression by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:1194-8.
39. Bennett MK, Osborne TF. Nutrient regulation of gene expression by the sterol regulatory element binding proteins: increased recruitment of gene-specific coregulatory factors and selective hyperacetylation of histone H3 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6340-4.
40. Berger RD, Saul JP, Cohen RJ. Transfer function analysis of autonomic regulation. I. Canine atrial rate response. *Am J Physiol* 1989;256:H142-52.
41. Bernardi L, Keller F, Sanders M et al. Respiratory sinus arrhythmia in the denervated human heart. *J Appl Physiol* 1989;67:1447-55.
42. Berne C, Fagius J. Skin nerve sympathetic activity during insulin-induced hypoglycaemia. *Diabetologia* 1986;29:855-60.
43. Berne C, Fagius J, Niklasson F. Sympathetic response to oral carbohydrate administration. Evidence from microelectrode nerve recordings. *J Clin Invest* 1989;84:1403-9.
44. Berne, C., Fagius, J., Pollare, T., and Hjemsdahl, P. The sympathetic response to euglycaemic hyperinsulinaemia. Evidence from microelectrode nerve recordings in healthy subjects. *Diabetologia* 1992;35(9): 873-9.
45. Berthoud HR, Jeanrenaud B. Acute hyperinsulinemia and its reversal by vagotomy after lesions of the ventromedial hypothalamus in anesthetized rats. *Endocrinology* 1979;105:146-51.

46. Bigger JT, Fleiss JL, Steinman RC, Rolnitzky LM, Kleiger RE, Rottman JN. Frequency domain measures of heart rate period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation* 1992;85:164-71.
47. Bini G, Hagbarth KE, Hynninen P, Wallin BG. Thermoregulatory and rhythm-generating mechanisms governing the sudomotor and vasoconstrictor outflow in human cutaneous nerves. *J Physiol* 1980;306:537-52.
48. Bist A, Fielding PE, Fielding CJ. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94 :10693-8.
49. Bittman R, Kasireddy CR, Mattjus P, Slotte JP. Interaction of cholesterol with sphingomyelin in monolayers and vesicles. *Biochemistry* 1994;33:11776-81.
50. Bjorntorp P, Holm G, Rosmond R, Folkow B. Hypertension and the metabolic syndrome: closely related central origin? *Blood Press* 2000;9:71-82.
51. Bjorntorp P, Rosmond R. Hypothalamic origin of the metabolic syndrome X. *Ann N Y Acad Sci* 1999;892:297-307.
52. Bjorntorp P, Rosmond R. The metabolic syndrome-a neuroendocrine disorder? *Br J Nutr* 2000;83 Suppl 1:S49-57.
53. Blaak EE, Saris WH, van Baak MA. Adrenoceptor subtypes mediating catecholamine-induced thermogenesis in man. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993;17 Suppl 3:S78-81; discussion S82.
54. Blaak EE, Van Baak MA, Kemerink GJ, Pakbiers MT, Heidendal GA, Saris WH. Beta-adrenergic stimulation of energy expenditure and forearm skeletal muscle metabolism in lean and obese men. *Am J Physiol* 1994;267:E306-15.
55. Blaak EE, Van Baak MA, Kemerink GJ, Pakbiers MTW, Heidendal GAK, Saris WHM. B-adrenergic stimulation and abdominal subcutaneous fat blood flow in lean, obese, and reduced-obese subjects. *Metabolism* 1995;44:183-7.
56. Blaak EE, van Baak MA, Kempen KP, Saris WH. Role of alpha- and beta-adrenoceptors in sympathetically mediated thermogenesis. *Am J Physiol* 1993;264:E11-7.
57. Blaak EE, van Baak MA, Saris WH. Beta-adrenergically stimulated fat oxidation is diminished in middle- aged compared to young subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3764-9.
58. Bladergroen BA, Beynen AC, Geelen MJ. Dietary pectin lowers sphingomyelin concentration in VLDL and raises hepatic sphingomyelinase activity in rats. *J Nutr* 1999;129:628-33.
59. Blatniczky L, Kautzky L, Peter F. Insulin metabolism in hypothalamic obesity. *Exp Clin Endocrinol* 1990;96:83-9.
60. Bluher M, Windgassen M, Paschke R. Improvement of insulin sensitivity after adrenalectomy in patients with pheochromocytoma. *Diabetes Care* 2000;23:1591-2.

61. Bogardus C, Lillioja S, Ravussin E et al. Familial dependence of the resting metabolic rate. *N Engl J Med* 1986;315:96-100.
62. Bolin DJ, Jonas A. Sphingomyelin inhibits the lecithin-cholesterol acyltransferase reaction with reconstituted high density lipoproteins by decreasing enzyme binding. *J Biol Chem* 1996;271:19152-8.
63. Borsheim E, Knardahl S, Hostmark AT, Bahr R. Adrenergic control of post-exercise metabolism. *Acta Physiol Scand* 1998;162:313-23.
64. Bouchy M, Donner M, Andre JC. Evolution of fluorescence polarization of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) during the labelling of living cells. *Exp Cell Res* 1981;133:39-46.
65. Bougneres P, Le Stunff C, Pecqueur C, Pinglier E, Adnot P, Ricquier D. In vivo resistance of lipolysis to epinephrine. *J Clin Invest* 1997;99:2568-73.
66. Brands MW, Mizelle HL, Gaillard CA, Hildebrandt DA, Hall JE. The hemodynamic response to chronic hyperinsulinemia in conscious dogs. *Am J Hypertens* 1991;4:164-8.
67. Bray GA. Human obesity and some of its experimental counterparts. *Ann Nutr Aliment* 1979;33:17-25.
68. Bray, G. A. Hypothalamic and genetic obesity: an appraisal of the autonomic hypothesis and the endocrine hypothesis. *Int J Obes* 1984 ; Suppl 1:119-37.
69. Bray GA. Syndromes of hypothalamic obesity in man. *Pediatr Ann* 1984;13:525-36.
70. Bray GA. Autonomic and endocrine factors in the regulation of energy balance. *Fed Proc* 1986;45:1404-10.
71. Bray GA. 1989 McCollum Award lecture. Genetic and hypothalamic mechanisms for obesity--finding the needle in the haystack. *Am J Clin Nutr* 1989;50:891-902.
72. Bray, G. A. Obesity--a state of reduced sympathetic activity and normal or high adrenal activity (the autonomic and adrenal hypothesis revisited). *Int J Obes* 1990;14 Suppl 3, 77-91; discussion 91-2..
73. Bray, G. A. Obesity, a disorder of nutrient partitioning: the MONA LISA hypothesis. *J Nutr* 121(8), 1146-62. 91.
74. Bray GA. Reciprocal relation between the sympathetic nervous system and food intake. *Brain Res Bull* 1991;27:517-20.
75. Bray, G. A. Genetic, hypothalamic and endocrine features of clinical and experimental obesity. *Fed Prog* 1993; 333-40.
76. Bray, G. A. Sympathetic nervous system, adrenergic receptors, and obesity. *J Lab Clin Med* 134(1), 4-6. 99.
77. Bray GA. Reciprocal relation of food intake and sympathetic activity: experimental observations and clinical implications. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24 Suppl 2:S8-17.

78. Bray GA. Afferent signals regulating food intake. *Proc Nutr Soc* 2000;59:373-84.
79. Bray GA, Gallagher TF Jr. Manifestations of hypothalamic obesity in man: a comprehensive investigation of eight patients and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1975;54:301-30.
80. Bray GA, Greenway FL. Current and potential drugs for treatment of obesity. *Endocr Rev* 1999;20:805-75.
81. Brenner IK, Thomas S, Shephard RJ. Autonomic regulation of the circulation during exercise and heat exposure. Inferences from heart rate variability. *Sports Med* 1998;26:85-99.
82. Bronner C, Landry Y, Fonteneau P, Kuhry JG. A fluorescent hydrophobic probe used for monitoring the kinetics of exocytosis phenomena. *Biochemistry* 1986;25:2149-54.
83. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997;89:331-40.
84. Browne KF, Zipes DP, Heger JJ, Prystowsky EN. Influence of the autonomic nervous system on the Q-T interval in man. *Am J Cardiol* 1982;50:1099-103.
85. Buckett WR, Thomas PC, Luscombe GP. The pharmacology of sibutramine hydrochloride (BTS 54 524), a new antidepressant which induces rapid noradrenergic down-regulation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1988;12:575-84.
86. Buemann B, Astrup A, Madsen J, Christensen NJ. A 24-h energy expenditure study on reduced-obese and nonobese women: effect of beta-blockade. *Am J Clin Nutr* 1992;56:662-70.
87. Burns TW, Langley PE, Terry BE, Bylund DB. Studies on desensitization of adrenergic receptors of human adipocytes. *Metabolism* 1982;31:288-93.
88. Candiloros H, Zeghari N, Ziegler O, Donner M, Drouin P. Hyperinsulinemia is related to erythrocyte phospholipid composition and membrane fluidity changes in obese nondiabetic women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2912-8.
89. Capaldo B, Napoli R, Di Bonito P, Albano G, Sacca L. Dual mechanism of insulin action on human skeletal muscle: identification of an indirect component not mediated by FFA. *Am J Physiol* 1991;260:E389-94.
90. Capaldo B, Napoli R, Di Marino L, Sacca L. Epinephrine directly antagonizes insulin-mediated activation of glucose uptake and inhibition of free fatty acid release in forearm tissues. *Metabolism* 1992;41:1146-9.
91. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR et al. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 1996;348:159-61.
92. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine R. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 45:1455-62.

93. Caron MG, Lefkowitz RJ. Solubilization and characterization of the beta-adrenergic receptor binding sites of frog erythrocytes. *J Biol Chem* 1976;251:2374-84.
94. Castan I, Valet P, Lafontan M. Le récepteur du PYY: un élément important du système lipolytique de l'adipocyte. *Med Sci*10:196-201.
95. Chagnon YC, Perusse L, Bouchard C. Familial aggregation of obesity, candidate genes and quantitative trait loci. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:205-11.
96. Chamberlain KG, Pestell RG, Best JD. Platelet catecholamine contents are cumulative indexes of sympathoadrenal activity. *Am J Physiol* 1990;259:E141-7.
97. Chan RK, Sawchenko PE. Organization and transmitter specificity of medullary neurons activated by sustained hypertension: implications for understanding baroreceptor reflex circuitry. *J Neurosci* 1998;18:371-87.
98. Chapman MJ. Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. *J Lipid Res* 1980;21:789-853.
99. Christin L, O'Connell M, Bogardus C, Danforth E Jr, Ravussin E. Norepinephrine turnover and energy expenditure in Pima Indian and white men. *Metabolism* 1993;42:723-9.
100. Clandinin MT, Field CJ, Hargreaves K, Morson L, Zsigmond E. Role of diet fat in subcellular structure and function. *Can J Physiol Pharmacol* 1985;63:546-56.
101. Clement DL, De buyzere M, Duprez DD. Influence of drugs on blood pressure variability. *J of Hypertens* 1994;12:S49-S53.
102. Clement K, Vaisse C, Lahlou N et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998;392:398-401.
103. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT et al. Plasma norepinephrin as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart fealure. *N Eng J Med* 1984;311:819-23.
104. Collins S, Kuhn CM, Petro AE, Swick AG, Chrnyk BA, Surwit RS. Role of leptin in fat regulation. *Nature* 1996;380:677.
105. Connacher AA, Bennet WM, Jung RT et al. Effect of adrenaline infusion on fatty acid and glucose turn over in lean and obese human subjects in post-absorptive and fed states. *Clin Sci* 1991;81:635-44.
106. Connoley IP, Liu YL, Frost I, Reckless IP, Heal DJ, Stock MJ. Thermogenic effects of sibutramine and its metabolites. *Br J Pharmacol* 1999;126:1487-95.
107. Cooley, R. L., Montano, N., Cogliati, C., van de Borne, P., Richenbacher, W., Oren, R., and Somers, V. K. Evidence for a central origin of the low-frequency oscillation in RR-interval variability. *Circulation* 1998(6), 556-561.
108. Corbalan MS , Marti A, Forga L, Martinez-Gonzalez MA, Martinez JA. Beta(2)-Adrenergic receptor mutation and abdominal obesity risk: Effect modification by gender and HDL-cholesterol. *Eur J Nutr* 2002;41:114-8.

109. Correia ML, Haynes WG, Rahmouni K, Morgan DA, Sivitz WI, Mark AL. The concept of selective leptin resistance: evidence from agouti yellow obese mice. *Diabetes* 2002;51:439-42.
110. Correia ML, Morgan DA, Mitchell JL, Sivitz WI, Mark AL, Haynes WG. Role of corticotrophin-releasing factor in effects of leptin on sympathetic nerve activity and arterial pressure. *Hypertension* 2001;38:384-8.
111. Corry DB, Tuck ML. Obesity, hypertension, and sympathetic nervous system activity. *Curr Hypertens Rep* 1999;1:119-26.
112. Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin- scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem* 1997;272:6525-33.
113. Cowan MJ, Pike K, Burr RL. Effects of gender and age on heart rate variability in healthy individuals and in persons after sudden cardiac arrest. *J Electrocardiol* 1994;27 Suppl:1-9.
114. Crews FT, Raulli R, Gonzales R, Sumners C, Raizada M. Alpha 1-adrenergic receptor stimulated responses. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988;11 Suppl 1:S99-106.
115. Czarny M, Fiucci G, Lavie Y, Banno Y, Nozawa Y, Liscovitch M. Phospholipase D2: functional interaction with caveolin in low-density membrane microdomains. *FEBS Lett* 2000;467:326-32.
116. Danforth E Jr. Sibutramine and thermogenesis in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:1007-8.
117. Davidowski TA, Wolf S. The QT interval during reflex cardiovascular adaptation. *Circulation* 1984;69:22-5.
118. Davy KP, Horton T, Davy BM, Bessessen D, Hill JO. Regulation of macronutrient balance in healthy young and older men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:1497-502.
119. Di Paolo S, de Pergola G, Cospite MR et al. Beta-adrenoceptors desensitization may modulate catecholamine induced insulin resistance in human pheochromocytoma. *Diabete Metab* 1989;15:409-15.
120. DiMario FJ Jr, Bauer L, Volpe J, Cassidy SB. Respiratory sinus arrhythmia in patients with Prader-Willi syndrome. *J Child Neurol* 1996;11:121-5.
121. DiMario FJ Jr, Dunham B, Burlison JA, Moskovitz J, Cassidy SB. An evaluation of autonomic nervous system function in patients with Prader-Willi syndrome. *Pediatrics* 1994;93:76-81.
122. Ding ST, McNeel RL, Smith EO, Mersmann HJ. Modulation of porcine adipocyte beta-adrenergic receptors by a beta- adrenergic agonist. *J Anim Sci* 2000;78:919-26.
123. Dodt C, Lonroth P, Fehm HL, Elam M. Intraneural stimulation elicits an increase in subcutaneous interstitial glycerol levels in humans. *J Physiol* 1999;521 Pt 2:545-52.



124. Duan RD, Nilsson A. Sphingolipid hydrolyzing enzymes in the gastrointestinal tract. *Methods Enzymol* 2000;311:276-86.
125. Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L, Chantre P, Vandermander J. Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:252-8.
126. Dunbar JC, Lu H. Leptin-induced increase in sympathetic nervous and cardiovascular tone is mediated by proopiomelanocortin (POMC) products. *Brain Res Bull* 1999;50:215-21.
127. Dunbar JC, Lu H. Chronic intracerebroventricular insulin attenuates the leptin-mediated but not alpha melanocyte stimulating hormone increase in sympathetic and cardiovascular responses. *Brain Res Bull* 2000;52:123-6.
128. Dunning BE, Taborsky GJ Jr. Neural control of islet function by norepinephrine and sympathetic neuropeptides. *Adv Exp Med Biol* 1991;291:107-27.
129. Eckberg D. Sympathovagal balance. *Circulation* 1997;96:3224-32.
130. Eckberg DL, Harkins SW, Fritsch JM, Musgrave GE, Gardner DF. Baroreflex control of plasma norepinephrine and heart period in healthy subjects and diabetic patients. *J Clin Invest* 1986;78:366-74.
131. Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:103-13.
132. Egawa M, Yoshimatsu H, Bray GA. Effect of corticotropin releasing hormone and neuropeptide Y on electrophysiological activity of sympathetic nerves to interscapular brown adipose tissue. *Neuroscience* 1990;34:771-5.
133. Eid H, De Champlain J. Increased inositol monophosphate production in cardiovascular tissues of DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension* 1988;12:122-8.
134. El Hadri K, Fève B, Pairault J. Developmental expression and functional activity of beta 1- and beta 3- adrenoceptors in murine 3T3-F442A differentiating adipocytes. *Eur J Pharmacol* 1996;297:107-19.
135. Elias D, Rapoport M, Cohen IR, Shechter Y. Desensitization of the insulin receptor by antireceptor antibodies in vivo is blocked by treatment of mice with beta-adrenergic agonists. *J Clin Invest* 1988;81:1979-85.
136. Emdin M, Gastaldelli A, Muscelli E et al. Hyperinsulinemia and autonomic nervous system dysfunction in obesity: effects of weight loss. *Circulation* 2001;103:513-9.
137. Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 1997;387:90-4.
138. Engelhard VH, Glaser M, Storm DR. Effect of membrane phospholipid compositional changes on adenylate cyclase in LM cells. *Biochemistry* 1978;17:3191-200.

139. Engelmann B , Streich S, Schœnthier UM, Richter WO, Duhm J. Changes of membrane phospholipid composition of human erythrocytes in hyperlipidemias. Increased phosphatidylcholine and reduced sphingomyelin in patients with elevated levels of triglycerol-rich lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1992;1165:32-7.
140. Engfeldt P, Hellmer H, Wahrenberg H, Arner P. Effects of insulin on adrenoreceptor binding and the role of catecholamine-induced lipolysis in isolated human fat cells. *J Biol Chem* 1988;263:15553-60.
141. Enocksson S, Shimizu M, Lonqvist F, Nordenstrom J, Arner P. Demonstration of an in vivo functional beta 3-adrenoceptor in man. *J Clin Invest* 1995;95:2239-45.
142. Eriksson H, Ridderstrale M, Degerman E et al. Evidence for the key role of the adipocyte cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in the antilipolytic action of insulin. *Biochim Biophys Acta* 1995;1266:101-7.
143. Esler M, Jennings G, Korner P et al. Assessment of human sympathetic nervous system activity from measurements of norepinephrine turnover. *Hypertension* 1988;11:3-20.
144. Esler M, Rumantir M, Wiesner G, Kaye D, Hastings J, Lambert G. Sympathetic nervous system and insulin resistance: from obesity to diabetes. *Am J Hypertens* 2001;14:304S-9S.
145. Fagard RH. A population-based study on the determinants of heart rate and heart rate variability in the frequency domain. *Verh K Acad Geneesk Belg* 2001;63:57-89; discussion 90-1.
146. Fagius J, Niklasson F, Berne C. Sympathetic outflow in human muscle nerves increases during hypoglycemia. *Diabetes* 1986;35:1124-9.
147. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 1999;341:879-84.
148. Ferri C, Bellini C, Desideri G et al. Plasma endothelin-1 levels in obese hypertensive and normotensive men. *Diabetes* 1995;44:431-6.
149. Feve B, Baude B, Krief S, Strosberg AD, Pairault J, Emorine LJ. Inhibition by dexamethasone of beta 3-adrenergic receptor responsiveness in 3T3-F442A adipocytes. Evidence for a transcriptional mechanism. *J Biol Chem* 1992;267:15909-15.
150. Feve B, Elhadri K, Quignard-Boulangé A, Pairault J. Transcriptional down-regulation by insulin of the beta 3-adrenergic receptor expression in 3T3-F442A adipocytes: a mechanism for repressing the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:5677-81.
151. Fluckiger L, Boivin JM, Quilliot D, Jeandel C, Zannad F. Differential effects of aging on heart rate variability and blood pressure variability. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1999;54:B219-24.

152. Fra AM, Pasqualetto E, Mancini M, Sitia R. Genomic organization and transcriptional analysis of the human genes coding for caveolin-1 and caveolin-2. *Gene* 2000;243:75-83.
153. Freeman R, Weiss ST, Roberts M, Zbikowski SM, Sparrow D. The relationship between heart variability and measures of body habitus. *Clin Auton Res* 1995;5:261-6.
154. Friedewald WT, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
155. Frye J, Albert AD, Selinsky BS, Yeagle PL. Cross polarization P-31 nuclear magnetic resonance of phospholipids. *Biophys J* 1985;48:547-52.
156. Fukusaki C, Kawakubo K, Yamamoto Y. Assessment of the primary effect of aging on heart rate variability in humans. *Clin Auton Res* 2000;10:123-30 (abstr).
157. Funck-Brentano C, Kibleur Y, Le Coz F, Poirier JM, Mallet A, Jaillon P. Rate dependence of sotalol-induced prolongation of ventricular repolarization during exercise in humans. *Circulation* 1991;83:536-45.
158. Furlan R, Guzzetti S, Crivellaro W et al. Continuous 24-hour assessment of the neural regulation of systemic arterial pressure and RR variabilities in ambulant subjects. *Circulation* 1990;81:537-47.
159. Futerman AH, Stieger B, Hubbard AL, Pagano RE. Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 1990;265:8650-7.
160. Gasic S, Tian B, Green A. Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. *J Biol Chem* 1999;274:6770-5.
161. Gaskins HR, Hausman DB, Martin RJ, Hausman GJ. Evidence for abnormal prostaglandin synthesis in obese Zucker rat adipose cell cultures. *J Nutr* 1989;119:458-62 .
162. Gatt S, Bierman EL. Sphingomyelin suppresses the binding and utilization of low density lipoproteins by skin fibroblasts. *J Biol Chem* 1980;255:3371-6.
163. Geelen MJ, Beynen AC. Consumption of olive oil has opposite effects on plasma total cholesterol and sphingomyelin concentrations in rats. *Br J Nutr* 2000;83:541-7.
164. Gerritsen J, Dekker JM, TenVoorde BJ et al. Impaired autonomic function is associated with increased mortality, especially in subjects with diabetes, hypertension, or a history of cardiovascular disease: the Hoorn Study. *Diabetes Care* 2001;24:1793-8.
165. Giacobino JP. Role of the beta3-adrenoceptor in the control of leptin expression. *Horm Metab Res* 1996;28:633-7.
166. Gibson GJ. Obesity, respiratory function and breathlessness. *Thorax* 2000;55 Suppl 1:S41-4.

167. Gilmour J, Skuse D, Pembrey M. Hyperphagic short stature and Prader-Willi syndrome: a comparison of behavioural phenotypes, genotypes and indices of stress. *Br J Psychiatry* 2001;179:129-37.
168. Giudicelli Y, Lacasa D, Agli B. Evidence for a second desensitized state of beta-adrenergic receptor with low affinity for beta-antagonists and normal reactivity towards beta-agonists in adipocyte membranes previously exposed to beta-antagonists. *Eur J Biochem* 1979;99:457-62.
169. Goodman OB Jr, Krupnick JG, Santini F et al. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2- adrenergic receptor. *Nature* 1996;383:447-50.
170. Gotzsche O. Abnormal myocardial calcium uptake in streptozocin-diabetic rats. Evidence for a direct insulin effect on catecholamine sensitivity. *Diabetes* 1985;34:287-90.
171. Grand-Perret T, Bouillot A, Perrot A, Commans S, Walker M, Issandou M. SCAP ligands are potent new lipid-lowering drugs. *Nat Med* 2001;7:1332-8.
172. Grassi, G. Debating sympathetic overactivity as a hallmark of human obesity: a pro's position. *J Hypertens* 1999; 17(8), 1059-60.
173. Grassi G, Esler M. How to assess sympathetic activity in humans. *J Hypertens* 1999;17:719-34.
174. Grassi G, Seravalle G, Cattaneo BM et al. Sympathetic activation in obese normotensive subjects. *Hypertension* 1995;25:560-3.
175. Grassi G, Seravalle G, Colombo M et al. Body weight reduction, sympathetic nerve traffic, and arterial baroreflex in obese normotensive humans. *Circulation* 1998;97:2037-42.
176. Grassi G, Seravalle G, Dell'Oro R, Turri C, Bolla GB, Mancina G. Adrenergic and reflex abnormalities in obesity-related hypertension. *Hypertension* 2000;36:538-42.
177. Grasso R, Schena F, Gulli G, Cevese A. Does low-frequency variability of heart period reflect a specific parasympathetic mechanism? *J Auton Nerv Syst* 1997;63:30-8.
178. Green A, Carroll RM, Dobias SB. Desensitization of beta-adrenergic receptors in adipocytes causes increased insulin sensitivity of glucose transport. *Am J Physiol* 1996;271:E271-6.
179. Gregoire J, Tuck S, Yamamoto Y, Hughson RL. Heart rate variability at rest and exercise: influence of age, gender, and physical training. *Can J Appl Physiol* 1996;21:455-70.
180. Grujic D, Susulic VS, Harper ME et al. Beta3-adrenergic receptors on white and brown adipocytes mediate beta3- selective agonist-induced effects on energy expenditure, insulin secretion, and food intake. A study using transgenic and gene knockout mice. *J Biol Chem* 1997;272:17686-93.

181. Grunberger D, Haimovitz R, Shinitzky M. Resolution of plasma membrane lipid fluidity in intact cells labelled with diphenylhexatriene. *Biochim Biophys Acta* 1982;688:764-74.
182. Guerin J, Bioulac B, Henry P et al. *Système nerveux végétatif*. Sandoz Editions, 1989.
183. Guyton AC, Coleman TG. Quantitative analysis of the pathophysiology of hypertension. *Circ Res* 1969;24:1-19.
184. Guzzetti S, Piccaluga R, Cerruti S, Lombardi F, Pagani M, Malliani A. Sympathetic predominance in essential hypertension: a study employing spectral analysis of heart rate variability. *J Hypertens* 1988;6:711-7.
185. Hadri KE, Charon C, Pairault J, Hauguel-De Mouzon S, Quignard-Boulangé A, Fève B. Down-regulation of beta3-adrenergic receptor expression in rat adipose tissue during the fasted/fed transition: evidence for a role of insulin. *Biochem J* 1997;323 ( Pt 2):359-64.
186. Hadri KE, Courtalon A, Gauthereau X, Chambaut-Guerin AM, Pairault J, Fève B. Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptor gene expression in 3T3-F442A adipocytes. *J Biol Chem* 1997;272:24514-21.
187. Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidathusein N, Denton DA, Friedman JM. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:8878-83.
188. Hall JE, Hildebrandt DA, Kuo J. Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system. *Am J Hypertens* 2001;14:103S-15S.
189. Hansen DL, Toubro S, Stock MJ, Macdonald IA, Astrup A. Thermogenic effects of sibutramine in humans. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1180-6.
190. Hartman HB, Hu X, Tyler KX, Dalal CK, Lazar MA. Mechanisms regulating adipocyte expression of resistin. *J Biol Chem* 2002; 277:19754-61.
191. Hausberg M, Mark AL, Hoffman RP, Sinkey CA, Anderson EA. Dissociation of sympathoexcitatory and vasodilator actions of modestly elevated plasma insulin levels. *J Hypertens* 1995;13:1015-21.
192. Hausberg M, Mark AL, Winniford MD, Brown RE, Somers VK. Sympathetic and vascular effects of short-term passive smoke exposure in healthy nonsmokers. *Circulation* 1997;96:282-7.
193. Hausberg M, Morgan DA, Mitchell JL, Sivitz WI, Mark AL, Haynes WG. Leptin potentiates thermogenic sympathetic responses to hypothermia: a receptor-mediated effect. *Diabetes* 2002;51:2434-40.
194. Hayano J, Sakakibara Y, Yamada M et al. Diurnal variations in vagal and sympathetic cardiac control. *Am J Physiol* 1990;258:H642-6.
195. Haynes WG. Interaction between leptin and sympathetic nervous system in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2000;2:311-8.

196. Haynes WG, Morgan DA, Djalali A, Sivitz WI, Mark AL. Interactions between the melanocortin system and leptin in control of sympathetic nerve traffic. *Hypertension* 1999;33:542-7.
197. Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 1997;100:270-8.
198. Hellstrom L, Langin D, Reynisdottir S, Dazats M, Arner P. Adipocyte lipolysis in normal weight subjects with obesity among first-degree relatives. *Diabetologia* 1996;39:921-8.
199. Henis YI, Rimon G, Felder S. Lateral mobility of phospholipids in turkey erythrocytes. Implications for adenylate cyclase activation. *J Biol Chem* 1982;257:1407-11.
200. Hetherington A, Ranson SW. Hypothalamic lesions and adiposity in rat. *Anat Rec* 1940;78:149 (abstr).
201. Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K et al. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* 1999;282:1568-75.
202. Hirose H, Saito I, Tsujioka M, Mori M, Kawabe H, Saruta T. The obese gene product, leptin: possible role in obesity-related hypertension in adolescents. *J Hypertens* 1998;16:2007-12.
203. Hirsch JA, Bishop B. Respiratory sinus arrhythmia in humans : how breathing pattern modulates heart rate. *American Journal of Physiology* 1981;241:H620-H629.
204. Hoffman RP, Hausberg M, Sinkey CA, Anderson EA. Hyperglycemia without hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. *J Diabetes Complications* 1999;13:17-22.
205. Honegger UE, Quack G, Wiesmann UN. Evidence for lysosomotropism of memantine in cultured human cells: cellular kinetics and effects of memantine on phospholipid content and composition, membrane fluidity and beta-adrenergic transmission. *Pharmacol Toxicol* 1993;73:202-8.
206. Houslay MD, Needham L, Dodd NJ, Grey AM. Acidic phospholipid species inhibit adenylate cyclase activity in rat liver plasma membranes. *Biochem J* 1986;235:237-43.
207. Huang Q, Rivest R, Richard D. Effects of leptin on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis and CRF neuron activation in the paraventricular hypothalamic nucleus of obese (ob/ob) mice. *Endocrinology* 1998;139:1524-32.
208. Hyndman BW, Kitney RI, Sayers BM. Spontaneous rhythms in physiological control systems. *Nature* 1971;233:339-41.
209. Ikonen E. Molecular mechanisms of intracellular cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:60-4.
210. Inoue S, Bray GA. The effects of subdiaphragmatic vagotomy in rats with ventromedial hypothalamic obesity. *Endocrinology* 1977;100:108-14.

211. Ishiyama-Shigemoto S, Yamada K, Yuan X, Ichikawa F, Nonaka K. Association of polymorphisms in the beta2-adrenergic receptor gene with obesity, hypertriglyceridaemia, and diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999;42:98-101.
212. Izzo JL Jr, Taylor AA. The sympathetic nervous system and baroreflexes in hypertension and hypotension. *Curr Hypertens Rep* 1999;1:254-63.
213. Jackson HC, Needham AM, Hutchins LJ, Mazurkiewicz SE, Heal DJ. Comparison of the effects of sibutramine and other monoamine reuptake inhibitors on food intake in the rat. *Br J Pharmacol* 1997;121:1758-62.
214. Jackson RL, Morrisett JD, Gotto AM Jr. Lipoprotein structure and metabolism. *Physiol Rev* 1976;56:259-316.
215. Jamerson KA, Julius S, Gudbrandsson T, Andersson O, Brant DO. Reflex sympathetic activation induces acute insulin resistance in the human forearm. *Hypertension* 1993;21:618-23.
216. Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res* 2002;10:1-5.
217. Jansson C, Härmälä AS, Toivola DM, Slotte JP. Effects of the phospholipid environment in the plasma membrane on receptor interaction with the adenylyl cyclase complex of intact cells. *Biochem Biophys Acta* 1993;1145:311-9.
218. Jansson LHC. Glucose-induced changes in pancreatic islet blood flow mediated by central nervous system. *Am J Physiol* 1986;251:E644-E647.
219. Jeckel D, Karrenbauer A, Birk R, Schmidt RR, Wieland F. Sphingomyelin is synthesized in the cis Golgi. *FEBS Lett* 1990;261:155-7.
220. Jensen MD, Haymond HW, Rizza RA, Cryer PE, Miles JM. Influence of fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J Clin Invest* 1989;83:1167-73.
221. Jiang XC, Paultre F, Pearson TA et al. Plasma sphingomyelin level as a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2614-8.
222. Jordan D. CNS integration of cardiovascular regulation. *Cardiovac regul.* Portland Press, 1995.
223. Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 1997;272:18522-5.
224. Juan CC, Au LC, Fang VS et al. Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:1328-33.
225. Kaartinen J, Hreniuk S, Martin LF, Ranta S, Lanoue KF, Ohisalo JJ. Attenuated adenosine sensitivity and decreased adenosine receptor number in adipocyte plasma membranes in human obesity. *Biochem* 1991;J279:17-22.
226. Kaiser G, Wiemer G, Kremer G, Dietz J, Hellwich M, Palm D. Correlation between isoprenaline-stimulated synthesis of cyclic AMP and occurrence of beta-adrenoreceptors in immature erythrocytes from rats. *Eur J Pharmacol* 1978;48:255-62.

227. Kamath MV, Fallen EL. Power spectral analysis of heart rate variability: a noninvasive signature of cardiac autonomic function. *Crit Rev Biomed Eng* 1993;21:245-311.
228. Kato H, Ohue M, Kato K et al. Mechanism of amelioration of insulin resistance by beta3-adrenoceptor agonist AJ-9677 in the KK-Ay/Ta diabetic obese mouse model. *Diabetes* 2001;50:113-22.
229. Kaufman LN, Young JB, Landsberg L. Effect of protein on sympathetic nervous system activity in the rat. Evidence for nutrient-specific responses. *J Clin Invest* 1986;77:551-8.
230. Kawaguchi H, Sano H, Iizuka K et al. Phosphatidylinositol metabolism in hypertrophic rat heart. *Circ Res* 1993;72:966-72.
231. Kim JB, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* 1996;10:1096-107.
232. Kishida K, Shimomura I, Kondo H et al. Genomic structure and insulin-mediated repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel. *J Biol Chem* 2001;276:36251-60.
233. Kishida K, Shimomura I, Nishizawa H et al. Enhancement of the aquaporin adipose gene expression by a peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 2001;276:48572-9.
234. Kleiger RE, Bigger JT, Bosner MS et al. Stability over time of variables measuring heart rate variability in normal subjects. *Am J Cardiol* 1991;68:626-30.
235. Kolter T, Doering T, Wilkening G, Werth N, Sandhoff K. Recent advances in the biochemistry of glycosphingolipid metabolism. *Biochem Soc Trans* 1999;27:409-15.
236. Kopp-Hoolihan LE, van Loan MD, Wong WW, King JC. Longitudinal assessment of energy balance in well-nourished, pregnant women. *Am J Clin Nutr* 1999;69:697-704.
237. Korkushko OV, Shatilo VB, Plachinda Yul, Shatilo TV. Autonomic control of cardiac chronotropic function in man as a function of age: assessment by power spectral analysis of heart rate variability. *J Auton Nerv Syst* 1991;32:191-8.
238. Kortner B, Wolf A, Wendt D, Beisiegel U, Evans D. Lack of association between a human beta-2 adrenoceptor gene polymorphism (gln27glu) and morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:1099-100.
239. Kosaki A, Yamada K, Kuzuya H. Reduced expression of the leptin gene (ob) by catecholamine through a G(S) protein-coupled pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 1996;45:1744-9.
240. Koval M, Pagano RE. Lipid recycling between the plasma membrane and intracellular compartments: transport and metabolism of fluorescent sphingomyelin analogues in cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1989;108:2169-81.



241. Koval M, Pagano RE. Sorting of an internalized plasma membrane lipid between recycling and degradative pathways in normal and Niemann-Pick, type A fibroblasts. *J Cell Biol* 1990;111:429-42.
242. Koval M, Pagano RE. Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin. *Biochim Biophys Acta* 1991;1082:113-25.
243. Kuhry JG, Fonteneau P, Duportail G, Maechling C, Laustriat G. TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells. *Cell Biophys* 1983;5:129-40.
244. Kupari M, Virolainen J, Koskinen P, Tikkanen M. Short-term heart rate variability and factors modifying the risk of coronary artery disease in a population sample. *Am J of Cardiol* 1993;72:897-903.
245. Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Baron AD. Decreased effect of insulin to stimulate skeletal muscle blood flow in obese man. A novel mechanism for insulin resistance. *J Clin Invest* 1990;85:1844-52.
246. Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Baron AD. Effects of epinephrine on insulin-mediated glucose uptake in whole body and leg muscle in humans: role of blood flow. *Am J Physiol* 1992;263:E199-204.
247. Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Baron AD. Impaired insulin-mediated skeletal muscle blood flow in patients with NIDDM. *Diabetes* 1992;41:1076-83.
248. Lafontan M, Berlan M. Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocr Rev* 1995;16:716-38.
249. Lafontan M, Bousquet-Melou A, Galitzky J et al. Adrenergic receptors and fat cells: differential recruitment by physiological amines and homologous regulation. *Obes Res* 1995;3 Suppl 4:507S-14S.
250. Laitinen T, Vauhkonen IK, Niskanen LK et al. Power spectral analysis of heart rate variability during hyperinsulinemia in nondiabetic offspring of type 2 diabetic patients: evidence for possible early autonomic dysfunction in insulin-resistant subjects. *Diabetes* 1999;48:1295-9.
251. Landsberg L. Insulin-mediated sympathetic stimulation: role in the pathogenesis of obesity-related hypertension (or, how insulin affects blood pressure, and why). *J Hypertens* 2001;19:523-8.
252. Landsberg L, Greff L, Gunn S, Young JB. Adrenergic mechanisms in the metabolic adaptation to fasting and feeding: effects of phlorizin on diet-induced changes in sympathoadrenal activity in the rat. *Metabolism* 1980;29:1128-37.
253. Landsberg L, Young JB. Insulin-mediated glucose metabolism in the relationship between dietary intake and sympathetic nervous system activity. *Int J Obes* 1985;9 Suppl 2:63-8.
253. Large V, Hellstrom L, Reynisdottir S et al. Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function. *J Clin Invest* 1997;100:3005-13.

254. Larsson LI, Boder GB, Shaw WS. Changes in the islets of Langerhans in the obese Zucker rat. *Labor Invest* 1977;36:593-8.
256. Laude D, Weise F, Girard A, Elghozi JL. Spectral analysis of systolic blood pressure and heart rate oscillations related to respiration. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;22:352-7.
257. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR et al. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* 1999;104:R25-31.
258. Lawrence VJ, Coppack SW. The endocrine function of the fat cell-regulation by the sympathetic nervous system. *Horm Metab Res* 2000;32:453-67.
259. Le Floch JP, Escuyer P, Baudin E, Baudon D, Perlemuter L. Blood glucose area under the curve. Methodological aspects. *Diabetes Care* 1990;13:172-5.
260. Le Lay S, Krief S, Farnier C et al. Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes. *J Biol Chem* 2001;276:16904-10.
261. Leal MA, Aller P, Mas A, Calle C. The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on insulin binding, insulin receptor mRNA levels, and isotype RNA pattern in U-937 human promonocytic cells. *Exp Cell Res* 1995;217:189-94.
262. Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S et al. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* 1998;279:1552-5.
263. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 1995;270:12953-6.
264. Lembo G, Capaldo B, Rendina V et al. Acute noradrenergic activation induces insulin resistance in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 1994;266:E242-7.
265. Lembo G, Napoli R, Capaldo B et al. Abnormal sympathetic overactivity evoked by insulin in the skeletal muscle of patients with essential hypertension. *J Clin Invest* 1992;90:24-9.
266. Leppimaki P, Kronqvist R, Slotte JP. The rate of sphingomyelin synthesis de novo is influenced by the level of cholesterol in cultured human skin fibroblasts. *Biochem J* 1998;335 ( Pt 2):285-91.
267. Levade T, Gatt S, Maret A, Salvayre R. Different pathways of uptake and degradation of sphingomyelin by lymphoblastoid cells and the potential participation of the neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1991;266:13519-29.
268. Levade T, Gatt S, Salvayre R. Uptake and degradation of several pyrenesphingomyelins by skin fibroblasts from control subjects and patients with Niemann-Pick disease. Effect of the structure of the fluorescent fatty acyl residue. *Biochem J* 1991;275 ( Pt 1):211-7.
269. Levine JA, Eberhardt NL, Jensen MD. Role of nonexercise activity thermogenesis in resistance to fat gain in humans. *Science* 1999;283:212-4.

270. Liang C, Doherty JU, Faillace R et al. Insulin infusion in conscious dogs. Effects on systemic and coronary hemodynamics, regional blood flows, and plasma catecholamines. *J Clin Invest* 1982;69:1321-36.
271. Lillioja S, Young AA, Culter CL et al. Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man. *J Clin Invest* 1987;80:415-24.
272. Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J et al. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 1994;126:111-26.
273. Lisanti MP, Tang Z, Scherer PE, Kubler E, Koleske AJ, Sargiacomo M. Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation. *Mol Membr Biol* 1995;12:121-4.
274. Litovsky SH, Antzelevitch C. Differences in the electrophysiological response of canine ventricular subendocardium and subepicardium to acetylcholine and isoproterenol. A direct effect of acetylcholine in ventricular myocardium. *Circ Res* 1990;67:615-27.
275. Liu D, Andreasson K, Lins PE, Adamson UC, Macdonald IA. Adrenaline and noradrenaline responses during insulin-induced hypoglycaemia in man: should the hormone levels be measured in arterialized venous blood? *Acta Endocrinol* 1993;128:95-8.
276. Liu YL, Cawthorne MA, Stock MJ. Biphasic effects of the beta-adrenoceptor agonist, BRL 37344, on glucose utilization in rat isolated skeletal muscle. *Br J Pharmacol* 1996;117:1355-61.
277. Lonnqvist F, Wahrenberg H, Hellstrom L, Reynisdottir S, Arner P. Lipolytic catecholamine resistance due to decreased beta 2-adrenoceptor expression in fat cells. *J Clin Invest* 1992; 90:2175-86 .
278. Lossius K, Eriksen M. Connection between skin arteriovenous shunt flow fluctuations and heart rate variability in infants. *Early Hum Dev* 1994;39:69-82.
279. Lossius K, Eriksen M, Walloe L. Thermoregulatory fluctuations in heart rate and blood pressure in humans: effect of cooling and parasympathetic blockade. *J Auton Nerv Syst* 1994;47:245-54.
280. Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 1993;366:740-2.
281. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
282. Lu H, Buisson A, Jen KC, Dunbar JC. Leptin resistance in obesity is characterized by decreased sensitivity to proopiomelanocortin products. *Peptides* 2000;21:1479-85.

283. Luberto C, Hannun YA. Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation. Does sphingomyelin synthase account for the putative phosphatidylcholine-specific phospholipase C? *J Biol Chem* 1998;273:14550-9.
284. Lundgren F, Eden E, Arfvidsson B, Lundholm K. Insulin time-dependent effects on the leg exchange of glucose and amino acids in man. *Eur J Clin Invest* 1991;21:421-9.
285. Luo Y, Tall AR. Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J Clin Invest* 2000;105:513-20.
286. Lupien JR, Bray GA. Effect of mazindol, d-amphetamine and diethylpropion on purine nucleotide binding to brown adipose tissue. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;25:733-8.
287. Lupien JR, Bray GA. Nicotine increases thermogenesis in brown adipose tissue in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1988;29:33-7.
288. Lupien JR, Tokunaga K, Kemnitz JW, Groos E, Bray GA. Lateral hypothalamic lesions and fenfluramine increase thermogenesis in brown adipose tissue. *Physiol Behav* 1986;38:15-20.
289. Luscombe GP, Hopcroft RH, Thomas PC, Buckett WR. The contribution of metabolites to the rapid and potent down-regulation of rat cortical beta-adrenoceptors by the putative antidepressant sibutramine hydrochloride. *Neuropharmacology* 1989;28:129-34.
290. Lustig RH, Rose SR, Burghen GA et al. Hypothalamic obesity caused by cranial insult in children: altered glucose and insulin dynamics and reversal by a somatostatin agonist. *J Pediatr* 1999;135:162-8.
291. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 1999;283:655-61.
292. Ma Z, Meddings JB, Lee SS. Membrane physical properties determine cardiac beta-adrenergic receptor function in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1994;267:G87-93.
293. Macdonald IA. How do we study autonomic function in humans? *Fundam Clin Pharmacol* 1995;9:443-9.
294. Macdonald, I. A. Advances in our understanding of the role of the sympathetic nervous system in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; Suppl 7: S2-S7.
295. Macdonald IA, Bennett T, Fellows IW. Catecholamines and the control of metabolism in man. *Clin Sci* 1985;68:613-9.
296. MacDonald IA, Bennett T, Gale EA, Green JH, Walford S. The effect of propranolol or metoprolol on thermoregulation during insulin-induced hypoglycaemia in man. *Clin Sci* 1982;63:301-10.
297. Magana MM, Koo SH, Towle HC, Osborne TF. Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase. *J Biol Chem* 2000;275:4726-33.

298. Magana MM, Osborne TF. Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *J Biol Chem* 1996;271:32689-94.
299. Magnano AR, Holleran S, Ramakrishnan R, Reiffel JA, Bloomfield DM. Autonomic nervous system influences on QT interval in normal subjects. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1820-6.
300. Malliani A, Lombardi F, Pagani M. Power spectrum analysis of heart rate variability: a tool to explore neural regulatory mechanisms. *Br Heart J* 1994;71:1-2.
301. Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 1991;84:482-92.
302. Mandrup S, Lane MD. Regulating adipogenesis. *J Biol Chem* 1997;272:5367-70.
303. Mantzoros CS, Frederich RC, Qu D, Lowell BB, Maratos-Flier E, Flier JS. Severe leptin resistance in brown fat-deficient uncoupling protein promoter-driven diphtheria toxin A mice despite suppression of hypothalamic neuropeptide Y and circulating corticosterone concentrations. *Diabetes* 1998;47:230-8.
304. Marathe S, Choi Y, Leventhal AR, Tabas I. Sphingomyelinase converts lipoproteins from apolipoprotein E knockout mice into potent inducers of macrophage foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2607-13.
305. Marathe S, Schissel SL, Yellin MJ et al. Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *J Biol Chem* 1998;273:4081-8.
306. Margolis RU , Altszuler N. Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature* 1967;215:1375-6.
307. Marion-Latard F, De Glisezinski I, Crampes F et al. A single bout of exercise induces beta-adrenergic desensitization in human adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;280:R166-73.
308. Marple SL. Digital spectral analysis with applications. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1987.
309. Martin GJ, Magid NM, Myers G et al. Heart rate variability and sudden death secondary to coronary artery disease during ambulatory electrocardiographic monitoring. *Am J Cardiol* 1987;60:86-9.
310. Martin WH, Ogawa T, Kohrt WM et al. Effects of aging, gender and physical training on peripheral vascular function. *Circulation* 1991;84:654-64.
311. Martinez-Mir I, Navarro-Badenes J, Palop V, Morales-Olivas FJ, Rubio E. Weight gain induced by long-term propranolol treatment. *Ann Pharmacother* 1993;27:512.
312. Masuo K. Obesity-related hypertension: role of the sympathetic nervous system, insulin, and leptin. *Curr Hypertens Rep* 2002;4:112-8.
313. Masuo K, Mikami H, Itoh M, Ogihara T, Tuck ML. Sympathetic activity and body mass index contribute to blood pressure levels. *Hypertens Res* 2000;23:303-10.

314. Masuo, K., Mikami, H., Ogihara, T., and Tuck, M. L. Differences in insulin and sympathetic responses to glucose ingestion due to family history of hypertension. *Am J Hypertens* 1996, 9: 739-45.
315. Matsumoto, T., Miyawaki, C., Ue, H., Kanda, T., Yoshitake, Y., and Moritani, T. Comparison of thermogenic sympathetic response to food intake between obese and non-obese young women. *Obes Res* 9(2), 78-85. 2001.
316. Matsumoto, T., Miyawaki, T., Ue, H., Kanda, T., Zenji, C., and Moritani, T. Autonomic responsiveness to acute cold exposure in obese and non-obese young women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23(8), 793-800. 99.
317. Matsumura K, Tsuchihashi T, Abe I. Central cardiovascular action of neuropeptide Y in conscious rabbits. *Hypertension* 2000;36:1040-4.
318. Matsuo T, Sumida H, Suzuki M. Beef tallow diet decreases beta-adrenergic receptor binding and lipolytic activities in different adipose tissues of rat. *Metabolism* 1995;44:1271-7.
319. Matthews DR , Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA. Homeostasis model assesment: insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
320. Mauriege P, Despres JP, Prud'homme D et al. Regional variation in adipose tissue lipolysis in lean and obese men. *J Lipid Res* 1991;32:1625-33.
321. Mauriege P, Imbeault P, Langin D et al. Regional and gender variations in adipose tissue lipolysis in response to weight loss. *J Lipid Res* 1999;40:1559-71.
322. Mei J, Holst LS, Landstrom TR et al. C(2)-ceramide influences the expression and insulin-mediated regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 2002;51:631-7.
323. Meirhaeghe A, Helbecque N, Cottel D, Amouyel P. Impact of polymorphisms of the human beta2-adrenoceptor gene on obesity in a French population. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:382-7.
324. Meirhaeghe A, Luan J, Selberg-Franks P et al. The effect of the Gly16Arg polymorphism of the beta(2)-adrenergic receptor gene on plasma free fatty acid levels is modulated by physical activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5881-7.
325. Mersmann HJ, McNeel RL, Morkeberg JC, Shparber A, Hachey DL. Beta-adrenergic receptor-mediated functions in porcine adipose tissue are not affected differently by saturated vs unsaturated dietary fats. *J Nutr* 1992;122:1952-9.
326. Mesangeau D , Laude D, Elghozi JL. Early detection of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetic pigs using blood pressure and heart rate variability. *Cardiovasc Res* 2000;45:889-99.
327. Micheli M, Albi E, Leray C, Magni MV. Nuclear sphingomyelin protects RNA from RNase action. *FEBS Lett* 1998;431:443-7.
328. Millet L, Barbe P, Lafontan M, Berlan M, Galitzky J. Catecholamine effects on lipolysis and blood flow in human abdominal and femoral adipose tissue. *J Appl Physiol* 1998;85:181-8.

329. Miyasaki K, Miyachi Y, Arimitsu K, Kita E, Yoshida M. Post-traumatic hypothalamic obesity-an autopsy case. *Acta Pathol Jpn* 1972;22:779-802.
330. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997;387:903-8.
331. Montano N, Cogliati C, da Silva VJ et al. Effects of spinal section and of positive-feedback excitatory reflex on sympathetic and heart rate variability. *Hypertension* 2000;36:1029-34.
332. Montano N, Lombardi F, Gneccchi Ruscone T et al. Spectral analysis of sympathetic discharge, R-R interval and systolic arterial pressure in decerebrate cats. *J Auton Nerv Syst* 1992;40:21-31.
333. Morgan DA, Balon TW, Ginsberg BH, Mark AL. Nonuniform regional sympathetic nerve responses to hyperinsulinemia in rats. *Am J Physiol* 1993;264:R423-7.
334. Mori Y, Kim-Motoyama H, Ito Y et al. The Gln27Glu beta2-adrenergic receptor variant is associated with obesity due to subcutaneous fat accumulation in Japanese men. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;258:138-40.
335. Mulder L, Mulder LJM. Information processing and cardiovascular control. *Psychophysiology* 1981;18:392-402.
336. Muller M. Transcriptional control of hepatocanalicular transporter gene expression. *Semin Liver Dis* 2000;20:323-37.
337. Mulvany MJ. Structure and function of small arteries in hypertension. *J Hypertens Suppl* 1990 ;8:S225-32 .
338. Muntzel M, Beltz T, Mark AL, Johnson AK. Anteroventral third ventricle lesions abolish lumbar sympathetic responses to insulin. *Hypertension* 1994;23:1059-62.
339. Muntzel MS, Morgan DA, Mark AL, Johnson AK. Intracerebroventricular insulin produces nonuniform regional increases in sympathetic nerve activity. *Am J Physiol* 1994;267:R1350-5.
340. Mussalo H, Vanninen E, Ikaheimo R et al. Heart rate variability and its determinants in patients with severe or mild essential hypertension. *Clin Physiol* 2001;21:594-604.
341. Natali A, Bonadonna R, Santoro D et al. Insulin resistance and vasodilation in essential hypertension. Studies with adenosine. *J Clin Invest* 1994;94:1570-6.
342. Neelands PJ, Clandinin MT. Diet fat influences liver plasma-membrane lipid composition and glucagon-stimulated adenylate cyclase activity. *Biochem J* 1983;212:573-83.
343. Nelson DH, Murray DK. Dexamethasone increases the synthesis of sphingomyelin in 3T3-L1 cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:6690-2.
344. Nelson DH, Murray DK, Brady RO. Dexamethasone-induced change in the sphingomyelin content of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;54:292-5.

345. Nicolas C, Lacasa D, Giudicelli Y et al. Dietary (n-6) polyunsaturated fatty acids affect beta-adrenergic receptor binding and adenylate cyclase activity in pig adipocyte plasma membrane. *J Nutr* 1991;121:1179-86.
346. Nielson CP, Vestal RE.  $\alpha$ -adrenoreceptors,  $\beta$ -adrenoreceptors and aging. In: Amery A, Staessen J, eds. *Handbook of hypertension* 1989;12:51-62.
347. Niimi M, Sato M, Taminato T. Neuropeptide Y in central control of feeding and interactions with orexin and leptin. *Endocrine* 2001;14:269-73.
348. Nilsson A. Conversion of dihydrosphingosin to palmitaldehyde and palmitic acid with cell-free preparations of guinea pig intestinal mucosa. *Acta Chem Scand* 1970;24:598-604.
349. Nonogaki K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 2000;43:533-49.
350. Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res* 1999;40:1549-58.
351. Oberkofler H, Esterbauer H, Hell E, Krempler F, Patsch W. The Gln27Glu polymorphism in the beta2-adrenergic receptor gene is not associated with morbid obesity in Austrian women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:388-90.
352. Ohanian J, Ohanian V. Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:2053-68.
353. Ohvo H, Slotte JP. Cyclodextrin-mediated removal of sterols from monolayers: effects of sterol structure and phospholipids on desorption rate. *Biochemistry* 1996;35:8018-24.
354. Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the membrane. *J Biol Chem* 1998;273:5419-22.
355. Okuda H, Morimoto C, Tsujita T. Role of endogenous lipid droplets in lipolysis in rat adipocytes. *J Lipid Res* 1994;35:36-44.
356. Okuda H, Morimoto C, Tsujita T. Effect of substrates on the cyclic AMP-dependent lipolytic reaction of hormone-sensitive lipase. *J Lipid Res* 1994;35:1267-73.
357. Okwu AK, Xu XX, Shiratori Y, Tabas I. Regulation of the threshold for lipoprotein-induced acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase stimulation in macrophages by cellular sphingomyelin content. *J Lipid Res* 1994;35:644-55.
358. Olansky L, Pohl SL. beta-Adrenergic desensitization by chronic insulin exposure in 3T3-L1 cultured adipocytes. *Metabolism* 1984;33:76-81.
359. Oliver FJ, de la Rubia G, Feener EP et al. Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells. *J Biol Chem* 1991;266:23251-6.
360. Oppert JM, Tourville J, Chagnon M et al. DNA polymorphisms in the alpha 2- and beta 2-adrenoceptor genes and regional fat distribution in humans: association and linkage studies. *Obes Res* 1995;3:249-55.



361. Oram JF. Tangier disease and ABCA1. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:321-30.
362. Oram JF, Lawn RM. ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res* 2001;42:1173-9.
363. Orso E, Broccardo C, Kaminski WE et al. Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat Genet* 2000;24:192-6.
364. Ostrom RS, Gregorian C, Drenan RM, Xiang Y, Regan JW, Insel PA. Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 2001;276:42063-9.
365. Ostrom RS, Violin JD, Coleman S, Insel PA. Selective enhancement of beta-adrenergic receptor signaling by overexpression of adenylyl cyclase type 6: colocalization of receptor and adenylyl cyclase in caveolae of cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 2000;57:1075-9.
366. Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3686-95.
367. Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res* 1986;59:178-93.
368. Paolisso, G., Manzella, D., Ferrara, N., Gambardella, A., Abete, P., Tagliamonte, M. R., De Lucia, D., Furgi, G., Picone, C., Gentile, S., Rengo, F., and Varricchio, M. Glucose ingestion affects cardiac ANS in healthy subjects with different amounts of body fat. *Am J Physiol* 1997;273(3 Pt 1): E471-8.
369. Paolisso G, Manzella D, Montano N, Gambardella A, Varricchio M. Plasma leptin concentrations and cardiac autonomic nervous system in healthy subjects with different body weights. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1810-4.
370. Paolisso G, Manzella D, Rizzo MR et al. Elevated plasma fatty acid concentrations stimulate the cardiac autonomic nervous system in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2000;72:723-30.
371. Paolisso G, Tagliamonte MR, Galderisi M et al. Plasma leptin concentration, insulin sensitivity, and 24-hour ambulatory blood pressure and left ventricular geometry. *Am J Hypertens* 2001;14:114-20.
372. Parrish CC, Myher JJ, Kuksis A, Angel A. Lipid structure of rat adipocyte plasma membranes following dietary lard and fish oil. *Biochim Biophys Acta* 1997;1323:253-62.
373. Pasanisi F, Imperatore G, Vaccaro O, Iovine C, Ferrara LA. Effects of a 3-month treatment with terazosin on fasting and postprandial glucose and lipid metabolism in type 2 diabetic patients with hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1999;9:73-7.

374. Patel JN, Eisenhofer G, Coppack SW, Miles JM. Norepinephrine spillover in forearm and subcutaneous adipose tissue before and after eating. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2815-9.
375. Patten GS, Rinaldi JA, McMurchie EJ. Effects of dietary eicosapentaenoate (20:5 n-3) on cardiac beta- adrenergic receptor activity in the marmoset monkey. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;162:686-93.
376. Peet DJ, Turley SD, Ma W et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998;93:693-704.
377. Penicaud, L., Cousin, B., Leloup, C., Atef, N., and Ktorza, A. [Autonomic nervous system and development of obesity in the rodent]. *Journ* :129-40., 129-40. 95. Notes: TRANSLIT/VERNAC TITLE: Systeme nerveux autonome et developpement de l'obesite chez le rongeur.
378. Perkin Elmer applied Biosystem. 1999;bulletin 2.
379. Perry DK. The role of de novo ceramide synthesis in chemotherapy-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2000;905:91-6.
380. Perry DK, Hannun YA. The role of ceramide in cell signaling. *Biochim Biophys Acta* 1998;1436:233-43.
381. Peterson, H. R., Rothschild, M., Weinberg, C. R., Fell, R. D., McLeish, K. R., and Pfeifer, M. A. Body fat and the activity of the autonomic nervous system. *N Engl J Med* 318(17), 1077-83. 88.
382. Petretta M, Bonaduce D, de Filippo E et al. Assessment of cardiac autonomic control by heart period variability in patients with early-onset familial obesity. *Eur J Clin Invest* 1995;25:826-32.
383. Pfeilschifter J, Huwiler A. Ceramides as Key Players in Cellular Stress Response. *News Physiol Sci* 2000;15:11-5.
384. Piccirillo G, Vetta F, Fimognari FL et al. Power spectral analysis of heart rate variability in obese subjects: evidence of decreased cardiac sympathetic responsiveness. *Int J Obes* 1996;20:825-9.
385. Piccirillo G, Vetta F, Viola E et al. Heart rate and blood pressure variability in obese normotensive subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998;22:741-50.
386. Pigozzi F, Alabiso A, Parisi A et al. Effects of aerobic exercise training on 24 hr profile of heart rate variability in female athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 2001;41:101-7.
387. Pinkney JH, Coppack SW, Mohamed-Ali V. Effect of isoprenaline on plasma leptin and lipolysis in humans. *Clin Endocrinol* 1998;48:407-11.
388. Pogacnik T, Sega S, Pecnik B, Kiauta T. Autonomic function testing in patients with migraine. *Headache* 1993;33:545-50.
389. Pomeranz B, Macaulay RJ, Caudill MA et al. Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. *Am J Physiol* 1985;248:H151-3.

390. Ponikowski P, Anker S, Chua TP et al. Depressed heart rate variability as an independent predictor of death in chronic congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1997;79:1645-50.
391. Porter MH, Cutchins A, Fine JB, Bai Y, DiGirolamo M. Effects of TNF-alpha on glucose metabolism and lipolysis in adipose tissue and isolated fat-cell preparations. *J Lab Clin Med* 2002;139:140-6.
392. Portillo MP, Tueros AI, Perona JS, Ruiz-Gutierrez V, Torres I, Macarulla MT. Modifications induced by dietary lipid source in adipose tissue phospholipid fatty acids and their consequences in lipid mobilization. *Br J Nutr* 1999;82:319-27.
393. Pruijn FB, van Gelderen JG, Bast A. The effects of radical stress and N-ethylmaleimide on rat hepatic alpha 1-adrenergic receptors. *Toxicol Lett* 1989;45:73-82.
394. Quilliot D, Fluckiger L, Zannad F, Drouin P, Ziegler O. Impaired autonomic control of heart rate and blood pressure in obesity: role of age and of insulin-resistance. *Clin Auton Res* 2001;11:79-86.
395. Raben A, Holst JJ, Christensen NJ, Astrup A. Determinants of postprandial appetite sensations: macronutrient intake and glucose metabolism. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996;20:161-9.
396. Rahmouni K, Haynes WG, Morgan DA, Mark AL. Selective resistance to central neural administration of leptin in agouti obese mice. *Hypertension* 2002;39:486-90.
397. Raitakari M, Knuuti MJ, Ruotsalainen U et al. Insulin increases blood volume in human skeletal muscle: studies using [<sup>15</sup>O] carbon monoxide. *Am J Physiol* 1995;269:E1000-5.
398. Raitakari M, Nuutila P, Ruotsalainen U et al. Evidence for dissociation of insulin stimulation of blood flow and glucose uptake in human skeletal muscle: studies using. *Diabetes* 1996;45:1471-7.
399. Ramaekers D, Ector H, Aubert AE. The influence of age and gender on heart rate variability (HRV). *J Am Coll Cardiol* 1999;33:900-2.
400. Ramstedt B, Slotte JP. Interaction of cholesterol with sphingomyelins and acyl-chain-matched phosphatidylcholines: a comparative study of the effect of the chain length. *Biophys J* 1999;76:908-15.
401. Randin D, Vollenweider P, Tappy L, Jequier E, Nicod P, Scherrer U. Effects of adrenergic and cholinergic blockade on insulin-induced stimulation of calf blood flow in humans. *Am J Physiol* 1994;266:R809-16.
402. Rau H, Reaves BJ, O'Rahilly S, Whitehead JP. Truncated human leptin (delta133) associated with extreme obesity undergoes proteasomal degradation after defective intracellular transport. *Endocrinology* 1999;140:1718-23.
403. Ravussin E. Low resting metabolic rate as a risk factor for weight gain: role of the sympathetic nervous system. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19 Suppl 7:S8-S9.

404. Ravussin E, Lillioja S, Anderson TE, Christin L, Bogardus C. Determinants of 24-hour energy expenditure in man. Methods and results using a respiratory chamber. *J Clin Invest* 1986;78:1568-78.
405. Ravussin E, Lillioja S, Knowler WC et al. Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body-weight gain. *N Engl J Med* 1988;318:467-72.
406. Redgrave TG, Rakic V, Mortimer BC, Mamo JC. Effects of sphingomyelin and phosphatidylcholine acyl chains on the clearance of triacylglycerol-rich lipoproteins from plasma. Studies with lipid emulsions in rats. *Biochim Biophys Acta* 1992;1126:65-72.
407. Reynisdottir S, Ellerfeldt K, Wahrenberg H, Lithell H, Arner P. Multiple lipolysis defects in the insulin resistance (metabolic) syndrome. *J Clin Invest* 1994;93:2590-9.
408. Reynisdottir S, Langin D, Carlstrom K, Holm C, Rossner S, Arner P. Effects of weight reduction on the regulation of lipolysis in adipocytes of women with upper-body obesity. *Clin Sci* 1995;89:421-9.
409. Reynisdottir S, Wahrenberg H, Carlstrom K, Rossner S, Arner P. Catecholamine resistance in fat cells of women with upper-body obesity due to decreased expression of beta 2-adrenoceptors. *Diabetologia* 1994;37:428-35.
410. Richey JM, Poulin RA, Buchanan TA, Galperin E, Moore DM, Bergman RN. Failure of acute hyperinsulinemia to alter blood pressure is not due to baroreceptor feedback. *Am J Hypertens* 1999;12:405-13.
411. Ridgway ND. 25-Hydroxycholesterol stimulates sphingomyelin synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J Lipid Res* 1995;36:1345-58.
412. Rimoldi O, Pierini S, Ferrari A, Cerutti S, Pagani M, Malliani A. Analysis of short-term oscillations of R-R and arterial pressure in conscious dogs. *Am J Physiol* 1990;258:H967-76.
413. Robbe HWJ, Mulder LJM, Ruddel H, Langewitz WA, Veldman JBP, Mulder G. Assessment of baroreceptor reflex sensitivity by means of spectral analysis. *Hypertension* 1987;10:538-43.
414. Robinson BG, Mealy K, Wilmore DW, Majzoub JA. The effect of insulin-induced hypoglycemia on gene expression in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the rat. *Endocrinology* 1992;130:920-5.
415. Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Consequences of ventromedial hypothalamic lesions upon insulin and glucagon secretion by subsequently isolated perfused pancreases in the rat. *J Clin Invest* 1980;65:902-10.
416. Rose HG, Oklander M. Improved procedure for extraction of lipids from human erythrocytes. *J Lipid Res* 1965;6:428-431
417. Rosenstock M, Greenberg AS, Rudich A. Distinct long-term regulation of glycerol and non-esterified fatty acid release by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* 2001;44:55-62.

418. Rossner S, Taylor CL, Byington RP, Furberg CD. Long term propranolol treatment and changes in body weight after myocardial infarction. *BMJ* 1990;300:902-3.
419. Roth C, Wilken B, Hanefeld F, Schroter W, Leonhardt U. Hyperphagia in children with craniopharyngioma is associated with hyperleptinaemia and a failure in the downregulation of appetite. *Eur J Endocrinol* 1998;138:89-91.
420. Rowe JW, Young JB, Minaker KL, Stevens AL, Pallotta J, Landsberg L. Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal man. *Diabetes* 1981;30:219-25.
421. Rumantir MS, Vaz M, Jennings GL et al. Neural mechanisms in human obesity-related hypertension. *J Hypertens* 1999;17:1125-33.
422. Ryan SM, Goldberger AL, Pincus SM, Mietus J, Lipsitz LA. Gender- and age-related differences in heart rate dynamics: are women more complex than men? *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1700-7.
423. Ryden M, Dicker A, van Harmelen V et al. Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha - mediated lipolysis in human fat cells. *J Biol Chem* 2002;277:1085-91.
424. Saad MF, Alger SA, Zurlo F, Young JB, Bogardus C, Ravussin E. Ethnic differences in sympathetic nervous system-mediated energy expenditure. *Am J Physiol* 1991;261:E789-94.
425. Saad MF, Lillioja S, Nyomba BL et al. Racial differences in the relation between blood pressure and insulin resistance. *N Engl J Med* 1991;324:733-9.
426. Saito H, Arimoto I, Tanaka M et al. Inhibition of lipoprotein lipase activity by sphingomyelin: role of membrane surface structure. *Biochim Biophys Acta* 2000;1486:312-20.
427. Saito T, Satoh S, Kawasaki S et al. Three patients with adrenal tumors having been treated simply for diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother* 2000;54 Suppl 1:198s-202s.
428. Sakaguchi T, Bray GA, Eddlestone G. Sympathetic activity following paraventricular or ventromedial hypothalamic lesions in rats. *Brain Res Bull* 1988;20:461-5.
429. Sakane N, Yoshida T, Mizutani T, Nakagawa Y. Serum leptin levels in a patient with pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1400.
430. Sandouk T, Reda D, Hofmann C. Antidiabetic agent pioglitazone enhances adipocyte differentiation of 3T3-F442A cells. *Am J Physiol* 1993;264:C1600-8.
431. Sankaram MB, Thompson TE. Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry* 1990;29:10670-5.
432. Santana H, Zoico E, Turcato E et al. Relation between body composition, fat distribution, and lung function in elderly men. *Am J Clin Nutr* 2001;73:827-31.

433. Saperstein R, Chapin EW, Brady EJ, Slater EE. Effects of an alpha 2-adrenoceptor antagonist on glucose tolerance in the genetically obese mouse (C57BL/6J ob/ob). *Metabolism* 1990;39:445-51.
434. Sartori C, Trueb L, Scherrer U. Insulin's direct vasodilator action in humans is masked by sympathetic vasoconstrictor tone. *J Hypertens* 1996;45:85A (abstr).
435. Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G et al. Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: leptin-induced increase in catecholamine secretion. *Diabetes* 1999;48:1787-93.
436. Saul JP, Berger RD, Albrecht P, Stein SP, Chen MH, Cohen RJ. Transfer function analysis of the circulation: unique insights into cardiovascular regulation. *Am J Physiol* 1991;261:H1231-45.
437. Saul JP, Berger RD, Chen MH, Cohen RJ. Transfer function analysis of autonomic regulation. II. Respiratory sinus arrhythmia. *Am J Physiol* 1989;256:H153-61.
438. Sauter A, Goldstein M, Engel J, Ueta K. Effect of insulin on central catecholamines. *Brain Res* 1983;260:330-3.
439. Sayers BM. Analysis of heart rate variability. *Ergonomics* 1973;16:17-32.
440. Scarpace PJ, Tumer N. Peripheral and hypothalamic leptin resistance with age-related obesity. *Physiol Behav* 2001;74:721-7.
441. Scharnagl H, Schinker R, Gierens H, Nauck M, Wieland H, Marz W. Effect of atorvastatin, simvastatin, and lovastatin on the metabolism of cholesterol and triacylglycerides in HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1545-55.
442. Scheek S, Brown MS, Goldstein JL. Sphingomyelin depletion in cultured cells blocks proteolysis of sterol regulatory element binding proteins at site 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:11179-83.
443. Scherrer U, Owlya R, Trueb L. Sympathetic-nerve activity before and after resection of an insulinoma. *N Engl J Med* 1996;335:1240-2.
444. Scherrer U, Randin D, Tappy L, Vollenweider P, Jequier E, Nicod P. Body fat and sympathetic nerve activity in healthy subjects. *Circulation* 1994;89:2634-40.
445. Scherrer U, Randin D, Vollenweider P, Vollenweider L, Nicod P. Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest* 1994;94:2511-5.
446. Scherrer U, Vollenweider P, Randin D, Jequier E, Nicod P, Tappy L. Suppression of insulin-induced sympathetic activation and vasodilation by dexamethasone in humans. *Circulation* 1993;88:388-94.
447. Schiffelers SL, Blaak EE, Barends EM, van Baak MA, Schols AMWJ. Beta adrenoceptor mediated lipolysis and thermogenesis in patients with emphysema. *Int J Obes* 2000;84:S132 (abstr).
448. Schiffelers SL, Saris WH, Boomsma F, van Baak MA. beta(1)- and beta(2)-Adrenoceptor-mediated thermogenesis and lipid utilization in obese and lean men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2191-9.

449. Schiffelers SL, van Harmelen VJ, de Grauw HA, Saris WH, van Baak MA. Dobutamine as selective beta(1)-adrenoceptor agonist in in vivo studies on human thermogenesis and lipid utilization. *J Appl Physiol* 1999;87:977-81.
450. Schissel SL, Jiang X, Tweedie-Hardman J et al. Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH. Implications for atherosclerotic lesion development. *J Biol Chem* 1998;273:2738-46.
451. Schmelz EM, Crall KJ, Larocque R, Dillehay DL, Merrill AH Jr. Uptake and metabolism of sphingolipids in isolated intestinal loops of mice. *J Nutr* 1994;124:702-12.
452. Schmelz EM, Dillehay DL, Webb SK, Reiter A, Adams J, Merrill AH Jr. Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine: implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1996;56:4936-41.
453. Schneider J, Kreuzer J, Hamann A, Nawroth PP, Dugi KA. The Proline 12 Alanine Substitution in the Peroxisome Proliferator- Activated Receptor-gamma2 Gene Is Associated With Lower Lipoprotein Lipase Activity in Vivo. *Diabetes* 2002;51:867-70.
454. Schoonjans K, Gelman L, Haby C, Briggs M, Auwerx J. Induction of LPL gene expression by sterols is mediated by a sterol regulatory element and is independent of the presence of multiple E boxes. *J Mol Biol* 2000;304 :323-34.
455. Schuchman EH, Miranda SR. Niemann-Pick disease: mutation update, genotype/phenotype correlations, and prospects for genetic testing. *Genet Test* 1997;1:13-9.
456. Schwartz JH, Young JB, Landsberg L. Effect of dietary fat on sympathetic nervous system activity in the rat. *J Clin Invest* 1983;72:361-70.
457. Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D Jr. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med* 1996;2:589-93.
458. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 1996;98:1101-6.
459. Schwartz RS, Jaeger LF, Silberstein S, Veith RC. Sympathetic nervous system activity and the thermic effect of feeding in man. *Int J Obes* 1987;11:141-9.
460. Schwartz RS, Jaeger LF, Veith RC. Effect of clonidine on the thermic effect of feeding in humans. *Am J Physiol* 1988;254:R90-4.
461. Schwencke C, Okumura S, Yamamoto M, Geng YJ, Ishikawa Y. Colocalization of beta-adrenergic receptors and caveolin within the plasma membrane. *J Cell Biochem* 1999;75:64-72.

462. Severson DL, Hurley B. Stimulation of the hormone-sensitive triacylglycerol lipase from adipose tissue by phosphatidylethanolamine. *Biochim Biophys Acta* 1985;845:283-91.
463. Shannon DC, Carley DW, Benson H. Aging of modulation of heart rate. *Am J Physiol* 1987;253:H874-7.
464. Sharma AM, Engeli S, Pischon T. New developments in mechanisms of obesity-induced hypertension: role of adipose tissue. *Curr Hypertens Rep* 2001;3:152-6.
465. Shek EW, Brands MW, Hall JE. Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension* 1998;31:409-14.
466. Shepherd JT. Franz Volhard lecture. Increased systemic vascular resistance and primary hypertension: the expanding complexity. *J Hypertens Suppl* 1990;8:S15-27.
467. Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest* 1996;98:1575-84.
468. Shimizu-Albergine M, Ippolito DL, Beavo JA. Downregulation of fasting-induced cAMP response element-mediated gene induction by leptin in neuropeptide Y neurons of the arcuate nucleus. *J Neurosci* 2001;21:1238-46.
469. Shimomura I, Shimano H, Korn BS, Bashmakov Y, Horton JD. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem* 1998;273:35299-306.
470. Shinitzky M. Physiology of membrane fluidity. CRC Press, Membrane fluidity and cellular functions. Shinitzky M. Boca Raton, 1984:1-51.
471. Shreeve SM, Valliere JE. The alpha 1-adrenoceptor is inactivated by alterations in membrane phospholipids. *Eur J Pharmacol* 1992;226:29-33.
472. Sinensky M, Minneman KP, Molinoff PB. Increased membrane acyl chain ordering activates adenylate cyclase. *J Biol Chem* 1979;254:9135-41.
473. Sivitz WI, Fink BD, Morgan DA, Fox JM, Donohoue PA, Haynes WG. Sympathetic inhibition, leptin, and uncoupling protein subtype expression in normal fasting rats. *Am J Physiol* 1999;277:E668-77.
474. Slotte JP. Sphingomyelin-cholesterol interactions in biological and model membranes. *Chem Phys Lipids* 1999;102:13-27.
475. Slotte JP, Bierman EL. Depletion of plasma-membrane sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membranes and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblasts. *Biochem J* 1988;250:653-8.
476. Slotte JP, Harmala AS, Jansson C, Porn MI. Rapid turn-over of plasma membrane sphingomyelin and cholesterol in baby hamster kidney cells after exposure to sphingomyelinase. *Biochim Biophys Acta* 1990;1030:251-7.



477. Slotte JP, Tenhunen J, Porn I. Effects of sphingomyelin degradation on cholesterol mobilization and efflux to high-density lipoproteins in cultured fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1990;1025:152-6.
478. Smith DK, Sarfeh J, Howard L. Truncal vagotomy in hypothalamic obesity. *Lancet* 1983;1:1330-1.
479. Smyth HS, Phil D, Sleight P. Reflex regulation of arterial pressure during sleep in man, a quantitative method of assessing baroreflex sensitivity. *Circ Res* 1969;24:109-21.
480. Snitker S, Pratley RE, Nicolson M, Tataranni PA, Ravussin E. Relationship between muscle sympathetic nerve activity and plasma leptin concentration. *Obes Res* 1997;5:338-40.
481. Solt, V. B. , Brown, M. R., Kennedy, B., Kolterman, O. G., and Ziegler, M. G. Elevated insulin, norepinephrine, and neuropeptide Y in hypertension. *Am J Hypertens* 3(11), 823-8. 90.
482. Souza SC, de Vargas LM, Yamamoto MT et al. Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1998;273:24665-9.
483. Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998;47:507-14.
484. Spraul M, Anderson EA, Bogardus C, Ravussin E. Muscle sympathetic nerve activity in response to glucose ingestion. Impact of plasma insulin and body fat. *Diabetes* 1994;43:191-6.
485. Spraul M, Ravussin E, Baron AD. Lack of relationship between muscle sympathetic nerve activity and skeletal muscle vasodilation in response to insulin infusion. *Diabetologia* 1996;39:91-6.
486. Spraul M, Ravussin E, Fontvieille AM, Rising R, Larson DE, Anderson EA. Reduced sympathetic nervous activity. A potential mechanism predisposing to body weight gain. *J Clin Invest* 1993;92:1730-5.
487. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 1994;94:1172-9.
488. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 1996;97:2601-10.
489. Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 1997;272:971-6.
489. Stephens TW, Caro JF. To be lean or not to be lean. Is leptin the answer? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998;106:1-15.

491. Stevenson JMD. Loss of weight and metabolic rate of rats with lesions in the medial and lateral hypothalamus. *Nature* 1963;198:92.
492. Stolyhowo A , Martin M. Analysis of lipid classes by HPLC with the evaporative light scattering detector. *J Liq Chromatogr* 1987;10:1237-53.
493. Storch J, Shulman SL, Kleinfeld AM. Plasma membrane lipid order and composition during adipocyte differentiation of 3T3F442A cells. Studies in intact cells with 1-[4- (trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexatriene. *J Biol Chem* 1989;264:10527-33.
494. Strauss-Blasche G, Moser M, Voica M, McLeod DR, Klammer N, Marktl W. Relative timing of inspiration and expiration affects respiratory sinus arrhythmia. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27:601-6.
495. Summers SA, Garza LA, Zhou H, Birnbaum MJ. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* 1998;18:5457-64.
496. Suzuki N, Shinonaga M, Hirata K, Inoue S, Kuwabara T. Hypothalamic obesity due to hydrocephalus caused by aqueductal stenosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990;53:1102-3.
497. Tabor DE, Kim JB, Spiegelman BM, Edwards PA. Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2. *J Biol Chem* 1999;274:20603-10.
498. Tank J, Jordan J, Diedrich A et al. Genetic influences on baroreflex function in normal twins. *Hypertension* 2001;37:907-10.
499. Tappy L, Girardet K, Schwaller N et al. Metabolic effects of an increase of sympathetic activity in healthy humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19:419-22.
500. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur Heart J* 1996;17:354-831.
501. Tataranni PA, Young JB, Bogardus C, Ravussin E. A low sympathoadrenal activity is associated with body weight gain and development of central adiposity in Pima Indian men. *Obes Res* 1997;5:341-7.
502. Testi R. Sphingomyelin breakdown and cell fate. *Trends Biochem Sci* 1996;21:468-71.
503. Thomas SA, Palmiter RD. Thermoregulatory and metabolic phenotypes of mice lacking noradrenaline and adrenaline. *Nature* 1997;387:94-7.
503. Tofovic SP, Kusaka H, Pfeifer CA, Jackson EK. Central effects of caffeine on renal renin secretion and norepinephrine spillover. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28:302-13.

505. Tokunaga K, Fukushima M, Lupien JR, Bray GA, Kemnitz JW, Schemmel R. Effects of food restriction and adrenalectomy in rats with VMH or PVH lesions. *Physiol Behav* 1989;45:1131-7.
506. Tomiyama H, Kushiro T, Abeta H et al. Blood pressure response to hyperinsulinemia in salt-sensitive and salt-resistant rats. *Hypertension* 1992;20:596-600.
507. Tontonoz P, Graves RA, Budavari AI et al. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res* 1994;22:5628-34.
508. Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol* 1993;13:4753-9.
509. Toth MJ, Poehlman ET. Sympathetic nervous system activity and resting metabolic rate in vegetarians. *Metabolism* 1994;43:621-5.
510. Toubro S, Sorensen TI, Ronn B, Christensen NJ, Astrup A. Twenty-four-hour energy expenditure: the role of body composition, thyroid status, sympathetic activity, and family membership. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2670-4.
511. Trayhurn P, Duncan J. S., Hoggard N., and Rayner D. V. Regulation of leptin production: a dominant role for the sympathetic nervous system? *Proc Nutr Soc* 1998;57(3), 413-9.
512. Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV, Hardie LJ. Rapid inhibition of ob gene expression and circulating leptin levels in lean mice by the beta 3-adrenoceptor agonists BRL 35135A and ZD2079. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;228:605-10.
513. Ukkola O, Tremblay A, Bouchard C. Beta-2 adrenergic receptor variants are associated with subcutaneous fat accumulation in response to long-term overfeeding. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:1604-8.
514. Umetani K, Singer DH, McCratty R, Atkinson M. Twenty-four hour time domain heart rate variability and heart rate : relation to age and gender over nine decades. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:593-601.
515. Utriainen T, Malmstrom R, Makimattila S, Yki-Jarvinen H. Methodological aspects, dose-response characteristics and causes of interindividual variation in insulin stimulation of limb blood flow in normal subjects. *Diabetologia* 1995;38:555-64.
516. Valanis KC, Sun CT. Poiseuille flow of a fluid with couple stress with applications to blood flow. *Biorheology* 1969;6:85-97.
517. Valensi P, Paries J, Assad N, Lormeau B, Attali JR. Insulino-résistance et altération de l'activité vagele chez les sujets obèses. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1999;92:1101-3.
518. Valensi P, Smagghue O, Paries J, Velayoudon P, Lormeau B, Attali JR. Impairment of skin vasoconstrictive response to sympathetic activation in obese patients: influence of rheological disorders. *Metabolism* 2000;49:600-6.

519. Valensi P, Thi BN, Lormeau B, Paries J, Attali JR. Cardiac autonomic function in obese patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19:113-8.
520. Valve R, Heikkinen S, Rissanen A, Laakso M, Uusitupa M. Synergistic effect of polymorphisms in uncoupling protein 1 and beta3- adrenergic receptor genes on basal metabolic rate in obese Finns. *Diabetologia* 1998;41:357-61.
521. Van Brocklyn JR, Lee MJ, Menzeleev R et al. Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi- coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol* 1998;142:229-40.
522. Van De Borne P, Hausberg M, Hoffman RP, Mark AL, Anderson EA. Hyperinsulinemia produces cardiac vagal withdrawal and nonuniform sympathetic activation in normal subjects. *Am J Physiol* 1999;276:R178-83.
523. Van de Borne P, Montano N, Zimmerman B, Pagani M, Somers VK. Relationship between repeated measures of hemodynamics, muscle sympathetic nerve activity, and their spectral oscillations. *Circulation* 1997;96:4326-32.
524. Van Heek M, Compton DS, France CF et al. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* 1997;99:385-90.
525. van Helvoort A, Giudici ML, Thielemans M, van Meer G. Transport of sphingomyelin to the cell surface is inhibited by brefeldin A and in mitosis, where C6-NBD-sphingomyelin is translocated across the plasma membrane by a multidrug transporter activity. *J Cell Sci* 1997;110 ( Pt 1):75-83.
526. van Helvoort A, Stoorvogel W, van Meer G, Burger NJ. Sphingomyelin synthase is absent from endosomes. *J Cell Sci* 1997;110 ( Pt 6):781-8.
527. van Rossum CT, Hoebee B, Seidell JC et al. Genetic factors as predictors of weight gain in young adult Dutch men and women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:517-28.
528. VanItallie TB. Resistance to weight gain during overfeeding: a NEAT explanation. *Nutr Rev* 2001;59:48-51.
529. Vaz M, Jennings G, Turner A, Cox H, Lambert G, Esler M. Regional sympathetic nervous activity and oxygen consumption in obese normotensive human subjects. *Circulation* 1997;96:3423-9.
530. Vaziri ND, Deng G, Liang K. Hepatic HDL receptor, SR-B1 and Apo A-I expression in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1462-6.
531. Veerman DP, Imholz BPM, Wieling W, Karemaker JM, Montfrans GA. Effects of aging on blood pressure variability in resting conditions. *Hypertension* 1994;24:120-30.
532. Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:12097-102.

533. Venkateswaran A, Repa JJ, Lobaccaro JM, Bronson A, Mangelsdorf DJ, Edwards PA. Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J Biol Chem* 2000;275:14700-7.
534. Verwaerde P, Senard JM, Galinier M et al. Changes in short-term variability of blood pressure and heart rate during the development of obesity-associated hypertension in high-fat fed dogs. *J Hypertens* 1999;17:1135-43.
535. Vicario PP, Candelore MR, Schaeffer MT et al. Desensitization of beta3-adrenergic receptor-stimulated adenylyl cyclase activity and lipolysis in rats. *Life Sci* 1998;62:627-38.
536. Vollenweider L, Tappy L, Owlya R, Jequier E, Nicod P, Scherrer U. Insulin-induced sympathetic activation and vasodilation in skeletal muscle. *Diabetes* 1995;44:641-5.
537. Vollenweider P, Randin D, Tappy L, Jequier E, Nicod P, Scherrer U. Impaired insulin-induced sympathetic neural activation and vasodilation in skeletal muscle in obese humans. *J Clin Invest* 1994;93:2365-71.
538. Vollenweider, P., Tappy, L., Randin, D., Schneiter, P., Jequier, E., Nicod, P., and Scherrer, U. Differential effects of hyperinsulinemia and carbohydrate metabolism on sympathetic nerve activity and muscle blood flow in humans. *J Clin Invest* 92(1), 147-154. 93.
539. Vos JP, Giudici ML, van der Bijl P et al. Sphingomyelin is synthesized at the plasma membrane of oligodendrocytes and by purified myelin membranes: a study with fluorescent- and radio- labelled ceramide analogues. *FEBS Lett* 1995;368:393-6.
540. Walgren MC, Young JB, Kaufman LN, Landsberg L. The effects of various carbohydrates on sympathetic activity in heart and interscapular brown adipose tissue of the rat. *Metabolism* 1987;36:585-94.
541. Wallin BG, Sundlof G, Eriksson BM, Dominiak P, Grobecker H, Lindblad LE. Plasma noradrenaline correlates to sympathetic muscle nerve activity in normotensive man. *Acta Physiol Scand* 1981;111:69-73.
542. Walsh KM, Leen E, Lean ME. The effect of sibutramine on resting energy expenditure and adrenaline- induced thermogenesis in obese females. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:1009-15.
543. Watson RD, Stallard TJ, Flinn RM, Littler WA. Factors determining direct arterial pressure and its variability in hypertensive man. *Hypertension* 1980;2:333-41.
544. Weinberger MH. Obesity, blood pressure, and renal sodium handling. *Curr Hypertens Rep* 1999;1:145-8.
545. Weise F, Baltrusch K, Heydenreich F. Effect of low-dose atropine on heart rate fluctuations during orthostatic load: a spectral analysis. *J Auton Nerv Syst* 1989;26:223-30.

546. Weyer C, Pratley RE, Snitker S, Spraul M, Ravussin E, Tataranni PA. Ethnic differences in insulinemia and sympathetic tone as links between obesity and blood pressure. *Hypertension* 2000;36:531-7.
547. Weyer C, Tataranni PA, Snitker S, Danforth E Jr, Ravussin E. Increase in insulin action and fat oxidation after treatment with CL 316,243, a highly selective beta3-adrenoceptor agonist in humans. *Diabetes* 1998;47:1555-61.
548. White M. Age-related changes in B-adrenergic neuroeffector systems in the human heart. *Circulation* 1994;90:1225-38.
549. Wilding JP. Leptin and the control of obesity. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1:656-61.
550. Williams CA, Lopes P. The influence of ventilatory control on heart rate variability in children. *J Sports Sci* 2002;20:407-15.
551. Wolfe R, Peters EJ, Klein S, Holland OB, Rosenblatt J, Gary H. Effect of short term fasting on lipolytic responsiveness in normal and obese human subjects. *Am J Physiol* 1987;2523:E189-E196.
552. Worgall TS, Johnson RA, Seo T, Gierens H, Deckelbaum RJ. Unsaturated Fatty Acid-mediated Decreases in Sterol Regulatory Element- mediated Gene Transcription Are Linked to Cellular Sphingolipid Metabolism. *J Biol Chem* 2002;277:3878-85.
553. Xing H, Northrop JP, Grove JR, Kilpatrick KE, Su JL, Ringold GM. TNF alpha-mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPARgamma without effects on Pref-1 expression. *Endocrinology* 1997;138:2776-83.
554. Yamamoto M, Takata S, Yagi S et al. Effects of insulin on pressor responsiveness and baroreflex function in diabetes mellitus. *Jpn Circ J* 1986;50:943-8.
555. Yancey PG, de la Llera-Moya M, Swarnakar S et al. High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J Biol Chem* 2000;275:36596-604.
556. Yang WS, Deeb SS. Sp1 and Sp3 transactivate the human lipoprotein lipase gene promoter through binding to a CT element: synergy with the sterol regulatory element binding protein and reduced transactivation of a naturally occurring promoter variant. *J Lipid Res* 1998;39:2054-64.
557. Yechiel E, Barenholz Y, Henis YI. Lateral mobility and organization of phospholipids and proteins in rat myocyte membranes. Effects of aging and manipulation of lipid composition. *J Biol Chem* 1985;260:9132-6.
558. Yechiel E, Henis YI, Barenholz Y. Aging of rat heart fibroblasts: relationship between lipid composition, membrane organization and biological properties. *Biochim Biophys Acta* 1986;859:95-104.
559. Yoshida T, Sakane N, Umekawa T, Kondo M. Effect of nicotine on sympathetic nervous system activity of mice subjected to immobilization stress. *Physiol Behav* 1994;55:53-7.

560. Young JB, Landsberg L. Suppression of sympathetic nervous system during fasting. *Science* 1977;196:1473-5.
561. Young JB, Landsberg L. Impaired suppression of sympathetic activity during fasting in the gold thioglucose-treated mouse. *J Clin Invest* 1980;65:1086-94.
562. Young JB, Landsberg L. Effect of oral sucrose on blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Metabolism* 1981;30:421-4.
563. Young JB, McDonald IA. Sympathoadrenal activity in human obesity: heterogeneity of findings since 1980. *Int j obes relat metab disord* 1992;16:959-67.
564. Young JB, Rosa RM, Landsberg L. Dissociation of sympathetic nervous system and adrenal medullary responses. *Am J Physiol* 1984;247:E35-40.
565. Zahorska-Markiewicz B, Kuagowska E, Kucio C, Klin M. Heart rate variability in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993;17:21-3.
566. Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 1993;133:1753-8.
567. Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y to normal rats has divergent effects on glucose utilization by adipose tissue and skeletal muscle. *Diabetes* 1994;43:764-9.
568. Zeghari N, Vidal H, Perche S et al. Adipose peroxisome proliferator-activated receptor gamma mRNA expression in insulin-resistant obese patients: relationship with adipocyte membrane phospholipids. *Lipids* 1999;34 Suppl:S161.
569. Zeghari N, Vidal H, Younsi M, Ziegler O, Drouin P, Donner M. Adipocyte membrane phospholipids and PPAR-gamma expression in obese women: relationship to hyperinsulinemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E736-43.
570. Zeghari N, Younsi M, Meyer L, Donner M, Drouin P, Ziegler O. Adipocyte and erythrocyte plasma membrane phospholipid composition and hyperinsulinemia: a study in nondiabetic and diabetic obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:1600-7.
571. Zeng G, Quon MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1996;98:894-8.
572. Zhang B, Berger J, Zhou G et al. Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 1996;271:31771-4.
573. Zlatkis A, Zak B. Study of a new cholesterol reagent. *Anal Biochem* 1969;29:143-8.
574. Zondag GC, Postma FR, Etten IV, Verlaan I, Moolenaar WH. Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1. *Biochem J* 1998;330 ( Pt 2):605-9.

Monsieur QUILLIOT Didier


DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en PHYSIOLOGIE - NUTRITION

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER n° 767

Nancy, le 5 décembre 2002

Le Président de l'Université

CI. BURLE  




**RESUME: Résistance à l'action des catécholamines, de la leptine et de l'insuline au cours de l'obésité. Etude de la réactivité du système nerveux sympathique *in vivo* et de la lipolyse adipocytaire *in vitro*.**

Une diminution de la réponse du système nerveux sympathique (SNS) pourraient être impliquée dans la physiopathologie de l'obésité. Nous avons étudié la variabilité de la fréquence cardiaque et de la tension artérielle chez des sujets obèses normotendus. La réactivité du SNS en orthostatisme et la sensibilité du baroréflexe étaient altérées et corrélées de façon indépendante au degré d'insulinorésistance. Les variations de la réponse du SNS lors d'une charge en glucose, rapportée aux variations d'insulinémie, étaient plus faibles au cours de l'obésité. Une concentration élevée en leptine était paradoxalement associée à une diminution des indices du SNS. Cette relation persiste après amaigrissement. Ces études ont donc permis de décrire un phénotype d'obésité associant une diminution globale de la réactivité du système sympathique, une augmentation du rapport leptine sur masse grasse, une insulino-résistance et une absence d'hypertension artérielle. Ce phénotype est associé à une augmentation de la sphingomyéline membranaire de l'érythrocyte.

Un modèle de résistance aux catécholamines de la lipolyse adipocytaire a été validé *in vitro* en enrichissant en sphingomyéline les membranes d'adipocytes 3T3L1 en culture. La diminution de lipolyse était en rapport avec une altération de l'étape membranaire de la transmission du signal. La transcription de nombreux gènes impliqués dans la régulation du métabolisme du cholestérol et de la lipogénèse a été activé, sans modification de l'expression des récepteurs bêta-adrénergiques.

**Mots -clés :** Obésité – Système nerveux autonome – Résistance à l'insuline – Leptine — Vieillesse – Tissu adipeux – Membrane – Sphingomyéline - Lipolyse

**SUMMARY: Resistance to catecholamines, leptin and insulin in obesity. Study of the reactivity of the sympathetic nervous system *in vivo* and of the adipocyte lipolysis *in vitro*.**

A decreased sympathetic nervous system (SNS) reactivity could be involved in the physiopathology of obesity. We used spectral analysis to measure the variability of heart rate and blood pressure in normotensive obese subjects. In standing position, baroreflex sensitivity and SNS reactivity were altered and negatively correlated to insulin resistance indexes. After a glucose load, an impaired change in indices of sympathetic modulation was observed. Increased leptin to fat mass ratio was paradoxically associated with a decreased sympathetic cardiac modulation. This relationship persisted after weight loss. These abnormalities including impaired SNS reactivity, insulin resistance and an increased leptin concentration for a given fat mass, without hypertension could be described as a particular phenotype of obesity.

Catecholamine resistance of adipocyte lipolysis could be related to cell membrane abnormalities. This hypothesis was tested *in vitro* by increasing the membrane sphingomyelin content of 3T3L1 adipocytes. At short term, a decrease in stimulated lipolysis was observed, that could be related to abnormal membrane signal transduction. The transcription of genes implicated in the regulation of cholesterol metabolism and lipogenesis was activated, but without change in the transcription of beta-adrenergic receptors.

**Key-words :** Obesity - Autonomic nervous system - Insulin resistance – Leptin — Ageing - Adipose tissue – Membrane – Sphingomyelin – Lipolysis

**Discipline :** Biologie, Santé et Environnement – Physiologie

**Intitulé du laboratoire :** Laboratoire de nutrition et de maladies métaboliques (EA 34 36 : proliférateurs de peroxysome) et Centre d'investigation Clinique / INSERM du CHU de Nancy