



HAL
open science

Augmentation de la sphingomyéline membranaire : un nouveau marqueur du syndrome métabolique chez l'homme

Mohamed Younsi

► **To cite this version:**

Mohamed Younsi. Augmentation de la sphingomyéline membranaire : un nouveau marqueur du syndrome métabolique chez l'homme. Biologie cellulaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2002. Français. NNT : 2002NAN10308 . tel-01748189

HAL Id: tel-01748189

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748189v1>

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ NANCY I
FACULTE DE MÉDECINE
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE, SANTÉ, ENVIRONNEMENT

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ NANCY I

Discipline: **Biologie cellulaire**

Présentée et soutenue publiquement par

Mohamed YOUNSI

le 7 novembre 2002

Augmentation de la sphingomyéline membranaire: un nouveau marqueur du syndrome métabolique chez l'homme.

Directeur de thèse: Dr. Mireille DONNER

Jury

Dr. Marie Aude DEVYNCK
Dr. Salwa RIZKALLA
Pr. Michel VIDAILHET
Pr. Olivier ZIEGLER
Dr. Mireille DONNER

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Mireille Donner pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, d'avoir accepté de diriger cette thèse et de m'avoir encadré et encouragé tout au long de ce travail de recherche.

Par sa compétence, son ouverture d'esprit et sa pédagogie, elle m'a beaucoup appris.

Je la remercie de m'avoir donné la chance de découvrir la recherche clinique.

Je tiens également à remercier le Professeur Olivier Ziegler pour m'avoir encadré et encouragé, pour son soutien toujours constant et pour ses aides très précieuses.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire pour les diverses connaissances que chacun m'a apportées.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mes proches (particulièrement Dehbia), à qui je dois tout et sur lesquels j'ai toujours pu compter.

Liste des publications

- Ramanandraibe E, **Younsi M**, Coulon J, Loppinet V., Hakkou A., Bonaly R.
Implication of cell wall constituents in the sensitivity of *Kluyveromyces lactis* strains to amphotericin B.
Res. Microbiol., 1998, 149, 109-118

- **Younsi M**, Ramanandraibe E, Bonaly R, Donner M, Coulon J.
Amphotericin B Resistance and Membrane Fluidity in *Kluyveromyces lactis* Strains.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, July 2000, p.1911-1916.

- Zeghari N, **Younsi M**, Meyer L, Donner M, Drouin P, Ziegler O.
Adipocyte and erythrocyte plasma membrane phospholipid composition and hyperinsulinemia: a study in non diabetic and diabetic obese women.
Int J Obes Relat Metab Disord. 2000 Dec;24(12):1600-7.

- Zeghari N, Vidal H, **Younsi M**, Ziegler O, Drouin P, Donner M.
Adipocyte membrane phospholipids and PPAR- γ expression in obese women: relationship to hyperinsulinemia.
Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000 Oct;279(4):E736-43.

- Al-Makdissy N, Bianchi A, **Younsi M**, Picard E, Valet P, Martinet N, Dauça M, Donner M.
Down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression by sphingomyelins.
FEBS Lett. 2001 Mar 30;493(2-3):75-9.

- **Younsi M**, Quilliot Q, Al-Makdissy N, Delbachian I, Drouin P, Donner M, Ziegler O.
Erythrocyte membrane phospholipid composition is related to hyperinsulinemia in obese non diabetic women: effects of weight loss.
Parution dans METABOLISM en octobre 2002.

- **Younsi M**, Vidailhet M, Donner M, Ziegler O.
Erythrocyte plasma membrane phospholipid composition and hyperinsulinemia in non diabetic obese children.
(En préparation).

Sommaire

Remerciements

Sommaire

Liste des abbréviations.....1

Introduction générale.....5

CHAPITRE 1: Etudes bibliographiques.....11

I - LE SIGNAL DE L'INSULINE : SITUATION PHYSIOLOGIQUE.....13

A - LES MOLECULES INITIATRICES DU SIGNAL DE L'INSULINE.....13

A.1 - L'INSULINE13

A.2 - LE RECEPTEUR DE L'INSULINE : UN RECEPTEUR A TYROSINE-KINASE.....15

A.3- LES SUBSTRATS INTRACELLULAIRES DU RECEPTEUR A INSULINE.....17

A.3.1 - La famille IRS (*insulin receptor substrates 1, 2, 3 and 4*).....17

A.3.1.1 - Structure des IRSs.....17

A.3.1.2 - Fonction des IRSs:.....18

A.3.2 - Les protéines Shc (*Src homology collagen protein*).....19

B - DESCRIPTION DES 2 VOIES MAJEURES DE SIGNALISATION ASSOCIEES AU SIGNAL DE L'INSULINE.....19

B.1 - LA VOIE P42/P44 MAPK KINASE (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE).....19

B.1.1 - Activation de p21 RAS.....19

B.1.2 - De Ras à MAPK.....20

B.1.2.1- Activation de Raf-1.....20

B.1.2.2- De MEK à MAP kinase.....20

B.1.3 - Les effets biologiques de la voie p42/p44 MAP kinase.....21

B.2 - LA VOIE PI3 KINASE/PKB.....21

B.2.1 - Activation de la PI-3 kinase.....	21
B.2.2 - La cible de PI-3 kinase: la protéine kinase B (PKB).....	22
B.2.3 - Les effets biologiques associés à l'activation de la PI3 kinase et de la PKB.....	22
B.2.3.1- Le transport du glucose.....	23
B.2.3.2- La glycolyse.....	23
B.2.3.3- La synthèse du glycogène.....	25
B.2.3.4- Synthèse des protéines.....	26
B.2.3.5- Inhibition de l'apoptose.....	26
C-LES CELLULES SENSIBLES A L'INSULINE.....	27
C.1 - LE FOIE.....	27
C.1.1- Métabolisme des carbohydrates.....	27
C.1.2 - Métabolisme des lipides.....	28
C.1.3 - Effets de l'insuline sur les fonctions métaboliques du foie.....	29
C.2- LE MUSCLE SQUELETTIQUE.....	29
C.2.1 - Métabolisme des carbohydrates.....	30
C.2.1.1- Effets de l'insuline.....	30
C.2.1.2- Autres voies de stimulation de l'entrée du glucose et de la glycogénèse dans le muscle.....	30
C.2.2 - Métabolisme des lipides.....	31
C.3 - LE TISSU ADIPEUX.....	32
C.3.1 – Le tissu adipeux brun.....	33
C.3.1.1- L'adipocyte brun.....	33
C.3.1.2- Fonctions des adipocytes bruns.....	33
C.3.2 - Le tissu adipeux blanc.....	34
C.3.2.1- L'adipocyte blanc.....	34
C.3.2.2- Différentiation des préadipocytes en adipocytes.....	35
C.3.2.3- Fonctions métaboliques des adipocytes.....	37
C.3.2.4- L'adipocyte, cellule sécrétrice endocrine, autocrine et paracrine.....	39
C.4- RELATIONS ENTRE LES CELLULES SENSIBLES A L'INSULINE.....	44

D – INSULINE ET EXPRESSION DES GENES.....	46
II-L'OBESITE.....	47
A– INTRODUCTION.....	47
B - ORIGINES DE L'OBESITE.....	48
B.1 - LES FACTEURS GENETIQUES.....	48
B.2 - LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX.....	51
B.3 - FACTEURS SOCIAUX.....	52
C- EVOLUTION DU TISSU ADIPEUX ET OBESITE.....	52
C.1 – OBESITE, HYPERTROPHIE ET HYPERPLASIE DES ADIPOCYTES.....	53
C.1.1- Origine de l’hypertrophie adipocytaire.....	53
C.1.2- Origine de l’hyperplasie adipocytaire.....	53
C.2 – OBESITE ET REPARTITION DU TISSU ADIPEUX.....	54
C.2.1 - Répartition du tissu adipeux.....	54
C.2.2 - Obésité, tissu adipeux sous cutané et viscéral.....	55
C.2.3- Spécificités fonctionnelles des tissus adipeux sous-cutané et viscéral.....	56
III - L’ INSULINO-RESISTANCE.....	58
A - ANOMALIES GENETIQUES OU ACQUISES DE L’INSULINE, D’UNE OU PLUSIEURS PROTEINES DE LA CASCADE DE L’ACTION DE L’INSULINE.....	58
A.1 - NIVEAU PRE-RECEPTEUR.....	59
A.2 - NIVEAU RECEPTEUR.....	60
A.3- NIVEAU POST-RECEPTEUR.....	60

B - MALNUTRITION FETALE	62
C - ORIGINE TISSULAIRE DE L'INSULINO-RESISTANCE	63
C.1 - LE TISSU ADIPEUX.....	63
C.1.1 - Rôle des acides gras non estérifiés.....	63
C.1.2- Rôle des adipocytokines.....	64
C.1.3- Rôle de l'obésité et du tissu adipeux viscéral.....	66
C.2 - LA CELLULE MUSCULAIRE.....	68
D - HYPOTHESE MEMBRANAIRE DE L'INSULINO-RESISTANCE	69
D.1- LA MEMBRANE PLASMIQUE.....	69
D.1.1- Rappels sur la composition et la structure membranaire.....	69
D.1.2- Asymétrie lipidique de la membrane plasmique.....	72
D.1.3- Fluidité membranaire.....	73
D.1.4- Les « rafts » et « cavéoles »	74
D.2- HYPOTHESE MEMBRANAIRE DE L'INSULINO-RESISTANCE....	75
D.2.1- Rôle des acides gras	75
D.2.2- Rôle des lipides.....	77
D.2.3- Relations sphingomyéline et insulino-résistance.....	78
IV- LIPOPROTEINES PLASMATIQUES ET INSULINORESISTANCE	81
A- LES LIPOPROTEINES: STRUCTURE ET FONCTION	81
A-1 APOLIPOPROTEINES	81

A-2 LIPOPROTEINES.....	83
B- RAPPELS SUR LE METABOLISME DES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES.....	85
B-1 ABSORPTION INTESTINALE.....	86
B-2 METABOLISME DES CHYLOMICRONS.....	86
B-3 TRANSFORMATION PLASMATIQUE DES VLDL EN LDL.....	88
B-4 METABOLISME DES HDL (I).....	89
B-5 METABOLISME DES HDL (II).....	91
C- ROLE DE L'INSULINE SUR LE METABOLISME DES LIPOPROTEINES.....	93
C-1 INSULINE ET LIPOPROTEINES.....	93
C-2 INSULINE ET PROTEINES DE TRANSFERT DES LIPIDES.....	93
D- CONSEQUENCES DE L'INSULINO-RESISTANCE SUR LE METABOLISME DES LIPIDES: ANOMALIES QUANTITATIVES ET QUALITATIVES DE COMPOSITION ET DE DISTRIBUTION DES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES.....	94
D-1 LES ANOMALIES DU METABOLISME.....	94
D-2 LES ANOMALIES DE COMPOSITION DES LIPOPROTEINES.....	96
D-2.1 Les phospholipides et les lipoprotéines.....	96
D-2.2 Sphingomyéline et lipoprotéines.....	96
E- INTERACTIONS LIPOPROTEINES-CELLULES : LE RECEPTEUR SRB-I ET LA PROTEINE ABCA-1.....	97
 CHAPITRE 2: Sujets et méthodes.....	 101
 I- SUJETS	 103
A- SUJETS ETUDIÉS.....	103
B- CRITERES D'INCLUSION.....	104

C- CRITERES D'EXCLUSION.....	105
II- METHODES.....	105
A- PARAMETRES CLINIQUES ET NUTRITIONNELS.....	105
A-1 MESURES ANTHROPOMETRIQUES.....	105
A-2 ENQUETE ALIMENTAIRE ET EVALUATION DES APPORTS D'ACIDES GRAS.....	106
A-3 MESURE DE LA COMPOSITION CORPORELLE PAR ABSORPTIOMETRIE BIPHOTONIQUE.....	106
B- CLAMP EUGLYCEMIQUE HYPERINSULINEMIQUE.....	107
B-1 PRINCIPE.....	107
B-2 PROTOCOLE.....	107
B-3 PARAMETRES MESURES.....	108
C- ETUDE DE LA LIPEMIE POST-PRANDIALE.....	109
C-1 REPAS TEST ET CHARGE DE 84 G DE LIPIDES.....	109
C-2 TRAITEMENT DES TUBES DE SANG.....	109
D- PRELEVEMENTS SANGUINS.....	110
E -BIOPSIE DU TISSUS ADIPEUX.....	110
F- PARAMETRES METABOLIQUES ET LIPIDIQUES.....	110
G-ISOLEMENT DES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES PAR ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT DISCONTINU DE KBR (effectués au laboratoire de biochimie du Pr J.L. GUEANT, CHU Nancy).....	111
H-ISOLEMENT DES MEMBRANES CELLULAIRES.....	113
H-1 MEMBRANES D'HEMATIES.....	113

H-1.1 Tampons.....	113
H-1.2 Isolements des membranes.....	113
H-2 MEMBRANES D'ADIPOCYTES.....	114
H-2.1 Préparation des Tampons.....	114
H-2.2 Isolement des membranes	114
H-3 DOSAGE DES PROTEINES MEMBRANAIRES: LOWRY, 1951.....	116
H-3-1 Réactifs.....	116
H-3-2 Protocole de dosage:.....	116
I- DETERMINATION DE LA FLUIDITE MEMBRANAIRE PAR POLARISATION DE FLUORESCENCE.....	117
I.1- PRINCIPE.....	117
I.2-SONDES FLUORESCENTES.....	118
I.3- MARQUAGE DES MEMBRANES.....	119
I.4- DETERMINATION DES ANISOTROPIES DE FLUORESCENCE.....	120
J- EXTRACTION DES LIPIDES MEMBRANAIRES (ROSE ET OKLANDER, 1965).....	120
J-1 PRINCIPE:.....	120
J-2 REACTIFS.....	121
J-3 PROTOCOLE DE DOSAGE:.....	121
K- DOSAGE DU CHOLESTEROL MEMBRANAIRE.....	122
K-1 PRINCIPE:.....	122
K-2 REACTIFS.....	122
K-3 PROTOCOLE DE DOSAGE.....	122

L-DETERMINATION DES CLASSES DE PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP).....	123
L-1 PRINCIPE.....	123
L-2 APPAREILLAGE.....	124
L-3-REACTIFS.....	124
L-4 PROTOCOLE.....	125
L-5 PROFIL DE SEPARATION DES CLASSES MAJEURS DE PHOSPHOLIPIDES.....	125
M- DETERMINATION DES ACIDES GRAS PAR CPG.....	126
M-1 METHYLATION DES ACIDES GRAS.....	126
M-2 SEPARATION DES ACIDES GRAS METHYLES PAR CPG.....	127
M-2.1 Principes.....	127
M-2.2 Les éléments constituant la CPG.....	127
M-2.3 Appareillage.....	128
M-2.4 Quantification des acides gras.....	129
N- TESTS STATISTIQUES.....	131

CHAPITRE 3: Phospholipides de la membrane érythrocytaire: une étude des relations avec l'hyperinsulinémie chez des sujets sains, des enfants et adultes obèses.....

I- INTRODUCTION.....	135
II- RESULTATS.....	137
A- CARACTERISTIQUES ANTHROPOMETRIQUES, METABOLIQUES ET LIPIDIQUES DES TEMOINS, OBESES ADULTES REPARTIS EN TERTILES ET OBESES ENFANTS.....	138

B- PARAMETRES MEMBRANAIRES DES TEMOINS, DES OBESES ADULTES REPARTIS EN TERTILES ET DES OBESES ENFANTS	139
C- CORRELATIONS SIMPLES ENTRE LES MARQUEURS DE L'INSULINO-RESISTANCE ET LES PARAMETRES ANTHROPOMETRIQUES, PLASMATIQUES ET MEMBRANAIRES.....	142
C-1 POPULATION TOTALE.....	142
C-2 TEMOINS.....	142
C-3 OBESES ADULTES.....	143
C-4 OBESES ENFANTS.....	143
D- ANALYSE DE REGRESSION PAS A PAS.....	144
III- DISCUSSION.....	147
IV- CONCLUSION.....	151
CHAPITRE 4: Obésité et restriction calorique: relations entre la perte de poids, l'insulino-sensibilité et la composition lipidique de la membrane érythrocytaire.....	153
I- INTRODUCTION.....	155
II- RESULTATS.....	157
A- A L'ETAT BASAL.....	157
A-1 PARAMETRES ANTHROPOMETRIQUES, METABOLIQUES ET LIPIDIQUES.....	157
A-2 COMPOSITION EN PHOSPHOLIPIDES DE LA MEMBRANE D'HEMATIE.....	159
A-2.1 CORRELATIONS SIMPLES ENTRE LES MARQUEURS DE L'INSULINO-RESISTANCE ET LES PARAMETRES ANTHROPOMETRIQUES, PLASMATIQUES ET PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES.....	159
A-2.2 ANALYSE DE REGRESSION MULTIPLE.....	161

A-3	COMPOSITION EN ACIDES GRAS.....	161
A-3.1	CORRELATIONS SIMPLES ENTRE LES MARQUEURS DE L'INSULINO-RESISTANCE ET LES ACIDES GRAS MEMBRANAIRES.....	163
A-3.2	ANALYSE DE REGRESSION PAS A PAS.....	163
B-	APRES UN REGIME HYPOCALORIQUE DE 3 MOIS.....	166
B-1	CARACTERISTIQUES ANTHROPOMETRIQUES, METABOLIQUES ET LIPIDIQUES.....	166
B-2	COMPOSITION EN PHOSPHOLIPIDES DE LA MEMBRANE D'HEMATIE.....	166
B-3	COMPOSITION EN ACIDES GRAS.....	169
B-3.1	Variations par rapport à l'état basal.....	169
B-3.2	Variations par rapport au groupe témoin.....	170
C-	ANALYSE DES RELATIONS ENTRE LES VARIATIONS DES PARAMETRES APRES LE REGIME HYPOCALORIQUE.....	174
D-	ANALYSE DES REGRESSIONS PAS A PAS.....	177
III-	DISCUSSION.....	179
A-	INSULINO-RESISTANCE ET COMPOSITION DE LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE EN PHOSPHOLIPIDES.....	179
B-	INSULINO-RESISTANCE ET COMPOSITION DE LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE EN ACIDES GRAS.....	183
B-1	Acide arachidonique.....	184
B-2	Acide eicosadiénoïque.....	184
B-3	Acide lignocérique.....	185
B-4	Après régime hypocalorique de 3 mois.....	186
IV-	CONCLUSION.....	189

CHAPITRE 5: Traitement pharmacologique de l'obésité: effet de l'orlistat sur la perte de poids, l'insulino-sensibilité et la composition lipidique de la membrane érythrocytaire.....	191
I- INTRODUCTION.....	193
II- RESULTATS.....	195
A- LES PHOSPHOLIPIDES.....	195
A-1 ETAT BASAL.....	195
A-1.1 Différence à l'état basal entre le groupe "Orlistat" et groupe "régime".....	196
A-1.2 Relations entre les paramètres métaboliques, lipidiques et membranaires au sein du groupe "Orlistat".....	196
A-2 APRES TRAITEMENT A L'ORLISTAT ASSOCIE A UN REGIME HYPOCALORIQUE PENDANT 3 MOIS.....	199
A-2.1 Evolution des caractéristiques cliniques métaboliques et membranaires.....	199
A-2.2 Relations entre les marqueurs de l'insulinorésistance, les paramètres lipidiques et membranaires après traitement.....	201
A-2.3 Effet de l'Orlistat sur l'insulino-sensibilité: mise en évidence de "bons répondeurs" et de "mauvais répondeurs".....	203
B- LES ACIDES GRAS.....	205
B-1 ANALYSE DE L'ECHANTILLON DE 17 OBESES.....	205
B-1.1 Etat basal.....	205
B-1.2 Après 3mois sous Orlistat.....	207
B-2 ANALYSE DES GROUPES « BON REPONDEURS » ET « MAUVAIS REPONDEURS ».....	209
III- DISCUSSION.....	213

A- ACIDES GRAS.....	213
B- PHOSPHOLIPIDES.....	213
B-1 ETAT BASAL.....	213
B-2 APRES TRAITEMENT SOUS ORLISTAT.....	216
C- ANALYSE DE LA REPONSE A LA PERTE DE POIDS DANS LES GROUPES "REGIMES" (CHAPITRE 4) ET"ORLISTAT".....	218
IV- CONCLUSION.....	220
CHAPITRE 6: Composition des lipoprotéines au cours de la lipémie post prandiale – Relations avec les marqueurs de l’insulino-résistance et la composition lipidique de l’hématie et de l’adipocyte: (Etude préliminaire).....	221
I- INTRODUCTION.....	223
II- RESULTATS.....	225
A- CARACTERISTIQUES CLINIQUES, LIPIDIQUES, ET METABOLIQUES....	225
B- PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES DE L’HEMATIE, DE L’ADIPOCYTE ET ACIDES GRAS DE L’HEMATIE.....	226
C- COMPOSITION DES LIPIDES PLASMATIQUES ET DES LIPOPROTEINES AU COURS DE LA LIPEMIE POST PRANDIALE.....	228
C-1 Lipides plasmatiques.....	228
C-2 Lipoprotéines riches en triglycérides (LRT).....	228
C-3 LDL.....	228
C-4 HDL.....	229
D- RELATIONS ENTRE LES DIFFERENTS PARAMETRES.....	230
D-1 Paramètres cliniques, lipidiques et insulino-résistance.....	230

D-2 Phospholipides membranaires et insulino-résistance.....	230
D-3 Acides gras membranaires de l'hématie et insulino-résistance.....	230
D-4 Paramètres de la lipémie post-prandiale et insulino-résistance.....	231
D-5 Paramètres de la lipémie post prandiale et paramètres membranaires de l'hématie.....	233
D-5.1 Phospholipides.....	233
D-5.2 Acides gras.....	234
D-6 Paramètres de la lipémie post prandiale et phospholipides membranaires de l'adipocyte.....	235
D-6.1 Rapport SM/PE.....	235
D-6.2 SM.....	235
D-6.3 PC.....	237
D-7 Composition en PC et en SM des HDL à jeun et en post prandiale et phospholipides membranaires.....	240
D-8 Analyse globale des relations entre les paramètres de la lipémie postprandiale et les paramètres membranaires.....	241
III- DISCUSSION.....	243
IV- CONCLUSION.....	249
Conclusion générale et perspectives	251
Références bibliographiques.....	255

ABBREVIATIONS

ABCA-1	« <i>ATP binding cassette</i> » transporteur 1
Acrp 30	<i>Adipocyte complement-related protein</i>
AG	Acides gras
AGLC	Acides gras à longues chaînes
Akt	<i>Viral oncprotein homology</i> , ou PKB
Ala	Alanine
AMPc	Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate
aP2	<i>Adipose fatty-acid binding protein</i>
Apo	Apolipoprotéine
ARNm	ARN messenger
ASP	<i>Acylation stimulating protein</i>
ATP	Adénosine triphosphate
AUC	Aire sous la courbe
CAP	Protéine ayant une affinité pour Cbl
CETP	Protéine de transfert d'esters de cholestérol
CL	Cholestérol membranaire
CLA-1	Equivalent de SR-BI chez l'Homme
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CoA	Coenzyme A
Cys	Cystéine
DAG	Diacylglycérol
DPH	1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>
FAT/CD36	Transporteur d'acides gras
GDP	Guanosine 5'-diphosphate
GLUT1 et 4	Transporteur de glucose (isoformes 1 et 4)
Grb2	<i>Growth factor receptor binding protein-2</i>
GSK-3	Glycogène synthétase kinase-3
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
HDL	Lipoprotéines de haute densité
HGPO	Hyperglycémie provoquée par voie orale
HOMA	<i>Homeostasis model assessment</i>
IDL	Lipoprotéines de densité intermédiaire
IMC	Indice de masse corporel
Ins	Insuline
IL-6	Interleukine-6
Ile	Isoleucine
IP3	Inositol triphosphate
IRS-1-4	Substrat du récepteur de l'insuline 1-4
KBr	Bromure de potassium
KDa	Kilo Dalton
LCAT	<i>Lécithine cholestérol acyl transférase</i>
LDL	Lipoprotéines de faible densité
LH	Lipase hépatique
LHS	Lipase hormono-sensible
LP	Lipoprotéines
LPC	lysophosphatidylcholine

LPL	Lipoprotéine lipase
LRT	Lipoparticules riches en triglycérides
LXR	Récepteur de l'acide rétinoïque
M	Quantité de glucose perfusé
MAPK	<i>Mitogen associated protein kinase</i>
Met	Méthionine
mM	millimolaire
mU/L	milliunité par litre
NaCl	Chlorure de sodium
nM	Nanomolaire
NPY	Neuropeptide Y
OPT	Ophtaldéhyde
p110	Protéine 110 KDa
p85	Protéine 85 Kda
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PC	Phosphatidylcholine
PDK1-2	<i>Phosphoinositol dependent kinase 1-2</i>
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PH	<i>Pleckstrin homology domain</i>
PHG	Production hépatique de glucose
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol triphosphate
PKB	Protéine kinase de type B
PKC	Protéine kinase C
PLC(A2)	Phospholipase C (isoforme A2)
PLTP	Protéines de transfert de lipides
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PL	Phospholipides totaux
PP-1	Protéine phosphatase de type 1
PPAR	Récepteur des proliférateurs de peroxyosome
Pro	Proline
PS	Phosphatidylsérine
PTB	<i>Phosphotyrosine binding domain</i>
P-Tyr	Phospho-tyrosine
<r>	Anisotropie de fluorescence
rpm	Révolution par minute
RTH	Rapport circonférence de la taille sur circonférence des hanches
SCAP	<i>SREBP cleavage-activating protein</i>
SEM	Erreur standard à la moyenne
Ser	Sérine
SH2	<i>Src homology-2 domain</i>
SH3	<i>Src homology 3</i>
SM	Sphingomyéline
SOS	<i>Son-Of-Sevenless</i>
SR-BI	<i>Scavenger</i> récepteur de type BI
Src	<i>Rous asian sarcoma tyrosine kinase</i>
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>

T1/2	Temps de demi-vie
TG	Triglycérides
TH	Tampon d'homogénéisation
TMA-DPH	1-(4-triméthylammoniumphényl)-6-phényl-1,3,5-hexatriène
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
Tyr	Tyrosine
Val	Valine
VLDL	Lipoprotéines de très faible densité
μg	microgramme
μl	microlitre
μM	micromolaire

Introduction générale

L'insuline est une hormone produite par le pancréas dont le rôle est d'accroître la captation et l'utilisation du glucose par les muscles et le tissu adipeux. Lorsque ces tissus deviennent moins sensibles à des concentrations physiologiques d'insuline, s'installe le phénomène d'insulino-résistance qui peut être défini comme une baisse de l'efficacité de l'insuline au niveau des cellules cibles, et donc une baisse de son action biologique. Chez un sujet atteint d'insulino-résistance, le glucose pénétrant plus difficilement dans les cellules, une quantité accrue d'insuline va être produite en réponse à cette anomalie, afin de forcer les muscles et le tissu adipeux à consommer le glucose. Les patients insulino-résistants présentent donc une hyperinsulinémie due à la surproduction d'insuline par le pancréas. Aussi longtemps que le pancréas est capable de synthétiser suffisamment d'insuline, les taux sanguins de glucose sont contrôlés de façon adéquate et l'insulino-résistance est compensée. La glycémie est alors maintenue dans les limites de la normale.

L'obésité est la pathologie métabolique la plus commune actuellement dans les pays industrialisés, souvent associée à l'insulino-résistance. Elle représente un problème de santé publique car sa prévalence a considérablement augmenté au cours de ces dernières années, notamment chez l'enfant. Ce problème est d'autant plus aigu que des études épidémiologiques américaines ont révélé que la mortalité liée aux maladies cardio-vasculaires, au cancer et à d'autres pathologies augmentait chez les hommes et femmes présentant un surpoids modéré ou sévère quel que soit l'âge. Dans la tranche d'âge 30-39 ans, la mortalité dans une population d'obèses est nettement plus élevée que dans la population de poids normal: +160% chez les hommes et +100% chez les femmes. L'obésité serait la seconde cause de mortalité évitable après le tabac.

L'insulino-résistance souvent associée à l'obésité, à l'hypertriglycéridémie, l'intolérance au glucose ou à l'hypertension artérielle est un des facteurs de risques pour le diabète de type 2 et les maladies cardio-vasculaires. Le terme de Syndrome X (ou syndrome métabolique) a été proposé pour décrire l'association de ces anomalies. La prévalence du syndrome métabolique augmente parallèlement à celle de l'obésité. Par conséquent, le syndrome métabolique est devenu un syndrome fréquent dans les pays industrialisés et il est indispensable d'approcher les mécanismes de ses différentes composantes, en particulier l'insulino-résistance.

Plusieurs mécanismes ont été proposés comme causes possibles du développement de l'insulino-résistance. Ils incluent : (1) des anomalies génétiques ou acquises de l'insuline ou

d'une ou plusieurs protéines de la cascade de l'action de l'insuline (2) la malnutrition fœtale (3) une origine tissulaire spécifique en particulier l'augmentation de l'adiposité viscérale (4) des modifications des lipides membranaires qui ont conduit à l'hypothèse membranaire de l'insulino-résistance.

Cette hypothèse a fait l'objet de récents travaux au sein de notre laboratoire. Il a été montré des anomalies de la composition en phospholipides des membranes cellulaires chez des femmes obèses présentant des degrés variables d'insulino-résistance estimés par deux marqueurs : l'insulinémie à jeun et le HOMA. Les femmes les plus insulino-résistantes avaient un contenu élevé en sphingomyéline (SM) et une fluidité de la membrane érythrocytaire diminuée. Cette observation a été confirmée ultérieurement dans une cellule insulino-sensible : l'adipocyte. Enfin, il a été montré également que chez ces femmes obèses insulino-résistantes, le contenu membranaire élevé en SM de l'adipocyte était associé à une diminution de l'expression du facteur de transcription PPAR γ (récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes gamma).

Cependant, suite à ces précédents travaux, des questions restent à résoudre :

- Quelle est la part de l'obésité et de l'insulino-résistance dans les anomalies des membranes cellulaires ? Dans une population non obèse, l'insulino-sensibilité est variable. Les anomalies de composition en phospholipides peuvent-elles être détectées chez les plus insulino-résistants ?
- Ces anomalies existent-elles chez l'enfant obèse ?
- Les anomalies en phospholipides sont-elles accompagnées d'anomalies de la composition en acides gras des membranes ?
- Les anomalies de composition en phospholipides évoluent-elles après une perte de poids provoquée par un régime ou par une intervention pharmacologique ?
- Des altérations des lipoprotéines et/ou des interactions entre lipoprotéines et cellules peuvent-elles être la cause ou la conséquence des modifications de la composition en phospholipides des membranes cellulaires ?

C'est l'objet de la présente thèse que de tenter de fournir des réponses à ces questions.

Dans ce manuscrit nous avons tout d'abord, rappelé et rassemblé les données essentielles (**chapitre 1**) sur :

- le signal de l'insuline vu sous l'angle physiologique et les tissus sensibles à l'insuline : foie, muscle, tissu adipeux
- l'obésité
- les différents mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de l'insulino-résistance ainsi que les hypothèses majeures sur les origines de l'insulino-résistance
- le métabolisme des lipoprotéines.

Puis nous avons résumé les caractéristiques des sujets étudiés et l'ensemble des matériels et méthodes (**chapitre 2**).

La démarche de notre travail de thèse a été la suivante. Il avait été montré précédemment au laboratoire que les anomalies des phospholipides de l'hématie étaient sensiblement le reflet de celles de l'adipocyte. Notre projet portant sur un nombre de sujets relativement important, des biopsies de tissus adipeux étaient difficilement réalisables. Par conséquent, nous avons étudié les membranes d'hématies dans la plupart des travaux présentés ici..

La composition en phospholipides de la membrane d'hématies a été déterminée dans trois groupes : des sujets témoins non obèses, des adultes obèses, et des enfants obèses (**chapitre 3**).

Dans le cadre d'une étude longitudinale, nous avons étudié les anomalies membranaires en phospholipides et en acides gras d'un groupe d'obèses avant et après une perte de poids induite par un régime hypocalorique de trois mois qui améliore généralement l'insulino-sensibilité (**chapitre 4**).

Une étude similaire a été entreprise avec un groupe d'obèses dont la perte de poids a été induite par une intervention pharmacologique associée à un régime modérément hypocalorique (**chapitre 5**).

Enfin, dans le but d'approcher les interactions lipoprotéines-cellules, la dernière partie de ce travail a été consacrée à l'étude des modifications de la composition des lipoprotéines à jeun et au cours de la lipémie post prandiale, à leurs relations avec la composition membranaire de l'hématie et de l'adipocyte et l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. Nous présentons, ici, les résultats préliminaires obtenus dans un petit groupe d'obèses (**chapitre 6**).

CHAPITRE 1

Etude bibliographique

I - LE SIGNAL DE L'INSULINE: SITUATION PHYSIOLOGIQUE

A - LES MOLECULES INITIATRICES DU SIGNAL DE L'INSULINE

A.1 - L'INSULINE

L'insuline est une protéine ayant une masse moléculaire voisine de 6.000 Daltons. Elle est composée de deux chaînes A et B. Les chaînes A et B sont reliées par deux ponts disulfures et un pont disulfure supplémentaire se trouve à l'intérieur de la chaîne A. Dans la plupart des espèces, la chaîne A comprend 21 acides aminés et la chaîne B 30 acides aminés. Bien que la séquence d'acides aminés varie selon les espèces, certains segments de la molécule sont très conservés : les positions des 3 ponts disulfures, les deux extrémités de la chaîne A et les résidus C-terminaux de la chaîne B. Ces similitudes conduisent à une conformation tridimensionnelle de l'insuline qui est très similaire d'une espèce à l'autre (Figure 1).

Les molécules d'insuline forment des dimères en solution dus à des liaisons hydrogène entre les parties C-terminales des chaînes B. En présence d'ions zinc, les dimères s'associent en hexamères. Ces interactions ont d'importantes conséquences cliniques. Les monomères et dimères diffusent facilement dans le sang alors que la diffusion des hexamères est plus faible.

L'insuline est synthétisée dans les cellules β du pancréas sous forme d'un précurseur : la proinsuline. La proinsuline est composée de trois domaines : une chaîne A amino-terminale, une chaîne B carboxy-terminale et un peptide de liaison appelé peptide C. A l'intérieur du réticulum endoplasmique des cellules β , la proinsuline est exposée à plusieurs endopeptidases spécifiques qui excisent le peptide C, générant la forme mature de l'insuline. L'insuline et le peptide C libre sont conditionnés dans le Golgi sous forme de vésicules sécrétoires qui s'accumulent dans le cytoplasme.

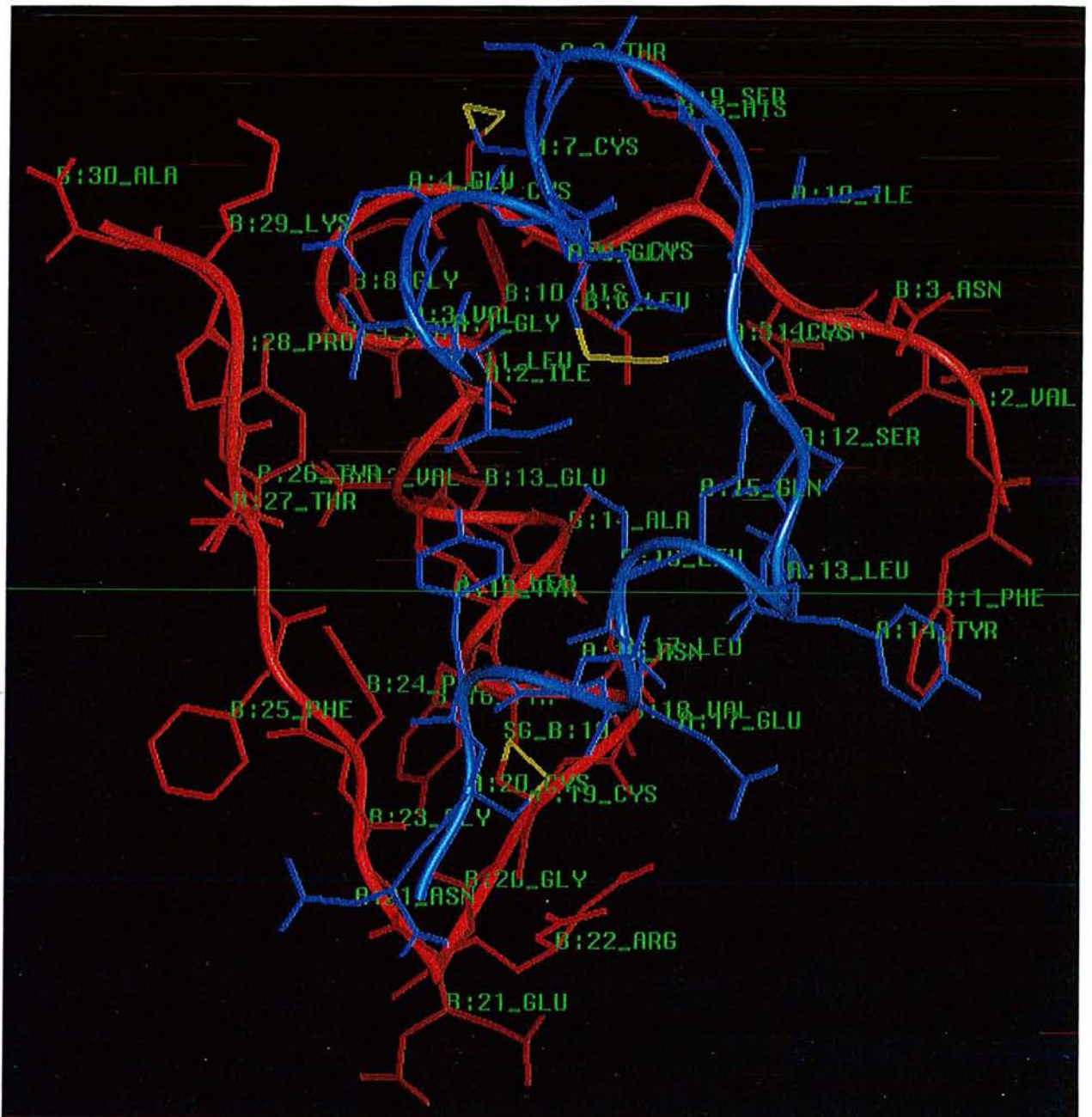


Figure 1: Conformation tridimensionnelle du monomère d'insuline.

Les ponts (2 intra-chaînes et 1 inter-chaîne) sont en jaune.

Lorsque la cellule β est stimulée, l'insuline est sécrétée par exocytose et diffuse dans les capillaires sanguins. L'insuline est sécrétée à la suite d'une élévation des concentrations sanguines de glucose, le glucose étant transporté dans la cellule β par diffusion facilitée à travers un transporteur de glucose. Les concentrations élevées de glucose dans la cellule β entraînent une dépolarisation de la membrane et un influx de calcium extra-cellulaire qui semble être le signal primaire pour l'exocytose des vésicules sécrétoires. Cependant, il semble qu'il existe également une voie indépendante du calcium conduisant à la sécrétion d'insuline.

A.2 - LE RECEPTEUR DE L'INSULINE : UN RECEPTEUR A TYROSINE-KINASE (FIGURE 2)

Le récepteur à insuline, codé par un seul gène (localisé sur le chromosome 19) (Yang-Feng et al., 1985), est une glycoprotéine de 350 kDa insérée dans la membrane plasmique. C'est un hétérodimère β - α - α - β formé de 2 sous unités α et de 2 sous unités β reliées par des ponts disulfures.

La sous unité α , constituée de 723 acides aminés et de masse moléculaire 130 kDa, est extracellulaire et possède un domaine riche en cystéines impliqué dans la liaison avec l'insuline (Lee et al., 1994).

La sous unité β , constituée de 620 acides aminés et de masse moléculaire 95 kDa, possède 3 régions (Ebina et al., 1985):

- * une région extracellulaire reliée aux sous unités α par des ponts disulfures.

- * une région transmembranaire constituant le point d'ancrage du récepteur à la membrane.

- * une région cytosolique délimitée en 3 domaines à tyrosine:
 - une région juxtamembranaire contenant une tyrosine 972. Cette région serait impliquée dans la reconnaissance de substrats intracellulaires (White et al., 1988). En effet, le résidu tyrosine 972 est impliqué dans l'interaction entre la sous unité β du récepteur à insuline et IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*) ou Shc (*Src homology collagen protein*).

- un domaine tyrosine-kinase contenant 3 tyrosines : tyr 1158, tyr 1162, et tyr 1163. Ce domaine possède une séquence de liaison de l'ATP où la lysine 1030 possède un rôle important. Si cet acide aminé est muté, il n'y a plus d'activité de la tyrosine kinase (MacLain et al., 1987; Chou et al., 1987). La forme active est la forme tri-phosphorylée (les formes bi et mono-phosphorylées étant moins actives), entraînant un changement de conformation permettant l'accès facile au site de liaison de l'ATP et des substrats (White et al., 1988).

- un domaine C-terminal contenant 2 tyrosines, tyr 1328, et tyr 1334. Le rôle de ces tyrosines dans la transduction du signal n'est pas connu. Ce domaine pourrait interagir avec la protéine Grb-10 (*growth facteur receptor-bound protein 10*) et avoir un effet modulateur sur les effets mitogènes de l'insuline (O'Neill et al., 1996).

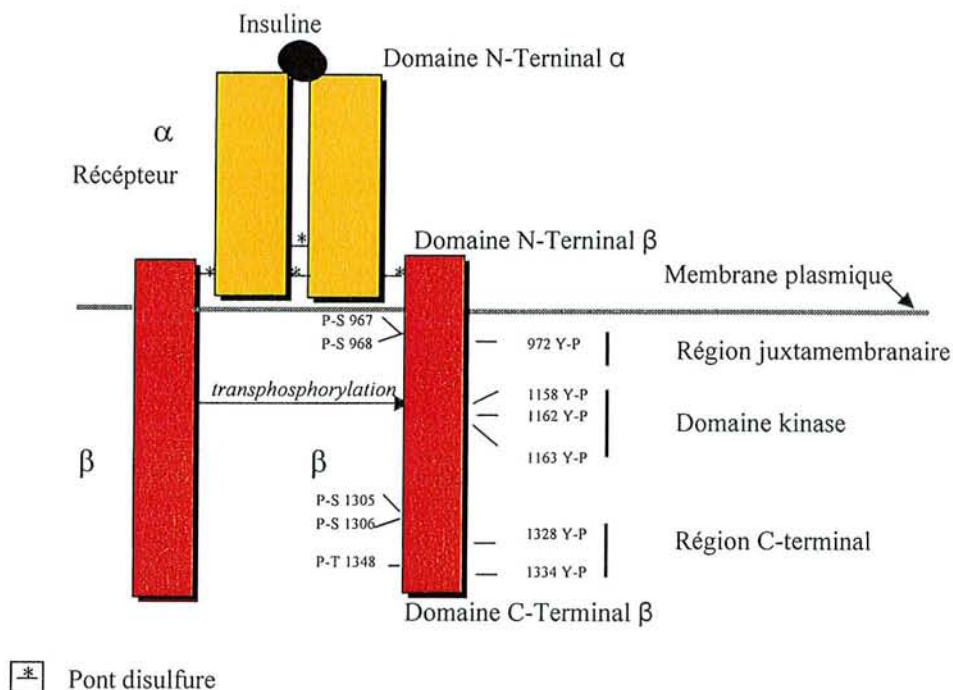


Figure 2: Les sites de phosphorylation du récepteur à insuline.

Y-P, tyrosine phosphorylée; P-S, sérine phosphorylée;
P-T, thréonine phosphorylée.

En l'absence d'insuline, l'activité tyrosine kinase de la sous unité β est très faible. L'interaction de l'insuline avec la sous unité α provoque un changement de conformation modifiant les interactions entre les hétérodimères α - β (Baron et al., 1995), et une transphosphorylation se produit entre les 2 sous unités β au niveau des résidus tyrosines permettant l'activation de la tyrosine kinase. Il faut noter que la sous unité β est une kinase constitutivement active. En effet, la digestion protéolytique de la sous unité α résulte dans l'activation de la sous unité β . Par conséquent, la fonction de la sous unité α dans le récepteur intact serait d'inhiber la sous unité β (Shoelson et al., 1988).

A.3 - LES SUBSTRATS INTRACELLULAIRES DU RECEPTEUR A INSULINE

A.3.1 - La famille IRS (*insulin receptor substrates 1, 2, 3 and 4*)

A.3.1.1 - Structure des IRSs

Ce sont des protéines hydrophiles très conservées (90 % homologie) (Keller et Lienhard, 1994). IRS-1 contient:

- * un domaine PH (*Pleckstrin homology domain*) en position N-terminale, site d'interaction avec les phospholipides (Yenush et White, 1997; White et al., 1997).

- * un domaine PTB (*phosphotyrosine-binding*) (Waters et Pessin, 1996), site d'interaction spécifique du résidu N terminal avec la phosphotyrosine en un motif NPXY (motif Asparagine-Proline-X-Tyrosine où X est un acide aminé quelconque), permettant l'interaction de IRS-1 avec le récepteur de l'insuline et par conséquent sa phosphorylation.

IRS-1 contient au moins 20 sites de phosphorylation de tyrosine incluant 6 en un motif YMXM (motif Tyrosine-Méthionone-X-Méthionine), et 3 en YXXM (motif Tyrosine-X-X-Méthionine), (Keller et Lienhard, 1994). Au moins 8 résidus tyrosines subissent une phosphorylation lors de l'activation du récepteur à insuline. IRS-1 contient également plus de 30 résidus sérines/thréonines impliqués dans des sites de liaison de phosphorylation avec les

sérines/thréonines des kinases. En l'absence d'insuline, IRS-1 est phosphorylée au niveau des résidus sérines et, après stimulation par l'insuline, les résidus sérines et thréonines sont phosphorylés (Sun et al., 1995).

Les protéines IRS-2, 3, et 4 possèdent des similitudes avec IRS-1 incluant notamment un domaine PH, un domaine PTB et de multiple sites de phosphorylation de tyrosine (Lavan et al., 1997; Smith et al., 1997).

A.3.1.2 - Fonction des IRSs

* *Transmission et amplification du signal de l'insuline:*

L'IRS-1 à tyrosines phosphorylées est une protéine capable d'interagir avec d'autres protéines contenant des domaines SH2 (*Src homology 2*) qui sont formés d'environ 100 acides aminés (Chardin, 1994).

Les tyrosines phosphorylées de l'IRS-1 servent de sites d'ancrage pour des protéines à domaines SH2 qui sont ainsi activées: la sous-unité p85 de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), la PLC γ (sous unité γ de la phospholipase C), le facteur Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), et la tyrosine phosphatase SHP2 (Myers et al., 1994), permettant la transmission du signal de l'insuline. L'amplification du signal du récepteur à insuline par les protéines IRS se traduit par une autophosphorylation des sites protéiques contenant des domaines SH2.

De plus, des protéines IRS peuvent être engagées dans d'autres voies de signalisation (*Ras-MAP Kinase cascade*).

* *Modulation de la réponse à insuline:*

Il a été rapporté que la phosphorylation des résidus sérine-thréonine de IRS-1 représentait un élément clé de la transduction du signal de l'insuline. En effet, le traitement d'adipocytes par l'acide okadaïque (un inhibiteur des phosphatases sérines/ thréonines), diminue la phosphorylation des tyrosines de l'IRS-1 et l'activité de la PI3-kinase (Tanti et al., 1994).

Par ailleurs, la phosphorylation d'IRS-1 sur les résidus sérines provoque une inhibition de la tyrosine kinase du récepteur à l'insuline. En effet, *in vitro*, deux protéines, la GSK-3 (*glycogen synthase kinase-3*) et le TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), sont capables de phosphoryler IRS-1 au niveau des résidus sérines et induire une diminution de l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline (Eldar et Krebs, 1997).

Lorsqu'on active la PKC (protéine kinase C), il y a une inhibition de la phosphorylation des tyrosines d'IRS-1. Et cette phosphorylation a lieu au niveau de la sérine 612 (De Fea et Roth, 1997a), et la MAP Kinase (*mitogen-activated-protein kinase*) interviendrait dans cette inhibition (De Fea et Roth, 1997b).

A.3.2 - Les protéines Shc (*Src homology collagen protein*)

Shc est une autre protéine de signalisation intra-cellulaire capable de s'associer au récepteur à l'insuline tout comme IRS.

Il existe 3 isoformes de Shc (46, 52 et 66 kDa) chacun contenant un domaine SH2 à l'extrémité C-terminale et un domaine PTB à l'extrémité N-terminale.

En réponse à l'insuline, Shc est activée par phosphorylation au niveau des tyrosines. Cette forme active interagit avec Grb2.

Shc est impliquée dans les voies de signalisation mitotique.

B - DESCRIPTION DES 2 VOIES MAJEURES DE SIGNALISATION ASSOCIEES AU SIGNAL DE L'INSULINE.

B.1 - LA VOIE P42/P44 MAPK KINASE (*MITOGEN-ACTIVATED-PROTEIN KINASE*)

B.1.1 - Activation de p21 Ras

Après stimulation par l'insuline, IRS-1 ou Shc sont aussitôt phosphorylés au niveau du résidu tyrosine par les tyrosines kinases du récepteur à l'insuline. Les résidus de tyrosine phosphorylés de IRS-1 et/ou Shc vont se lier spécifiquement avec Grb2, une protéine dépourvue d'activité enzymatique possédant des domaines SH2. Grb2 est formée de 2 domaines SH3 séparés par un domaine SH2. Ces domaines SH3 vont interagir avec des régions riches en proline de la protéine Sos (*son of sevenless*). Les complexe IRS-Grb2-Sos ou

Shc-Grb2-Sos emmène la protéine Sos à proximité du lieu d'interaction de p21 Ras avec la membrane (Waters et al., 1996).

La protéine p21 Ras est une « petite protéine G » monomérique qui est activée lorsqu'elle se lie au GTP. Sous l'effet de la protéine Sos, le complexe p21 Ras-GDP est convertit en p21 Ras-GTP. La p21 Ras-GTP active alors la protéine Raf-1 qui provoque une cascade de phosphorylation (MAP kinase kinase puis MAP kinase). La désactivation de la p21 Ras-GTP par hydrolyse du GTP en GDP n'est pas spontanée. Elle nécessite l'intervention d'une protéine stimulatrice de l'activité GTPasique dénommée GAP (*GTPase activating protein*).

B.1.2 - De p21 Ras à MAPK

B.1.2.1- Activation de Raf-1 (figure 3)

Raf-1 est une protéine kinase à résidus sérine/ thréonine de 70-75 kDa présentant 2 domaines fonctionnels: un domaine à activité régulatrice à l'extrémité N terminale et un domaine à activité sérine/ thréonine kinase à l'extrémité C-terminale (Marshall, 1996). Ce domaine C-terminal interagit avec MEK (également appelé MAP kinase kinase) et l'active. Le mécanisme d'activation de Raf-1 est un mécanisme complexe à plusieurs étapes impliquant le recrutement de Raf-1 vers la membrane par association avec p21 Ras, phosphorylation sur les résidus sérines et tyrosines, interaction avec les protéines 14-3-3 (ayant un rôle de reconnaissance pour certains résidus phosphosérines) et probablement oligomérisation de Raf-1.

B.1.2.2 - De MEK à MAP kinase (figure 3)

Les protéines MEK, sont des protéines kinases activées par phosphorylation au niveau des résidus sérines/ thréonines par MEKKs (MAPK/ ERK kinase kinases), tout comme Raf-1 (Marshall, 1996). Une fois activée, la protéine MEK phosphoryle la MAPK sur le résidu tyrosine 185 et thréonine 183 (Nakielny et al., 1992). Cette double phosphorylation par MEK est nécessaire pour une activation maximale de MAPK (Payne et al., 1991). Une fois activée, la p42/p44 MAP kinase (forme active) peut phosphoryler un grand nombre de protéines au niveau des résidus sérines et/ou thréonines : la MAPKAK1 et des facteurs de transcription.

B.1.3 - Les effets biologiques de la voie p42/p44 MAP kinase

Les effets biologiques associés à cette voie sont la prolifération et différenciation cellulaire.

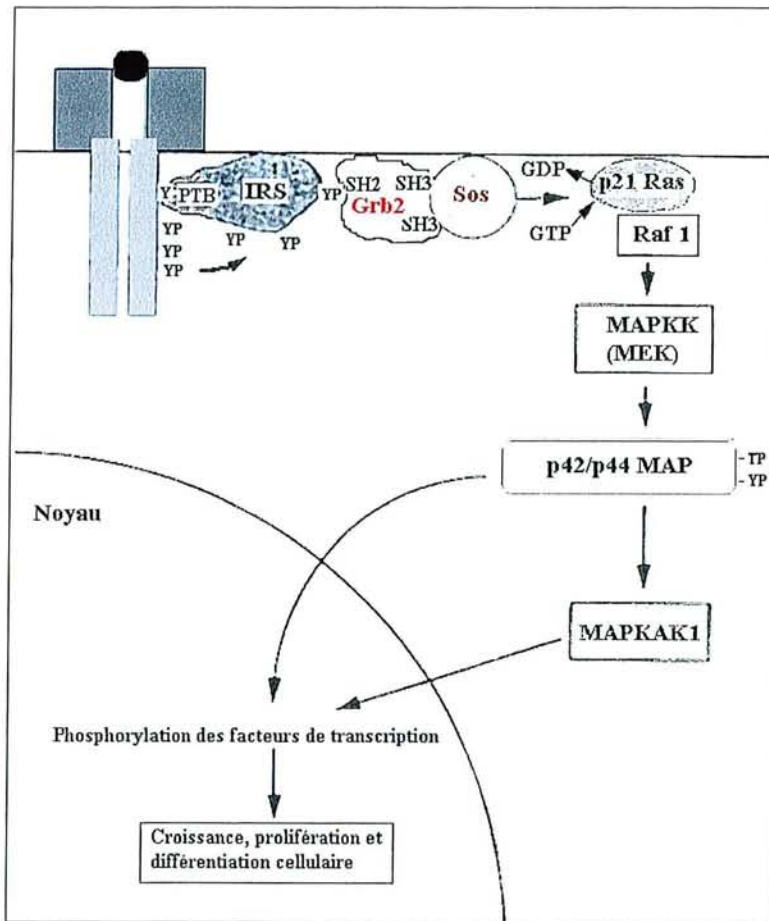


Figure 3: Mécanisme d'activation de la voie de signalisation de p42/p44 MAP kinase.

B.2 - LA VOIE PI3 KINASE/PKB

B.2.1 - Activation de la PI 3 kinase

Les protéines IRS ont, même en l'absence d'insuline, une forte affinité pour l'enzyme PI3K (constituée d'une sous unité catalytique p110 et d'une sous-unité régulatrice p85 possédant 2 régions SH2, un motif inter SH2 et une région SH3).

En réponse à l'insuline, il y a une augmentation du nombre d'associations de la PI3K, avec l'IRS-1 à tyrosine phosphorylées, et cette liaison stimule l'activité catalytique de la sous unité p110 (Lamphere et al., 1994). Celle-ci est maximale lorsque les domaines SH2 forment un motif YMXM phosphorylé (Rordorf-Nikolic et al., 1995).

L'activité de la PI3 kinase est également stimulée par la phosphorylation de IRS-2 et 3. En effet, dans les adipocytes, après stimulation par l'insuline, p85 s'associe beaucoup plus rapidement avec IRS-3 qu'avec IRS-1 ou IRS-2 suggérant qu'IRS-3 est le principal régulateur de PI3 kinase dans le tissu adipeux (Smith et al., 1997).

L'une des principales fonctions de la PI3K dans cette activation est la production de PdtIns (3,4,5)P3 ou PdtIns P2 (Ellis et al., 1987; Baron et al., 1995) qui sont capables d'interagir avec les protéines kinases de PKB en les fixant sur la membrane plasmique.

B.2.2 - La cible de PI 3 kinase (PI3K): la protéine kinase B (PKB)

La PI3K interagit avec les domaines PH des PKB (protéine kinase B). PKB devient alors un substrat pour 2 protéines kinases, PDK1 et PDK2 (*phosphatidyl-dependent protein kinases 1 et 2*) capables de phosphoryler PKB sur sa thréonine 308 puis sur sa sérine 473, respectivement. Ce n'est qu'à la suite de la phosphorylation des 2 résidus de la PKB, que celle-ci est activée et se détache de la membrane pour phosphoryler ses cibles cellulaires.

B.2.3 – Protéine kinase C (PKC)

La PI3K, par phosphorylation des phosphoinositides, peut également stimuler certains membres des PKC atypiques (PKC λ et ζ), (Kotani et al., 1998; Standaert et al., 1997).

Le mécanisme d'activation de la PKC peut résulter

- soit de la phosphorylation par PDK-1 (Schmitz-Peiffer, 2000),
- soit de son recrutement à partir des membranes intra-cellulaires; en effet, la PKC est présente dans les vésicules intra-cellulaires contenant les GLUT4 (Braiman et al., 2002).

B.2.3 - Les effets biologiques associés à l'activation de la PI3 kinase et de la PKB (figure 5)

B.2.3.1 - Le transport du glucose

L'entrée du glucose dans les cellules s'effectue par un phénomène de diffusion facilitée par l'intermédiaire de transporteurs de glucose. Au moins 11 isoformes de GLUT ont été identifiés (Joost et Thorens, 2001). L'isoforme GLUT4 est exclusivement exprimée dans les tissus insulino-sensibles (muscle squelettique et cardiaque, tissu adipeux brun et blanc). Dans ces tissus, le transporteur de glucose possède la particularité d'être stimulable par l'insuline. Les protéines GLUT4 sont séquestrées dans des compartiments vésiculaires en l'absence d'insuline. La fixation de l'insuline sur son récepteur stimule la translocation des transporteurs GLUT4 vers la membrane plasmique et favorise le transport du glucose vers la cellule.

La PI3K et la PKB jouent un rôle important dans ce transport. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la PI3K, la wortmannine, bloque totalement le transport stimulé du glucose et la translocation de GLUT4 vers la membrane (Okada et al., 1994). L'expression constitutive de la sous unité catalytique p110 augmente le transport du glucose par activation de la translocation de GLUT4, suggérant que PI3K peut seule amorcer le transport du glucose (Tanti et al., 1996). De même, l'expression d'une forme constitutivement active de PKB conduit à la translocation des GLUT4 vers la membrane en l'absence d'insuline (Tanti et al., 1997). La PKB catalyserait la phosphorylation d'une protéine (non encore identifiée) qui provoquerait le transport stimulé du glucose vers la cellule.

B.2.3.2 – La glycolyse

La glycolyse est une voie métabolique universelle pour le catabolisme du glucose en pyruvate accompagnée par la formation d'ATP. Ce processus est catalysé par dix enzymes cytosoliques, et tous les intermédiaires sont des composés phosphorylés. Dans la phase préparatoire de la glycolyse, de l'ATP est utilisé pour transformer le glucose en un intermédiaire phosphorylé, le fructose-1,6-bisphosphate, puis la liaison carbone-carbone entre le C-3 et le C-4 est rompue pour fournir deux molécules de trioses phosphate.

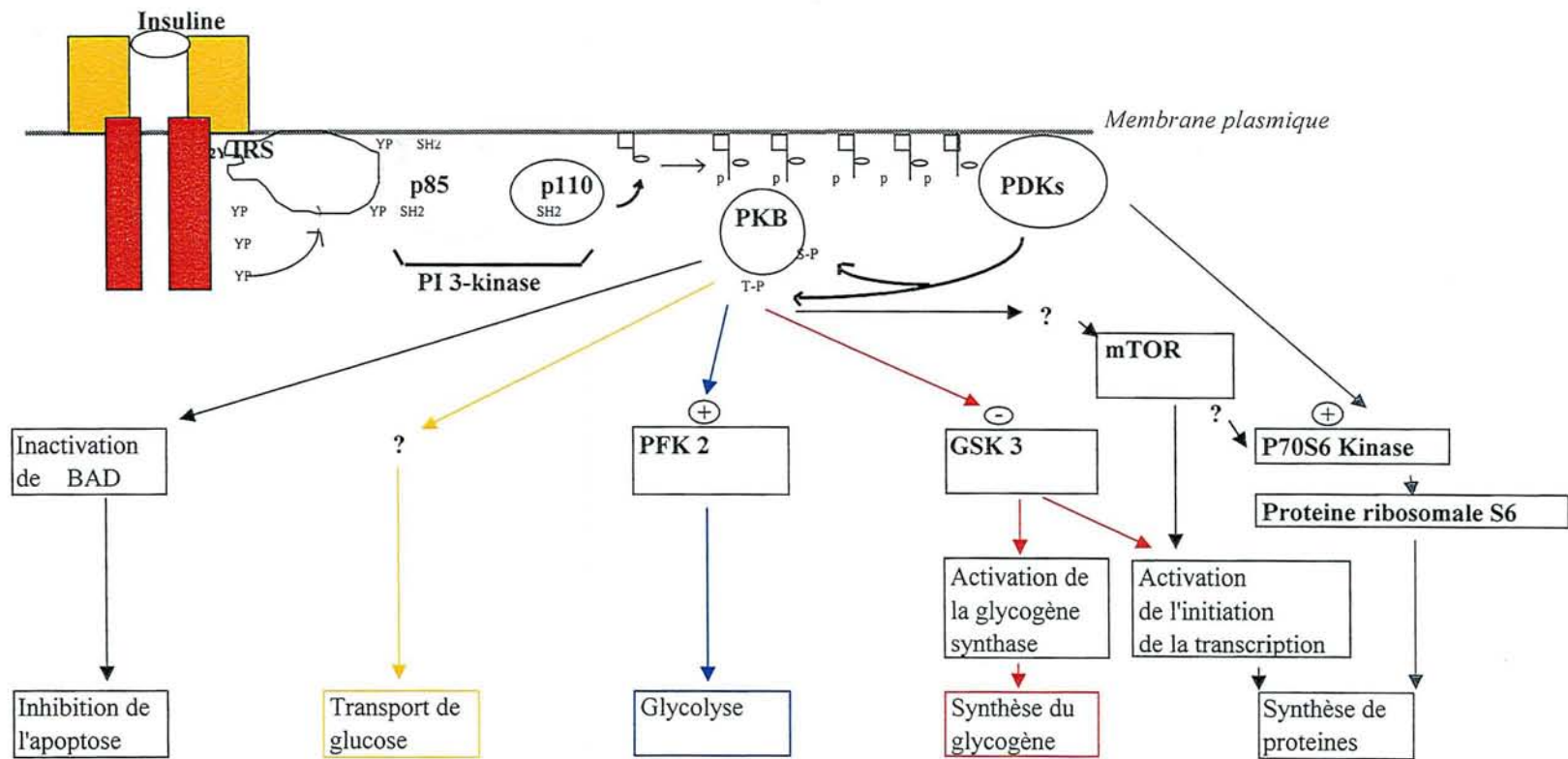
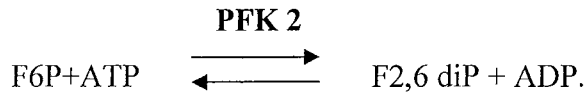


Figure 5: Les effets biologiques résultants de l'activation de la PI 3-kinase

Il existe un deuxième niveau de régulation qui fait intervenir le fructose-2,6 diphosphate issu d'une transphosphorylation du fructose-6 phosphate par la 6-phosphofructo 2-kinase (PFK 2) selon le schéma suivant:



La PFK 2 est une enzyme limitante de la glycolyse et une étude récente a montré que la phosphorylation de PKB active la PFK 2 dans le tissu cardiaque, stimulant ainsi la glycolyse (Deprez et al., 1997).

B.2.3.3 - La synthèse du glycogène

L'insuline permet la mise en réserve du sucre sous forme de glycogène dans le foie et les muscles à la suite d'un repas. La glycogène synthétase convertit le glucose en glycogène, processus favorisant le stockage d'énergie au sein de l'organisme.

La stimulation de la synthèse du glycogène par l'insuline est le résultat d'une déphosphorylation et de l'activation de l'enzyme glycogène synthétase (enzyme limitante de la voie). Les enzymes responsables de la phosphorylation et de la déphosphorylation de la glycogène synthétase sont respectivement la glycogène-synthétase kinase 3 (GSK-3), et la protéine phosphatase 1 (PP1).

L'utilisation de la wortmannine et de LY294002, deux inhibiteurs de la PI3K, a permis de montrer l'importance de l'implication de la PI3K dans la synthèse du glycogène stimulée par l'insuline (Welsh et al., 1994). La wortmannine est un inhibiteur irréversible modifiant de façon covalente un résidu lysine (Lys 802) présent dans le domaine catalytique (Wymann et al., 1996).

Des travaux ont montré que l'activation de PKB induisait une déphosphorylation GSK-3, son inactivation et par conséquent, l'activation de la glycogène synthétase (Cohen et al., 1997; Cross et al., 1995; Moule et al., 1995).

L'insuline peut également augmenter la synthèse du glycogène en augmentant sa déphosphorylation par PP1 (Schmitz-Peiffer, 2000).

B.2.3.4 - Synthèse des protéines (figure 5)

Deux voies principales de synthèse de protéines peuvent être induites par la voie de signalisation de l'insuline: (1) activation du facteur d'initiation 2B (eIF2B) de la traduction, chez les eucaryotes, (2) inhibition de la protéine GSK-3 et activation de l'initiation de la traduction par dissociation de la protéine 4EBP1 de la protéine eIF4E (Combettes-Souverain et Issad, 1998).

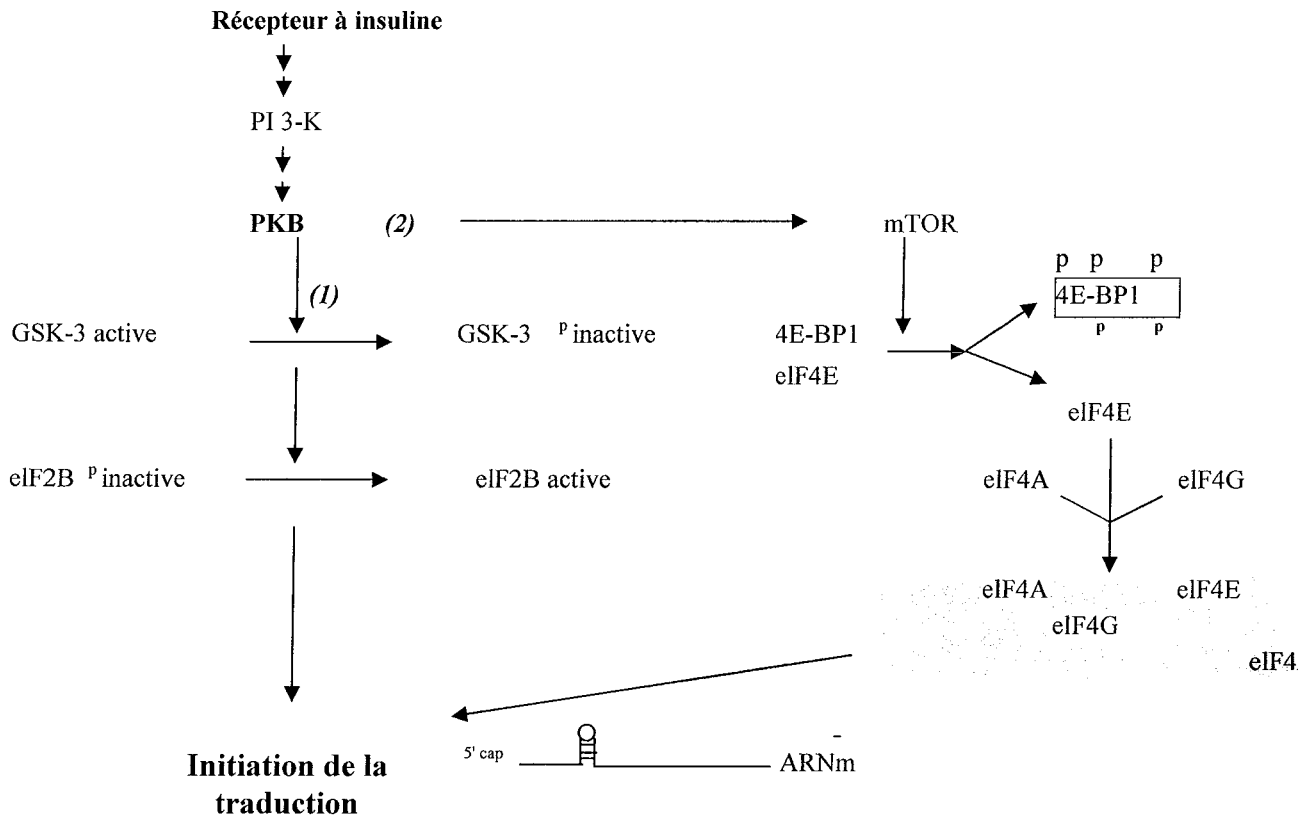


Figure 5: Deux mécanismes d'activation de la synthèse des protéines par l'insuline.

B.2.3.5 - Inhibition de l'apoptose

La forme déphosphorylée de la protéine BAD interagit avec Bcl_{xl} , protéine appartenant à la famille Bcl pour induire l'apoptose. L'effet anti-apoptotique de l'insuline se traduit par une phosphorylation d'un résidu sérine de la protéine BAD *via* l'activation de PKB et il se produit une dissociation de la protéine BAD de Bcl_{xl} pour former un complexe inactif avec la protéine 14.3.3 (Zha et al., 1996).

C-LES CELLULES SENSIBLES A L'INSULINE

A jeun, la glycémie d'un sujet normal résulte de l'équilibre qui s'établit entre la production de glucose par le foie et son utilisation par différents tissus. Certains captent et utilisent le glucose sans intervention de l'insuline. Ils sont non insulino-dépendants comme le cerveau en particulier. D'autres requièrent la présence d'insuline: ils sont insulino-dépendants, en particulier le muscle et le tissu adipeux.

C.1 - LE FOIE

Les fonctions métaboliques du foie sont de première importance (Tableau 1)

C.1.1- Métabolisme des carbohydrates

Les transporteurs de glucose à la surface des cellules hépatiques sont les GLUT2. Ils ne sont pas stimulés par l'insuline. Ils existent en grand nombre à la surface des cellules hépatiques. Ces transporteurs sont si nombreux que la concentration de glucose dans le foie est approximativement la même que dans le sang. Le glucose entre rapidement dans le foie par la veine portale. Le glucose est phosphorylé par une glucokinase. A partir du glucose-6-phosphate, trois voies sont possible : glycolyse, glycogénèse ou voie des pentose phosphates. En ce qui concerne la glycogénèse, le foie a une intéressante méthode d'activation de la glycogène synthétase. Elle est stimulée par l'augmentation de glucose et non par l'insuline.

Le foie joue un rôle central dans le contrôle de la production de glucose. Seul le foie et dans une certaine mesure, les reins possèdent la glucose-6-phosphatase qui permet au glucose d'être produit dans les tissus et ensuite relâché dans la circulation. Le glucose relâché est dérivé de la glycogénolyse et de la gluconéogenèse. La gluconéogenèse, biosynthèse endogène du glucose à partir de précurseurs non glucidiques est possible dans le foie à partir du lactate produit par exemple en excès après un exercice musculaire. Le pyruvate, des acides aminés glucogéniques (essentiellement l'alanine) et le glycérol sont également des précurseurs pour la gluconéogenèse.

Tableau 1: Actions métaboliques du foie.

Substrats	Métabolisme
Carbohydrates	Stockage du glucose sous forme de glycogène
	Glycogénolyse
	Gluconéogenèse
	Clairance du glucose
	Clairance du lactate
	Métabolisme d'hexoses autres que le glucose
Lipides	Production de triglycérides (à partir du glucose)
	Production de VLDL
	Synthèse de cholestérol
	Synthèse d'acides gras et dégradation
	Kétogenèse
Protéines	Dégradation des acides aminés
	Urégenèse
	Synthèse de protéines plasmatiques.
Hormones	
Action sur le foie,	Insuline, Glucagon, Hormone de croissance, Glucocorticoïdes, Catécholamines, Thyroxine
Catabolisées par le foie	Insuline, Glucagon, Hormone de croissance, Glucocorticoïdes, Thyroxine

Le foie est aussi impliqué dans la sécrétion d'insuline et la sensibilité à l'insuline à travers des voies neurologiques.

C.1.2 - Métabolisme des lipides

Une fraction du glucose intra-hépatique peut être converti en lipides par un processus de lipogenèse *de-novo*. Dans le processus de transformation du glucose, le foie produit déjà du glycogène puis la synthèse d'acides gras est activée (ceci exige une sécrétion d'insuline). La présence de glycérol-3 phosphate est nécessaire pour la production de triglycérides qui sont

ensuite incorporés dans les lipoprotéines et exportés vers d'autres tissus. Les VLDL et les HDL naissantes sont produites dans le foie.

C.1.3 - Effets de l'insuline sur les fonctions métaboliques du foie.

L'insuline stimule la synthèse de glycogène, inhibe la dégradation du glycogène (glycogénolyse). L'insuline stimule également l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation du glucose (glucokinase, L-type pyruvate kinase et les enzymes lipogéniques).

L'insuline inhibe la sécrétion hépatique des VLDL indirectement à travers une action anti-lipolitique sur le tissu adipeux. Cependant, en cas de concentration d'insuline élevée, l'hormone exerce un effet stimulateur sur la sécrétion des VLDL (Zammit et al., 2001).

Par contre, elle inhibe des gènes impliqués dans la néoglucogenèse. Le plus important est le gène codant pour la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPCK), (Sutherland et al., 1996; Hall et al., 2000), ont identifié une séquence heptanucléotide (TGTTTTG) dans la région promotrice de ce gène correspondant à un élément de réponse à l'insuline. Ainsi, en l'absence d'insuline, cette séquence sera le site de fixation d'un facteur de transcription positif, activé par les glucocorticoïdes, pour initier la transcription de l'ARNm de PEPCK. En présence d'insuline, la séquence n'est plus disponible pour le facteur de transcription, et la transcription est réprimée. Les mécanismes par lesquels l'insuline contrôle l'expression de ces gènes ne sont pas totalement élucidés. Le facteur de transcription SREBP-1c a été proposé comme un médiateur important des effets transcriptionnels de l'insuline (Ferre et al., 2001).

C.2 - LE MUSCLE SQUELETTIQUE

Nous limiterons cette revue bibliographique au muscle squelettique qui représente environ 40% de la masse corporelle. Il est le tissu essentiel impliqué dans la stimulation du transport du glucose induit par l'insuline.

C.2.1 - Métabolisme des carbohydrates

Les transporteurs GLUT1 et GLUT4 existant dans la cellule musculaire, le transport de glucose à l'état basal dépend essentiellement des transporteurs de glucose ubiquitaires GLUT1. Chez le rat adulte, les GLUT4 sont largement majoritaires, les GLUT1 ne représentant que 5-10% du total des transporteurs. Les GLUT4 séquestrés dans des compartiments vésiculaires en l'absence d'insuline migrent vers le sarcolemme et les tubules T après la fixation de l'insuline sur son récepteur. Après la phosphorylation du glucose, le glucose 6 phosphate est engagé essentiellement dans la voie de la glycogénèse mais également dans la voie de la glycolyse (DeFronzo, 1988). Dans des conditions où il y a un déficit en oxygène, du lactate est formé qui peut être relâché par des transporteurs de monocarboxylates. Ces transporteurs sont également responsables de l'entrée dans la cellule musculaire des corps cétoniques (β -hydroxybutyrate, acétoacétate) qui sont également des substrats du métabolisme musculaire (Zorzano et al., 2000).

C.2.1.1. - Effets de l'insuline

L'entrée du glucose et le stockage ultérieur sous forme de glycogène est stimulé très fortement par l'insuline, la protéine kinase B et la glycogène synthétase kinase 3 semblant avoir un rôle très important dans la stimulation de la synthèse du glycogène. L'insuline augmente également la glycolyse.

C.2.1.2 - Autres voies de stimulation de l'entrée du glucose et de la glycogénèse dans le muscle

L'entrée du glucose et la synthèse du glycogène sont stimulées à la suite d'un exercice soutenu. En effet, l'exercice ou des contractions musculaires conduisent à l'altération dans l'expression et l'activité de protéines impliquées dans la translocation du signal de l'insuline et induisent également la translocation des GLUT4. Il existe un effet additif de l'insuline et de l'exercice qui pourrait être interprété comme une preuve de l'existence de voies séparées pour la stimulation du transport du glucose par l'insuline ou l'exercice/contraction musculaire. L'inhibition de l'activité PI3K entraînant une diminution du transport du glucose stimulé par l'insuline mais pas le transport stimulé par la contraction, les changements induits par l'exercice pourraient être reliés à une augmentation de la transduction du signal à travers la voie des MAP kinases (Richter et al., 2001; Ryder et al., 2001).

Par ailleurs, la sensibilité à l'insuline et à l'exercice pourrait concerner des pools distincts de GLUT4. Ces pools pourraient être répartis dans des endosomes et dans des vésicules de stockage, ces dernières migrant vers la membrane en réponse à l'insuline.

Enfin, la synthèse du glycogène serait stimulée par une voie sensible à la rapamycine, impliquant les acides aminés (Yeaman et al., 2001).

C.2.2 - Métabolisme des lipides

Les muscles squelettiques utilisent les acides gras comme sources d'énergie pour couvrir plus de 90 % de leurs besoins au repos. Ce sont aussi des substrats énergétiques pour les exercices physiques de faible intensité, en situation aérobie.

Au niveau musculaire, le métabolisme des acides gras présente certaines spécificités :

1) Le muscle n'est pas un tissu lipogénique, bien qu'il existe une activité acétyl-CoA carboxylase et une production de malonyl-CoA. Les mécanismes de l'entrée des acides gras dans la cellule musculaire sont controversés. Il pourrait s'agir d'une simple diffusion ou d'un transport par des protéines : « *Fatty acid binding protein plasma membrane* » (FABPpm), « *Fatty acid translocase* » (FAT), « *Fatty acid transporter* » (FAT/CD36), (Bonen et al., 1998). L'existence d'un système de transport des acides gras à longues chaînes dans le muscle peut être essentiel pour 1) faciliter un transport rapide et contrôler des acides gras afin de satisfaire aux besoins métaboliques des muscles en activité 2) faire face à une augmentation des acides gras circulants. Il a été montré récemment que l'insuline stimulait la translocation de la protéine FAT/CD36 d'une localisation intracellulaire vers la membrane plasmique ainsi que l'entrée des acides gras (Luiken et al., 2002). Les acides gras sont ensuite stockés sous forme de diglycérides, triglycérides, incorporés dans les phospholipides ou oxydés.

2) L'utilisation des acides gras comme source d'énergie nécessite par conséquent l'hydrolyse des triglycérides. La lipoprotéine lipase (LPL) assure l'hydrolyse des triglycérides des lipoprotéines (VLDL) et préférentiellement les triglycérides des chylomicrons. L'activité de la LPL qui est tissu spécifique est régulée par l'insuline, le statut nutritionnel et l'exercice. L'insuline inhibe l'activité de la LPL du muscle squelettique (Farese et al., 1991; Laville et al., 1996). Elle est augmentée durant le jeûne et inhibée au cours de l'alimentation (Fielding

et Frayn, 1998). L'exercice augmente également l'activité de la LPL (Greiwe et al., 2000). A jeun ou durant un exercice, l'augmentation de la LPL est inversement reliée au rapport Insuline/Glucagon (Lithell et al., 1978, Taskinen et Nikkila, 1980).

3) Les acides gras incorporés dans les cellules musculaires ou relâchés lors de l'hydrolyse des triglycérides sont transportés dans les mitochondries des cellules musculaires pour être oxydés. L'insuline inhibe l'oxydation des acides gras (Dyck et al., 2001).

C.3 - LE TISSU ADIPEUX

Chez l'homme, il existe deux variétés de tissu adipeux: le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Le tissu adipeux blanc est impliqué dans la régulation du métabolisme du glucose et des lipides, dans le système inflammatoire, dans la régulation de la pression sanguine, dans la fibrinolyse et dans l'appétit. Le tissu adipeux brun représente une source de chaleur.

Les adipocytes, éléments cellulaires constitutifs des deux tissus adipeux, proviennent d'une cellule souche d'origine mésodermique. Les cellules souches mésenchymateuses multipotentes sont à l'origine des chondroblastes (futures cellules cartilagineuses), des myoblastes (futures cellules musculaires) et des adipoblastes (futures cellules adipeuses). Les adipoblastes (impossibles à distinguer morphologiquement des fibroblastes), se différencient en préadipocytes blancs ou bruns qui se différencieront en adipocytes blancs et bruns. L'innervation sympathique est responsable du recrutement des préadipocytes bruns et facilite leur différenciation en adipocytes bruns, alors qu'à l'inverse cette même innervation sympathique freine le recrutement des préadipocytes blancs et leur différenciation en adipocyte blanc. Le doute existe quant à la possibilité de conversions entre préadipocytes blancs et bruns, et, plus encore, entre adipocytes blancs et bruns.

C. 3.1 – Le tissu adipeux brun.

Surtout abondant chez les mammifères hibernants, le tissu adipeux brun est néanmoins présent dans l'espèce humaine, principalement au début de la vie. Chez le fœtus et le nouveau-né, il se répartit dans la région interscapulaire, autour des gros vaisseaux (aisselle, cou), des reins et du cœur et représente 4% du poids corporel.

C.3.1.1 - L'adipocyte brun

Les adipocytes bruns ont un noyau central et un cytoplasme rempli de nombreuses petites vacuoles lipidiques et de mitochondries. L'oxydation des acides gras est abondante dans ces mitochondries, la consommation d'O₂ est élevée et les cytochromes oxydases y sont abondantes (ce qui donne la couleur brune à ces adipocytes). Le tissu adipeux brun est impliqué dans la thermogénèse sans frisson et celle induite par l'alimentation. Sa localisation habituelle au contact immédiat des principaux vaisseaux sanguins facilite la diffusion de la chaleur produite dans tout l'organisme. La vascularisation et l'innervation sympathique sont richement développées. Chaque adipocyte, porteur de récepteurs β_3 -adrénergiques, est au contact d'une terminaison sympathique noradrénergique.

C.3.1.2 - Fonctions des adipocytes bruns

Dans les adipocytes bruns, l'énergie libérée par l'oxydation mitochondriale des acides gras, a la capacité de se convertir en chaleur, au lieu d'être couplée à la phosphorylation oxydative. La protéine mitochondriale responsable de ce découplage est la thermogénine ou UCP1 (*UnCoupling Protein 1*). Il existe une étroite corrélation entre le contenu en thermogénine, dont l'expression est contrôlée au niveau transcriptionnel par les catécholamines, et le potentiel thermogénique du tissu. L'adipocyte brun contient de la T4-5' déiodase, enzyme capable de convertir la T4 circulante en triiodothyronine, et indispensable pour que la transcription du gène de l' *Ucp 1*, et donc la réponse au froid des adipocytes bruns, soit maximale. L'invalidation du gène *Ucp 1* entraîne chez les animaux *Ucp*^{-/-} une très grande sensibilité au froid. Ils ne peuvent maintenir leur température à un niveau élevé et leurs adipocytes bruns accumulent une quantité anormalement élevée de triglycérides, ce qui confirme le rôle essentiel de l'UCP 1 dans la thermogénèse normalement induite par le froid.

C.3.2 - Le tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc représente d'une part une réserve énergétique pour l'organisme et d'autre part assure une fonction de protection mécanique des organes. Il contient les préadipocytes, précurseurs des adipocytes à différents stades de différenciation et les adipocytes. Les éléments cellulaires sont séparés par des fibres de réticuline et de très nombreux capillaires sanguins ainsi que par des fibres nerveuses amyéliniques représentant des fibres sympathiques noradrénergiques. Les adipocytes sont groupés en petits lobules, visibles à l'œil nu, séparés par de fines cloisons conjonctives contenant des fibroblastes, des macrophages, des mastocytes et des fibrilles de collagène.

Sa répartition se fait dans 3 types de localisation:

- 1) le panicule adipeux sous-cutané, diffus et régulier chez le fœtus et le nouveau-né, prédominant sur la nuque et les épaules chez l'homme, sur la poitrine, les hanches, les cuisses et les fesses chez la femme;
- 2) les régions profondes, comme le mésentère, les épiploons, les régions rétro péritonéales;
- 3) les orbites, les paume et face palmaire des doigts, la plante des pieds et la face plantaire des orteils.

Les deux premières localisations correspondent à des réserves énergétiques qui fondent lors du jeûne, alors que la troisième joue un rôle de soutien et de protection mécanique et est peu sensible au jeûne.

C.3.2.1 - L'adipocyte blanc

Les adipocytes sont des cellules volumineuses, sphériques ou ovalaires dont la taille varie énormément (20-200 μ m en diamètre). Ils renferment une volumineuse vacuole contenant des triglycérides et des acides gras libres. La vacuole prend toute la place et refoule les autres éléments du cytoplasme (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique granulaire, réticulum endoplasmique lisse et mitochondries) à la périphérie. Le noyau excentré est aplati et situé contre la membrane plasmique.

C.3.2.2 - Différenciation des préadipocytes en adipocytes

Des investigations morphologiques ont montré que les adipocytes se développaient à partir des préadipocytes définies comme des cellules mésenchymateuses sans lipides. Les préadipocytes prolifèrent activement et après cessation de la prolifération, les cellules accumulent des triglycérides et expriment des marqueurs spécifiques des adipocytes. La différenciation des préadipocytes en adipocytes est caractérisée par une séquence d'événements dont les différentes étapes ont pu être étudiées à la suite de l'établissement de lignées cellulaires de préadipocytes ou de lignées cellulaires provenant d'animaux adultes (Grimaldi et al., 2001). Dans des conditions bien définies, les préadipocytes se différencient en adipocytes. L'initiation de la différenciation survient à confluence et est caractérisée par l'émergence de marqueurs précoces: enzymes du métabolisme des lipides comme la lipoprotéine lipase, ou des facteurs de transcription: *CAAT/enhancer binding proteins* (C/EBP) β et δ et le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) δ . Le facteur de détermination et différenciation adipocytaire (ADD-1) dont l'homologue humain est le *sterol regulatory element binding protein* (SREBP) est également exprimé. La seconde étape est une étape de prolifération qui correspond à l'expansion clonale des cellules impliquées dans la différenciation. La différenciation terminale des préadipocytes en adipocytes s'accompagne de l'émergence de marqueurs tardifs et de l'accumulation des triglycérides. Cette dernière étape correspond à l'activation de plusieurs gènes incluant ceux impliqués dans le métabolisme des triglycérides (GPDH), *l'adipocyte lipid binding protein* (ALBP), *la fatty acid translocase* (FAT), ou la lipase hormono-sensible, et des facteurs de transcriptions tels que C/EBP α et PPAR γ .

En fait, la situation est beaucoup plus complexe et les connaissances actuelles dans l'adipocyte permettent de regrouper les facteurs de transcription en trois familles.

1) La famille des C/EBP avec C/EBP β et δ qui interviennent précocement dans la mise en place de la différenciation. Elles sont down-régulées lors de la phase de différenciation terminale. Ces deux isoformes joueraient un rôle crucial dans la phase précoce de la différenciation en régulant les mitoses de l'expansion clonale et dans le contrôle de la différenciation terminale en induisant l'activité transcriptionnelle de C/EBP α . La troisième isoforme C/EBP α joue un rôle dans les stades plus tardifs en maintenant l'expression de PPAR γ à un haut niveau et le phénotype différencié de l'adipocyte (Fajas et al., 1998).

2) La famille des *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs). Les protéines SREBP-1a et 1c sont issues du même gène par épissage alternatif et régulent la transcription de gènes codant pour des enzymes et des protéines impliqués dans le métabolisme des acides gras. En revanche, SREBP-2 régule la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. Les SREBPs sont synthétisées comme des précurseurs liés à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et leur activité est régulée par une « *SREBP cleavage-activating protéin* » (SCAP) qui s'associe avec la partie C-terminale de SREBP sur la membrane du RE. Dans un milieu déplété en stérol, SCAP transporte les SREBPs du RE au Golgi où elles sont clivées et la partie NH₂ terminale active pénètre dans le noyau où elle active la transcription des gènes. L'expression de SREBP-1 augmente précocement lors de la différenciation de préadipocytes en adipocytes (Shimomura et al., 1997). Des études antérieures ont montré que SREBP-1 augmente l'expression de PPAR γ à travers une liaison avec un motif PPAR γ -consensus-E box (Fajas et al., 1999) ou en produisant un ligand endogène (Kim et al., 1998). Il a été rapporté récemment que les formes nucléaires de SREBP-1 et SREBP-2 augmentent lors de la différenciation adipocytaire (Inoue et al., 2001).

3) Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPARs) font partie de la famille des récepteurs nucléaires et sont des facteurs de transcription activés par des ligands. Trois isoformes ont été décrites. PPAR α qui est activé par les acides gras à longue chaîne (AGLC) insaturés, le leucotriène B₄ et les fibrates est peu très peu exprimé dans le tissu adipeux, suggérant un rôle limité de cet isoforme dans la différenciation adipocytaire. Le PPAR δ , marqueur précoce de la différenciation adipocytaire est détectable dans les préadipocytes en prolifération et est fortement exprimé durant la phase de prolifération post-confluence. Le PPAR δ est activé par les AGLC saturés et insaturés et le PGI₂ (Amri et al., 1995). Le PPAR γ , marqueur tardif de la différenciation adipocytaire, comporte deux isoformes qui sont issues du même gène par épissage alternatif: γ 1 et γ 2 qui diffèrent par les trente derniers acides aminés de la partie NH₂ terminale. PPAR γ 1 est toujours la forme prédominante dans les tissus humains où PPAR γ est exprimé, PPAR γ 2 représentant seulement 15% des PPAR γ dans le tissu adipeux sous-cutané. Les PPAR γ sont activés spécifiquement par les composés antidiabétiques de la classe des thiazolidinediones (TZD) et par 15d-PGJ₂ (*15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2*). Une fois activés, les PPARs s'hétérodimérisent avec les récepteurs de l'acide rétinoïque (RXR) pour activer l'expression de gènes impliqués dans la différenciation de l'adipocyte en induisant en particulier la LPL et la PEPCK. Outre son effet

adipogénique, il a été rapporté que PPAR γ exercerait un effet pro-apoptotique sur les adipocytes qui serait fonction de la taille cellulaire. PPAR γ activerait la différenciation des petits adipocytes et l'apoptose dans les grands adipocytes (Ukuno et al., 1998).

Des relations entre l'activation de ces facteurs de transcription et les hormones ont été mises en évidence. L'insuline régulerait la transcription des gènes médiée par SREBP-1c en stimulant l'activité du domaine NH₂-terminal par une phosphorylation impliquant la voie des MAP kinases (Kotzka et al., 1998). De même, elle stimule l'expression de PPAR γ 1 et 2 (Rieusset et al., 1999). Les hormones glucocorticoïdes sont importantes dans la différenciation des préadipocytes en adipocytes (Halvorsen et al., 2001) et dans le métabolisme de l'adipocyte. Le cortisol induit l'activité de la LPL dans les adipocytes permettant le stockage des triglycérides (TG). Cette action passe par un récepteur glucocorticoïde. Leur densité serait plus importante dans l'adipocyte viscéral que sous cutané.

De même, les acides gras et leurs métabolites sont des activateurs transcriptionnels de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme lipidique des adipocytes. Ces acides gras altèrent l'activité des facteurs de transcription nucléaire: PPAR γ et protéines SREBP-1 (Grimaldi, 1999; Grimaldi, 2001). Certains acides gras mono et polyinsaturés peuvent interagir directement avec les PPARs qui seraient des capteurs sensoriels des concentrations lipidiques et seraient la clé de voûte de la régulation de l'homéostasie lipidique et glucidique.

C.3.2.3 - Fonctions métaboliques des adipocytes

L'activité métabolique de l'adipocyte comporte 3 étapes:

- synthèse de lipides (lipogénèse),
- stockage Le tissu adipeux blanc renferme environ 95% des triglycérides stockés dans l'organisme; il représente, de ce fait, une des plus importantes réserves énergétiques de l'organisme. Le stockage des triglycérides est effectif lorsque la balance énergétique est positive.
- libération de ces lipides (lipolyse). Lorsque la balance énergétique est négative, on constate une augmentation de la lipolyse du tissu adipeux, l'organisme faisant appel à la réserve énergétique lorsque les glucides sont épuisés (jeûne, efforts physiques, lutte contre le froid, etc.), ou inutilisables (diabète grave).

** Lipogenèse*

La lipogenèse adipocytaire s'effectue à partir des acides gras et du glucose. Les acides gras proviennent des chylomicrons et des VLDL hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL). Les acides gras sont activés et les dérivés Coenzyme A (CoA) sont transférés au glycérol. Le glycérol-3-phosphate, un intermédiaire important dans cette biosynthèse, provient de la réduction du phospho-dihydroxy-acétone phosphate qui est formé à partir du glucose par la voie de la glycolyse. Comme dans le muscle, la pénétration du glucose dans l'adipocyte est facilitée par les transporteurs GLUT1 (transport basal) et GLUT4 après stimulation par l'insuline et translocation des GLUT4 de vésicules intracytoplasmiques vers la membrane plasmique. L'insuline stimule la lipogenèse en favorisant la synthèse du glycérol-3-phosphate.

** Lipolyse*

La lipolyse correspond à une hydrolyse des triglycérides en acides gras et glycérol. Dans le tissu adipeux, les triglycérides sont hydrolysés et resynthétisés en permanence. La relâche du premier acide gras, est catalysée par la lipase hormono-sensible (LHS). Le glycérol dérivé de l'hydrolyse est exporté vers le foie. Les acides gras formés peuvent être réestérifiés si le glycérol-3-phosphate est abondant. Sinon, ils sont relâchés dans la circulation. Les acides gras non estérifiés que les adipocytes libèrent ainsi dans le sang sont utilisables par les autres cellules de l'organisme à des fins énergétiques.

Chez l'homme, l'insuline et les catécholamines (adrénaline, noradrénaline secrétées par les surrénales) sont les régulateurs hormonaux majeurs de la lipolyse. L'insuline inhibe et les catécholamines stimulent la lipolyse. Des récepteurs adrénergiques sont impliqués dans la régulation de la lipolyse. Les récepteurs β -adrénergiques stimulateurs de la lipolyse comportent trois isoformes. Les récepteurs β_1 et β_2 sont exprimés dans la plupart des tissus de l'organisme alors que le récepteur β_3 est trouvé essentiellement dans les adipocytes (Collins et Surwit, 2001). Le récepteur α_2 -adrénergique est inhibiteur de la lipolyse. Les adipocytes humaines expriment essentiellement les récepteurs α_2 et peu de β_3 alors que c'est l'inverse dans le cas des adipocytes de rongeurs (Valet et Saulnier-Blache, 1999; Kobayashi et al., 2000).

Le glucagon, hormone pancréatique sécrétée par les cellules α du pancréas quand la glycémie diminue a été considéré comme un autre système hormonal de contrôle de la lipolyse. L'interaction *in vitro* de glucagon avec des adipocytes de rat entraîne une augmentation du glycérol relâché (Slavin et al., 1994). Toutefois, les résultats *in vivo* chez l'homme ne traduisent pas un effet du glucagon sur la lipolyse dans le tissu adipeux sous-cutané (Gravholt et al., 2001 ; Bertin et al., 2001).

Bien que la lipolyse adipocytaire soit considérée souvent comme une voie métabolique simple et bien connue, il n'en reste pas moins que les mécanismes moléculaires qui la contrôlent ne sont pas complètement élucidés. La translocation de la LHS vers la gouttelette lipidique, étape limitante de la lipolyse, semble être une étape essentielle de l'activation lipolytique. Le rôle des périlipines, protéines présentes à la surfaces des gouttelettes lipidiques, n'est pas complètement élucidé. Par ailleurs, des souris présentant une déficience de la LHS ont un certain niveau de lipolyse adipocytaire, suggérant l'existence d'une autre lipase de triglycérides. Enfin, un nouveau système lipolytique a été identifié dans les adipocytes humains. Les peptides natriurétiques stimulent la lipolyse à travers une voie dépendant des GMPc (Langin et al., 2000).

C.3.2.4 - L'adipocyte, cellule sécrétrice endocrine, autocrine et paracrine

Le tissu adipeux a été longtemps considéré comme un organe passif permettant le stockage des réserves énergétiques sous forme de triglycérides et la mobilisation de ces réserves lorsque la balance énergétique de l'organisme est négative. Depuis une dizaine d'années, de nombreuses observations ont apporté la preuve de la synthèse et la sécrétion de molécules endocrines, paracrines et autocrines impliquées dans la régulation de la balance énergétique mais également dans d'autres fonctions (Kahn et Fliers, 2000; Fruhbeck et al., 2001).

L'adipocyte blanc exprime de nombreuses protéines et hormones et quelques unes sont rassemblées sur le tableau 2.

Tableau 2: Les protéines et hormones secrétées par l'adipocyte.

Molécule	Fonctions/Effets	Références
Leptine	Régulation de l'appétit	Ramsay, 2001
TNF- α	Interfère avec le signal de l'insuline	Hube et Hauner, 1999
IL-6	Impliquée dans la défense immunitaire et le métabolisme lipidique et glucidique	Path et al., 2001
LPL	Hydrolyse des lipoprotéines	Roh et al., 2001
ApoE	Ligand des récepteurs des lipoprotéines	Zechner et al., 1991
CETP	Echanges de CE, TG et PL entre lipoprotéines Incorporation du HDL-CE dans adipocytes	Benoist et al., 1997 ; Radeau et al., 1998
PLTP	Echanges de PL, remodelage des HDL	Lagrost et al., 1998
Adipsine-ASP (<i>acylation stimulating protein</i>)	Régulation de la synthèse des TG dans le tissu adipeux	Murray et al., 1999
Adiponectine/AdipoQ/apM1/Acrp 30	Limite l'élévation postprandiale des Ag plasmatiques, inhibe la néoglucogenèse du foie	Berg et al., 2001
Résistine	Inhiberait l'action de l'insuline ?	Steppan et al., 2001
Adiponutrine	Transport de protéines ?	Baulande et al., 2001
AP2	Impliquée dans le trafic intracellulaire et le ciblage des acides gras	Wootan et al., 1993
Adipophiline	Marqueur spécifique de l'accumulation lipidique	Brown, 2001
PAI-1	Inhibiteur de la fibrinolyse	Birgel et al., 2000
Facteur tissulaire	Initiateur de la cascade de la coagulation	Fried et Russel, 1998
Angiotensinogène	Régulation de la pression sanguine	Jones et al., 1997
PGI2 et PGF2 α	Régule l'inflammation et la coagulation sanguine	Mohamed-Ali et al., 1998
TGF- β	Régule la prolifération, la différenciation l'apoptose	Samad et al., 1997
IGF-1	Stimule la prolifération cellulaire, médiateur des effets de l'hormone de croissance	Schmidt et al., 1990
MIF	Impliqué dans des processus proinflammatoire et l'immunorégulation	Sakaue et al., 1999
RBP (<i>retinol binding protein</i>)	Protéine de liaison des rétinoïdes	Okuno et al., 1995

Parmi les protéines les plus impliquées dans les activités métaboliques de l'adipocyte mais également dans les activités du muscle et du foie, on trouve :

- **La leptine** (Ceddia et al., 2002). L'adipocyte sécrète une hormone, la leptine, produit du gène *ob*, qui agit comme un lipostat au niveau de l'hypothalamus. Ce gène, exprimé dans le tissu adipeux, code pour une protéine synthétisée par les adipocytes et exportée dans le sang pour agir au niveau de récepteurs (codés par le gène *db*) situés dans certains neurones de l'hypothalamus. Dans l'espèce humaine, le gène homologue du gène *ob* de la souris a été identifié et cloné. La leptine se comporte comme une hormone de la satiété, agissant en régulant l'appétit en fonction de la masse de tissu adipeux, par un rétro-contrôle hypothalamique. Au niveau de cette boucle régulatrice de la prise alimentaire, la leptine active la voie anorexigène (qui coupe la faim) passant par la pro-opio-mélanocortine, l' α -MSH (*α -melanocyte-stimulating hormone*) et son récepteur hypothalamique MC4-R (*melanocortin-5 receptor*), et exerce un effet inhibiteur sur les circuits orexigènes (qui ouvrent l'appétit), principalement représentés par le neuropeptide Y. La leptine inhibe également la sécrétion d'insuline en exerçant son action sur les récepteurs de la leptine situés dans la membrane plasmique des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. La leptine augmente la lipolyse adipocytaire (Martinez et al., 2000). Elle stimule l'oxydation des acides gras et l'hydrolyse des triglycérides dans le muscle (Lau et al., 2001 ; Steinberg et al., 2002), en activant probablement la phosphorylation de la lipase hormono-sensible. Elle diminue également l'expression des protéines de transport des acides gras FAT et FAT/CD36 (Steinberg et al., 2002).

- **Le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)**. L'expression du TNF- α est effective dans les cellules précurseurs des adipocytes et la quantité d'ARNm augmente seulement modérément avec la différenciation. Les composés qui sont utilisés pour l'induction de la différenciation tel que l'inhibiteur de la phosphodiesterase (IBMX) et les thiazolidinediones sont des inhibiteurs de l'expression du TNF- α (Hube et al., 1999). Les triglycérides et les acides gras libres jouent un rôle important comme inducteurs physiologiques du TNF- α . Le TNF- α est une cytokine multifonctionnelle exprimé par les cellules immunes (macrophages) mais aussi par l'adipocyte (Dusserre et al., 2000; Hube et Hauner, 2000) et le muscle squelettique (Saghizadeh et al., 1996). Ses effets biologiques sont multiples (Aggarwal et Natarajan, 1996). En plus de son action immunologique, de nombreux travaux ont rapporté le rôle important de

dans la croissance et le métabolisme des adipocytes (Petruschke et Hauner, 1993; Kawakami et al., 1987, Fried et Zechner, 1989). Le TNF- α inhibe l'expression des deux régulateurs majeurs de la différenciation adipocytaire, C/EBP α et PPAR γ 2. (Stephens et Pekala, 1992; Xing et al., 1997). Cette suppression peut résulter dans la régulation négative de la LPL, l'aP2, la fatty acid synthétase, la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH) et le GLUT4. Il induit également la dédifférenciation des adipocytes (Petruschke et Hauner, 1993). Enfin il provoque l'apoptose des adipocytes (Prins et al., 1997).

- **L'IL-6 (Interleukine-6)**, une cytokine multifonctionnelle produite par de nombreux types cellulaires. Elle est sécrétée par les macrophages et les lymphocytes activés et intervient dans le système inflammatoire. Cependant, le tissu adipeux produit également de l'IL-6 *in vivo* (Mohamed-Ali et al., 1997). La quantité d'IL-6 produite par le tissu adipeux peut être identique ou plus importante que celle rapportée pour d'autres cellules et il faut noter que l'on peut observer des différences en fonction de l'origine du tissu adipeux (sous-cutané, viscéral) en termes de contribution quantitative au pool d'IL-6 sérique et/ou de participation qualitative dans le métabolisme lipidique. L'expression de l'IL-6 est modulée par le TNF- α , les glucocorticoïdes, les catécholamines (Fruhbeck et al., 2001). L'IL-6 diminue l'activité LPL du tissu adipeux mais il est vraisemblable qu'elle exerce d'autres actions encore non élucidées tant ses effets sur le tissu adipeux sont importants (Fruhbeck et al., 2001).

- **L' Acrp 30 (*adipocyte complement-related protein*)** ou encore **adiponectine**, adipoQ, « *adipose most abundant gene transcript 1 (ApM1)* », est une protéine de 30 kD qui montre des similitudes avec le facteur du complément C1q. Elle est exclusivement exprimée dans les adipocytes différenciés. Une fois sécrétée par l'adipocyte, l'adiponectine pourrait augmenter le transport des acides gras et l'oxydation dans le muscle, réduisant ainsi les niveaux de lipides intramyocellulaires. Elle agirait en tant que prohormone et le fragment actif (Acrp 30) obtenu après clivage protéolytique stimulerait l'oxydation des acides gras par les muscles (Fruebis et al., 2001). L'adiponectine peut également augmenter la sensibilité à l'insuline de l'hépatocyte, soit à travers une action directe, ou indirectement en abaissant les lipides circulants en raison de son action sur le muscle (Saltiel, 2001). Elle inhibe l'expression des enzymes de la gluconéogenèse dans le foie (Combs et al., 2001).

- **L'adipsine** est une sérine protéase sécrétée par les adipocytes. Elle est identique au complément D et les adipocytes synthétisent et sécrètent également les facteurs B et C3 du complément. Ainsi, l'adipocyte sécrète les trois protéines nécessaires pour la formation d'une protéine effectrice : l'**ASP (acylation-stimulating protein)**. C'est une protéine de 14-kDa qui est générée par l'interaction de l'adipsine et du facteur B avec le facteur C3. Bien qu'elle est exprimée dans les fibroblastes et les préadipocytes, elle est surtout exprimée dans les adipocytes différenciés (Maslovska et al., 1997). Elle stimule la production de triglycérides et la translocation des GLUT à la surface cellulaire (Germinario et al., 1993). **La voie adipsine-ASP** agit comme un signal paracrine pour augmenter la synthèse des triglycérides dans les adipocytes, une action qui résulte d'une clairance post prandiale plus rapide (Havel, 2002). Aucune action directe sur le foie et le muscle ne semble avoir été mise en évidence pour l'instant.

D'autres protéines ont été mises en évidence mais leur rôle n'est pas bien défini.

- **La résistine, également appelée Fizz3**, une protéine riche en cystéine sécrétée par les adipocytes, qui a été mise en évidence récemment (Steppan et al, 2001). Chez les rongeurs, elle inhiberait l'action de l'insuline (Steppan et al., 2001). Toutefois, son action n'a pas été confirmée totalement chez l'homme (Savage et al., 2001; Nagaev et Smith, 2001). Par conséquent, des études complémentaires sur cette protéine sont nécessaires pour clarifier son rôle sur le métabolisme humain.

- **L'adiponutrine**, une protéine identifiée dans les lignées cellulaires et le tissu adipeux de rongeurs. Son expression qui est spécifique du tissu adipeux est augmentée au cours de la différenciation et sous étroite régulation nutritionnelle (Baulande et al., 2001). Le niveau d'ARNm est très faible au cours du jeûne et augmente de façon très importante lorsque les animaux ont un régime riche en carbohydrates.

Des autres protéines sont synthétisées par l'adipocyte et non sécrétées.

- **L'aP2 (Adipose Fatty-Acid Binding Protein)** est exprimée durant la différenciation adipocytaire et représente près de 6% des protéines cytosoliques de l'adipocyte mature. Elle est supposée transférer les acides gras du cytosol vers les membranes des organelles intracellulaires impliquées dans la synthèse des triglycérides et l'oxydation des acides gras et jouerait un rôle dans la lipolyse (Hotamisligil et al., 1996).

- **L'adipophiline (ou ADRP : *adipocyte differentiation-related protein*)** est une protéine qui se trouve sur les gouttelettes lipidiques des adipocytes mais également dans de nombreux types cellulaires.

C.4 - RELATIONS ENTRE LES CELLULES SENSIBLES A L'INSULINE

Les relations entre les tissus sensibles à l'insuline sont extrêmement complexes. Elles sont liées essentiellement aux flux d'acides gras, au rôle de l'insuline et à l'influence de certaines protéines sécrétées par les adipocytes ce qui fait du tissu adipeux un organisme central dans les interactions entre les différents tissus sensibles à l'insuline.

Les interactions majeures entre le tissu adipeux, le muscle et le foie sont rassemblées sur la Figure 6.

Les acides gras transportés dans le plasma sont essentiellement sous forme de triglycérides (TG) dans les lipoprotéines (chylomicrons produits par l'entérocyte en période post prandiale) et les VLDL synthétisés par le foie. La LPL hydrolyse les TG et permet l'utilisation des AG par les différents tissus.

Le tissu adipeux est le principal lieu de stockage des AG qui sont estérifiés en TG. Les acides gras libérés par le tissu adipeux par la lipolyse adipocytaire sont dirigés vers le muscle pour être oxydés ou vers le foie pour être transformés en VLDL.

L'insuline a de multiples actions qui modifient les flux d'acides gras entre les différents organes sensibles à l'insuline.

Elle favorise le stockage des TG dans le tissu adipeux en augmentant la synthèse de la lipoprotéine lipase et en ayant un effet anti-lipolytique en inhibant la lipase hormono-sensible .

Dans le foie, elle favorise la lipogénèse de *novo* à partir des glucides et freine la synthèse hépatique de VLDL et la gluconéogénèse. Un certain nombre de travaux sont en faveur d'un rôle indirect de l'insuline sur le foie et sur la gluconéogénèse en particulier, la régulation étant

assurée par la relâche des acides gras du tissu adipeux, confirmant ainsi le rôle important de ce tissu (Bergman, 2000).

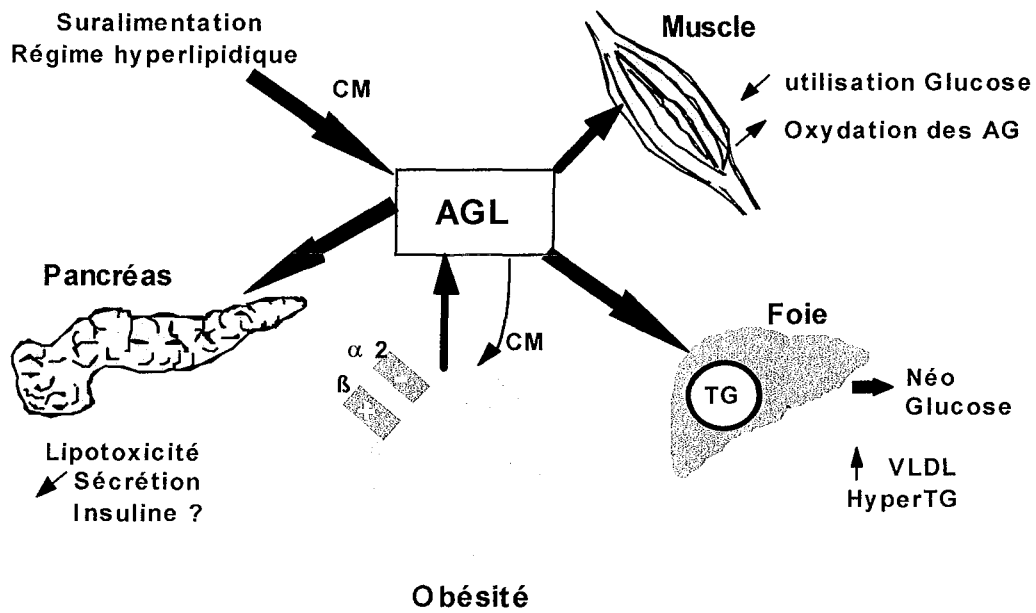


Figure 6 : Effet de l'obésité sur les flux d'acides gras impliqués dans la physiopathologie de l'insulino-résistance (Ziegler et al., 2001a).

D – INSULINE ET EXPRESSION DES GENES

L'insuline régule l'expression de plus de 150 gènes, suggérant que c'est la fonction majeure de l'hormone. Au moins 8 éléments consensus de réponse à l'insuline (IRSs) ont été définis à travers lesquels l'insuline peut réguler la transcription des gènes. Ces éléments incluent : l'élément de réponse du sérum, le motif protéine 1 activatrice (AP-1), le motif Ets, le motif E-box et le motif facteur de transcription thyroïdien (TF-2). L'ensemble de ces IRSs (*Insulin response sequence*) entraîne un effet stimuloire de l'insuline sur la transcription des gènes. Parmi les gènes qui sont stimulés par l'insuline, on peut citer l'isoforme SREBP-1c (Shimomura et al., 2000 ; Deng et al., 2002), la leptine (Pratley et al., 2000), le TNF- α (Iida et al., 2001), le PAI-1 (Samad et al., 2000), l'apoA-I (Murao et al., 1998). En revanche, un élément avec la séquence consensus T(G/A)TTT(T/G)(G/T), défini comme étant le motif phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) provoque un effet inhibiteur de l'insuline sur la transcription de gène codant pour la PEPCK, l'« *insulin-like-growth-factor-binding protein* » 1(IGFBP-1), la tyrosine aminotransférase, et la sous unité catalytique de la glucose-6-phosphatase (G6Pase) (O'Brien et al., 2001). L'insuline réprime également l'expression de IRS-2 (Zhang et al., 2001).

II-L'OBESITE

A - INTRODUCTION

L'obésité qui correspond à un excès de tissu adipeux est une maladie complexe, d'origine génétique parfois, mais où l'environnement, la culture et les habitudes familiales jouent un rôle déterminant.

Chez l'adulte, la définition habituelle de l'obésité s'appuie sur ce que l'on appelle l'indice de masse corporelle ou indice de Quételet qui correspond au poids (en kg) divisé par la taille (en m²). Selon la classification OMS acceptée au niveau international en 1998, le surpoids est défini par un IMC > 25,0 kg/m² et l'obésité par un IMC > 30,0 kg/m² avec une graduation en 3 classes.

On parle d'obésité chez l'enfant, lorsque la masse grasse dépasse de 20% le poids idéal pour un garçon et 25% pour une fille. Son poids idéal correspond au poids divisé par sa taille au carré, par rapport à l'âge et en fonction de la moyenne de la population

Tableau 3: Classification des adultes selon l'indice de masse corporelle (OMS, 1998).

Classification	IMC (kg/m ²)
Limites normales	18,5-24,9
Surpoids	>25,0
Pré-obésité	25,0-29,9
Obésité classe 1	30,0-34,9
Obésité classe 2	35,0-39,9
Obésité classe 3	>40,0

On parle d'obésité morbide pour un indice supérieur à 40.

Mais à lui seul, le poids n'est pas un facteur pronostic suffisant. Des études (Matsuzawa et al., 1994; Kelly, 2000), mettent en évidence un lien direct entre l'excès de graisse viscérale abdominale et le diabète, l'hypertension artérielle et les triglycérides trop élevés dans le sang. La notion de tour de taille est donc déterminante pour évaluer le risque cardiovasculaire lié au poids. Ce risque est fortement accru lorsque le tour de taille est supérieur à 100 cm pour les hommes et 95 cm pour les femmes.

B - ORIGINES DE L'OBESITE

Chez l'homme, l'obésité résulte de la combinaison de plusieurs facteurs : génétiques, environnementaux et sociaux (psychologiques, culturels), ces derniers facteurs pouvant renforcer, diluer, voire supprimer la "donne" génétique.

B.1 – LES FACTEURS GENETIQUES

De nombreux travaux sont en faveur d'un rôle important des facteurs génétiques (Bouchard et Perusse, 1993; Bouchard et Perusse, 1996). Les travaux de Bouchard ont montré que l'héritabilité génétique intervenait pour 5 à 40 % dans le développement de la masse grasse. On admet actuellement que la prédisposition d'un individu à être obèse est la résultante de l'action de quelques gènes "majeurs", chacun de ces gènes pouvant à lui seul entraîner l'apparition d'une obésité, ainsi que de nombreux gènes "faibles" agissant de manière cumulative.

Dans le cadre de l'obésité monogénique, la description des mutations les plus fréquentes d'un gène lié à l'obésité humaine représente environ 4% des obésités massives.

Le produit du **gène ob**, la leptine, régule la prise alimentaire et la balance énergétique (Zhang et al., 1994 ; Friedman, 1998 ; Rayner et al., 2001). Les souris possédant une mutation du gène *ob*, caractérisées par une déficience en leptine (Giese et al., 1996) ou du gène du récepteur de la leptine (*db*) présentent une hyperphagie et une obésité sévère (Forbes et al., 2001). Chez l'homme, les mutations au niveau du gène *OB*, analogue de *ob*, sont très rares,

certains gènes voisins du gène *OB* pouvant également contribuer à l'obésité (Carlsson et al., 1997; Reed et al., 1996).

En revanche, l'obésité chez l'homme est associée généralement à des niveaux élevés de leptine circulante. Les mécanismes de ce phénomène de résistance à la leptine ne sont pas élucidés pour l'instant (Friedman et al., 1998).

Le gène Agouti code pour un facteur paracrine de 131 acides aminés qui est exprimé normalement dans les follicules des poils et régule la pigmentation en inhibant la liaison de l'hormone stimulant le mélanocyte- α au récepteur de type 1 pour la mélanocortine (Kim et Moussa, 2000). Des mutations dominantes de ce gène se traduisent par une expression ubiquitaire de la protéine dans tous les tissus, et chez les mutants Ay et Avy, un syndrome d'obésité associé à une pigmentation jaune (Moussa et Claycombe, 1999).

Une protéine en relation avec la protéine agouti, (AGRP) est constituée de 132 acides aminés et est normalement exprimée dans l'hypothalamus (Ollemann et al., 1997). Agouti et AGRP agissent comme des antagonistes du récepteur hypothalamique MC4-R, impliqué dans la régulation de la prise alimentaire. L'expression ubiquitaire de AGRP entraîne l'obésité, mais sans altérer la pigmentation (Ollemann et al., 1997).

L'homologue humain du produit du gène agouti est la protéine de signalisation agouti (ASIP). A l'inverse de la souris agouti, l'agouti humaine est exprimée dans le tissu adipeux (Kwon et al., 1994), suggérant un rôle possible de la protéine dans la régulation du métabolisme de l'adipocyte. Par ailleurs, un polymorphisme (-38C \rightarrow T) a été identifié dans le promoteur du gène AGPR humain et le génotype C/C entraînerait une activité du promoteur significativement plus élevée et une affinité également plus élevée pour les facteurs de transcription. Ce polymorphisme d'AGPR et le génotype C/C découverts chez des Africains était significativement associé à l'apparition de l'obésité (Mayfield et al., 2001). Enfin, quatre mutations au niveau du gène du récepteur MC4-R (Val50Met, Ser58Cys, Ile102Ser et Ile170Val) ont été identifiées chez des enfants et sont associées à une obésité sévère. Par contre, des mutations au niveau des gènes AGRP et MSH- α ne semblent pas en cause (Dubern et al., 2001).

Le gène du récepteur β -3 adrénergique joue un rôle dans le contrôle de la balance énergétique chez l'homme (Emorine et al., 1994). Une mutation située dans le premier domaine intracellulaire (Trp64Arg) du récepteur a été identifiée. Elle pourrait être impliquée

dans le développement précoce du diabète non insulino-dépendant chez les finlandais et les indiens PIMA (Widen et al, 1995; Walston et al, 1995). En revanche, dans la population japonaise, le génotype Arg/Arg est associé à l'obésité et non à la mutation Trp64Arg (Oizumi et al., 2001). L'étude des polymorphismes des gènes des récepteurs α -2A, β -2 et β -3 adrénergiques a montré que seul le génotype du récepteur β -2 adrénergique (Gln27Gln) est associé à un gain de poids plus important que les sujets ayant le génotype Glu27Glu/Gln27Glu (Ukkola et al., 2001; Oppert et al., 1995).

Il existe également des polymorphismes au niveau du gène du PPAR γ : un polymorphisme Pro12Ala dans l'exon B et un polymorphisme silencieux CAC478CAT dans l'exon 6. Il a été montré chez les femmes obèse que l'existence simultanée des allèles Ala12Ala et CAT478CAT dans le gène du PPAR γ était associé à une obésité sévère (Valve et al., 1999).

D'autres polymorphismes génétiques sont probablement associés au développement de la masse grasse ou à sa répartition: lipoprotéine lipase (Jemaa et al., 1995), la Na⁺K⁺-ATPase (Deriaz et al., 1994).

Selon l'hypothèse polygénique de l'obésité, les interactions gènes-gènes jouent un rôle important dans la susceptibilité à la maladie. Le but de l'étude GénOLor étant de déterminer les interactions entre des polymorphismes génétiques fréquents et les déterminants environnementaux de l'obésité commune en Lorraine, les polymorphismes de plusieurs gènes ont été déterminés: récepteurs β -2 et β -3 adrénergiques, récepteur dopaminergique D2, protéines de choc thermique HSP70-2 et HSP 70-Hom, TNF- α , lipoprotéine lipase (LPL-H et LPL-P). Chaque variant génétique isolément a peu d'influence sur l'IMC ou la masse grasse. La présence de deux variants génétiques est associée à une augmentation (TNF- α /HSP70-Hom) ou à une diminution (β 2-AR/DRD2 et DRD2/HSP70-2) de la masse grasse. Les sujets qui ont la combinaison défavorable sans avoir la protectrice ont une masse grasse plus importante que les sujets qui ont la combinaison inverse, suggérant que ces combinaisons de 4 variants génétiques fréquents sont de bons marqueurs de risque pour l'obésité commune (Ziegler et al., 2001b).

B.2 - LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Associée au manque d'activité physique (*réduction de la dépense énergétique*), la consommation excessive de lipides (*excès de la prise énergétique*) serait responsable de l'épidémie mondiale d'obésité chez l'adulte. De plus, dans les pays occidentaux, la *destructuration des comportements alimentaires* pourrait aggraver ces effets.

Réduction de la dépense énergétique: Les causes de l'augmentation de l'obésité résideraient dans la sédentarisation croissante des modes de vie des sociétés occidentales, à savoir le triptyque automatiser, motoriser et téléviser. Une étude anglaise estime que la dépense énergétique a en moyenne diminué de 800 kcal/jour sur les vingt dernières années, tandis que la prise énergétique n'a que très peu baissé (James, 1995).

Excès de la prise énergétique: L'excès de graisses résulte d'un déséquilibre entre la prise de calories alimentaires et leur utilisation. Si la prise d'aliments excède la dépense énergétique, un surplus d'énergie sera conservé sous forme de graisses corporelles. Il est incontestable que de nombreuses obésités sont favorisées par une prise alimentaire excessive. La plupart des études épidémiologiques portant sur des "photographies" de population à un moment donné ont trouvé une corrélation entre la part lipidique dans l'apport énergétique et l'obésité (Lissner et Heitmann, 1995; Chapelot et al., 1998). En effet, la part lipidique de la ration alimentaire a été profondément modifiée. A un apport énergétique essentiellement composé de céréales et de légumineuses, s'est substitué un apport majoritairement à base de graisse animale dotée d'une forte densité énergétique.

Destructuration des comportements alimentaires : Des travaux récents laissent entendre que la répartition des prises alimentaires au cours de la journée aurait son importance, et qu'un décalage dans le temps pourrait donner lieu à une obésité (Morel, 1996). Les études de comportement alimentaire sur les obèses montrent qu'ils ont tendance à manger davantage le soir qu'en première partie de journée. Or les nutriments sont stockés sous forme de graisses dans les adipocytes en fonction de l'activité physique et de l'état physiologique et c'est l'insuline, hormone de régulation et de stockage sécrétée après les repas, qui permet la mise en réserve dans les cellules du tissu adipeux. Le soir, l'activité est moindre et les hormones de "contre-régulation" (cortisol, adrénaline, etc.) sont basses. Or, ce sont elles qui favorisent la

dégradation des nutriments et la lipolyse adipocytaire pour répondre aux besoins en énergie de l'organisme (activité physique, régime). En étudiant les personnes suivant le jeun du ramadhan - et qui ne s'alimentent donc que la nuit - mais prennent cependant du poids, (El Ati et al., 1995) ont suggéré qu'il ne s'agissait pas d'un problème alimentaire mais plutôt d'une diminution du brûlage des graisses.

B.3 - FACTEURS SOCIAUX

D'autres facteurs sont accusés d'accroître de manière "invisible" la prise alimentaire. C'est par exemple le cas de l'augmentation de la taille du conditionnement commercial des aliments, très présent aux Etats-Unis.

Phénomène préoccupant, l'obésité infantile monte en flèche. Selon une enquête SOFRES/INSERM/ Roche, la prévalence de l'obésité chez l'enfant aurait augmenté de 50 % en France entre 1980 et 1990. Une étude sur des enfants de 10 mois à 8 ans a montré que 10% d'entre eux étaient obèses au lieu des 3% prévisibles. Le nombre des "petits" gros a augmenté de 17% alors que l'obésité infantine a augmenté au Japon de 53%, en Grande Bretagne de 65% pour certaines tranches d'âge, aux Etats-Unis de 60 %. Une étude réalisée en Italie sur des enfants de 6 à 9 ans, a montré une augmentation du nombre d'obèse; la prévalence de l'obésité infantile passe de 6,1 à 13,6% sur la période 1991-1998 (Boldori et al., 2000). En plus des effets invoqués: sédentarité et déstructuration des comportements alimentaires, il y a une préférence naturelle des enfants pour les aliments riches en énergie qui contribuent ainsi à une prise de poids excessive (Birch, 1998).

C- EVOLUTION DU TISSU ADIPEUX ET OBESITE

Chez l'homme, l'obésité modérée est la conséquence d'une augmentation de la taille des adipocytes due à une augmentation de l'accumulation des triglycérides (hypertrophie). L'obésité sévère est caractérisée par une augmentation supplémentaire du nombre des

adipocytes matures (hyperplasie) ainsi que d'une variation de la distribution du tissu adipeux dans l'organisme.

C.1 – OBESITE, HYPERTROPHIE ET HYPERPLASIE DES ADIPOCYTES.

La régulation de la taille et du nombre des adipocytes est mal connue *in vivo*. L'événement à l'origine de l'expansion du tissu adipeux est habituellement une augmentation de la taille des adipocytes suivie d'une augmentation du nombre des adipocytes (Vasselli et al., 1992). Des études chez le rat Zucker obèse laissent à penser que les adipocytes de grande taille secréteraient des facteurs de croissance qui permettraient ensuite le recrutement de préadipocytes, induiraient la différenciation et augmenteraient par conséquent le nombre des adipocytes (Marques et al., 1998). En revanche, des souris transgéniques surexprimant le transporteur de glucose GLUT4 représentent un modèle animal où l'augmentation de la masse grasse est due à la seule hyperplasie du tissu adipeux (Shepherd et al., 1993).

C.1.1- Origine de l'hypertrophie adipocytaire

L'hypertrophie de l'adipocyte est la conséquence d'un déséquilibre du bilan énergétique mais il existe également une régulation génique.

Des souris hétérozygotes pour le PPAR γ (+/-) ont des adipocytes de taille réduite et leur prise de poids est moindre sous un régime hyperlipidémique que les souris PPAR γ (++) (Kubota et al., 1999). Chez l'homme, la mutation Pro12Ala du PPAR γ qui est associée à une baisse de son activité semble être un facteur qui protège de l'obésité (Kadowaki, 2000). Il existe également une régulation de la taille des adipocytes qui est liée au sexe. Les femmes ont des adipocytes de taille plus importante que les hommes (Couillard et al., 2000).

C.1.2 - Origine de l'hyperplasie adipocytaire

Des études *in vivo* ont prouvé les effets d'un régime riche en graisses sur le développement de l'obésité par l'apparition de nouveaux adipocytes due à la prolifération et à la différenciation de préadipocytes « dormants ». Les acides gras saturés et insaturés à longues chaînes (AGLC)

exercent une action adipogénique en augmentant à la fois l'expansion clonale des mitoses et l'expression de gènes spécifiques des adipocytes (Amri et al., 1994). Cette action des AGLC semble être restreinte à une fenêtre temporelle étroite correspondant à un état de préadipocyte, car le traitement de cellules en différenciation terminale est sans effet. Les PPAR seraient les médiateurs nucléaires de l'action des acides gras. PPAR δ exercerait une action pro-proliférative sur les préadiocytes alors que PPAR γ a une action antimitotique (Grimaldi et al., 2001).

L'hypertrophie adipocytaire précédant en général l'hyperplasie, il a été suggéré que les adipocytes de grande taille sécrèteraient des facteurs de croissance permettant le recrutement des préadipocytes. La présence de facteurs de croissance dans des milieux conditionnés à partir de certains dépôts (inguinal et rétropéritonéal) a été effectivement rapportée dans le cas du rat Zucker obèse. Une corrélation positive a été montrée entre le pourcentage de gros adipocytes et l'activité proliférative de milieux de culture conditionnés sur des préadipocytes (Marques et al., 1998).

En revanche, les résultats d'un certain nombre d'études expérimentales et cliniques suggèrent que le TNF- α peut agir comme un important régulateur auto/paracrine qui sert à limiter l'expansion du tissu adipeux (Hube et Hauner, 1999). Le nombre d' adipocytes serait régulé en partie, par une voie de signalisation de l'apoptose qui impliquerait le TNF- α , l'insuline et la caspase 3 (Qian et al., 2001). De plus, l'effet apoptotique du TNF- α a également été démontré dans le cas des préadipocytes (Prins et al., 1997 ; Prins et al., 1998).

C.2 – OBESITE ET REPARTITION DU TISSU ADIPEUX

C.2.1 - Répartition du tissu adipeux

La répartition du tissu adipeux est soumise à l'influence des hormones stéroïdes mais les mécanismes mis en jeu semblent très complexes et ne sont pas encore complètement élucidés. Plusieurs études ont montré que le tissu adipeux viscéral représentait environ 20 % de la masse totale du tissu adipeux chez l'homme alors qu'il ne représente que 6 % chez la femme

(Ross et al., 1994) ce qui suggère une influence importante hormonale sur la répartition du tissu adipeux. Le rôle des stéroïdes sexuels dépend fortement de l'environnement hormonal de l'individu. Ainsi, l'administration de testostérone chez l'homme hypogonadique induit une réduction de la graisse viscérale tandis qu'elle favorise son accumulation chez la femme (Montague et O'Rahilly, 2000).

Il est très vraisemblable que des déterminants génétiques sont impliqués dans la régulation de la répartition du tissu adipeux. Ainsi une étude de ségrégation familiale québécoise, portant sur les individus de 100 familles chez qui la graisse viscérale a été mesurée par tomodynamométrie, suggère que 51 % de la variance de la quantité de tissu adipeux viscéral serait liée à un gène majeur et que des effets polygéniques contribueraient pour 21 % de la variance (Bouchard et Perusse, 1996). Ces résultats sont confirmés par une étude réalisée sur des paires de jumeaux qui suggère que 75 % de la variance de l'augmentation de tissu adipeux viscéral sous régime hypercalorique serait liée à une origine génétique tandis que 25 % de la variance serait liée à l'environnement (Bouchard et Perusse, 1993). L'hérédité semble donc jouer un rôle majeur dans la détermination de la répartition du tissu adipeux chez l'homme, plus important que dans la détermination de la masse adipeuse totale qui est en partie aussi génétiquement déterminée.

C.2.2 - Obésité, tissu adipeux sous cutané et viscéral.

Des facteurs physiologiques sont associées à l'augmentation de la masse adipeuse viscérale: le sexe, l'âge et la ménopause (Tchernof et al., 2000). Cette augmentation peut résulter d'un dysfonctionnement des glucocorticoïdes. L'homme présentant une accumulation préférentielle de graisse au niveau du tronc et de la région abdominale et la femme une plus grande quantité de tissu adipeux au niveau des membres inférieurs et de la région glutéo-fémorale, l'augmentation de la masse grasse lors de la prise de poids est associée à une plus grande accumulation de tissu adipeux viscéral chez l'homme que chez la femme (Lemieux et al., 1993; Despres et al., 2001). Aussi, une classification de l'obésité a été admise depuis longtemps (Vague, 1947). On parle d'obésité androïde en présence d'une accumulation du tissu au niveau de l'abdomen et d'obésité gynoïde lorsque le profil de répartition de la graisse corporelle est voisin de celui observé chez la femme.

C.2.3 - Spécificités fonctionnelles des tissus adipeux sous-cutané et viscéral.

Tant en ce qui concerne la différenciation, la sensibilité hormonale en particulier à l'insuline, les réponses métaboliques, la sécrétion de nombreuses molécules ou l'apoptose, les adipocytes de différentes localisations ont des spécificités bien marquées (Montague et O'Rahilly, 2000). De nombreuses études ont mis en évidence des différences métaboliques entre adipocytes de différentes localisations. Certaines localisations sont considérées comme des tissus de soutien avec des adipocytes très peu actifs au niveau métabolique (graisse fémorale). D'autres localisations ont un métabolisme intermédiaire (tissu adipeux sous-cutané abdominal) et enfin les adipocytes viscéraux sont considérés comme métaboliquement très actifs. Anatomiquement, le réseau veineux du tissu adipeux viscéral est drainé par le système porte qui amène directement au foie les produits de sécrétion du tissu adipeux et en particulier les acides gras et le glycérol.

Ces particularités sont étayées par des différences selon la localisation anatomique du tissu adipeux dans l'expression des **facteurs de transcription**, des **protéines** impliquées dans les fonctions adipocytaires, de la **lipogénèse** et la **lipolyse**.

En ce qui concerne le PPAR γ impliqué dans la **lipogénèse**, son expression est trouvée diminuée dans les adipocytes viscéraux dans une étude (Lefebvre et al., 1998) ou sa fonction est altérée. Par contre, l'expression du PPAR γ est identique dans les adipocytes viscéraux et sous cutanés dans une autre étude (Adams et al., 1997), suggérant que les adipocytes viscéraux soient moins sensibles à ce facteur que les adipocytes sous-cutanés.

Les différences au niveau de la **lipolyse** résultent en partie de la sensibilité hormonale, variable selon les sites, généralement en rapport avec un nombre de récepteurs différent. Ainsi, en ce qui concerne la sensibilité à l'insuline, les adipocytes viscéraux sont plus résistants à l'hormone ce qui favorise la lipolyse et expriment moins de transporteurs de glucose GLUT4 ou de glycogène synthétase. Le tissu adipeux viscéral est également plus sensible que le tissu adipeux sous-cutané à la lipolyse induite par les catécholamines car il possède plus de récepteurs β -1 et β -2 adrénergiques et il est moins sensible aux effets antilipolytiques des récepteurs α -2 adrénergiques et de l'insuline (Montague et O'Rahilly, 2000).

Plusieurs études chez l'homme ont comparé le tissu adipeux abdominal sous-cutané et viscéral en ce qui concerne l'expression de gènes codant pour des facteurs ou cytokines secrétés par l'adipocyte. Les résultats obtenus sont dans l'ensemble difficiles à intégrer dans un schéma physiologique simple. Des différences d'expression de facteurs impliqués dans l'apoptose ont été montrées entre les deux types d'adipocytes. La leptine, proapoptotique, est exprimée préférentiellement dans le tissu adipeux sous-cutané et la molécule inhibitrice de l'apoptose (cIAP2) dans le tissu adipeux viscéral (Montague et al., 1998). À l'inverse, les adipocytes viscéraux sont plus sensibles à l'apoptose induite par le TNF- α ou la déprivation en sérum que les adipocytes sous-cutanés (Niesler et al., 1998). L'expression de l'IL6 serait plus importante dans le tissu adipeux viscéral que sous-cutané (Fried et al., 1998). En revanche, en ce qui concerne le PAI-1, les résultats sont contradictoires (Alessi et al., 1997, Eriksson et al., 2000).

En ce qui concerne **les corticoïdes**, l'étude de l'expression de leurs récepteurs et des enzymes du métabolisme de ces hormones en fonction de la topographie du tissu adipeux apporte des éléments de réponse moléculaires et cellulaires expliquant des effets divergents. L'expression du gène de la LPL en réponse aux glucocorticoïdes est augmentée (Fried et al, 1993) et favorise le stockage des triglycérides. Or, le tissu adipeux viscéral exprime un plus grand nombre de récepteurs aux glucocorticoïdes que le tissu adipeux sous-cutané. D'autres différences existent entre ces deux tissus notamment en ce qui concerne les propriétés oxydatives ou réductrices de la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase-1 qui intervient dans la conversion intracellulaire cortisone-cortisol. Ainsi il a été montré que l'activité réductrice de cette enzyme favorisant la synthèse de l'hormone glucocorticoïde active (cortisol) était très élevée dans le tissu adipeux viscéral alors qu'elle était à peine détectable dans le tissu adipeux sous-cutané (Bujalska et al, 1997). L'ensemble de ces résultats suggère que le tissu adipeux viscéral serait plus sensible à l'action des glucocorticoïdes, cet effet étant exacerbé par la possibilité d'une transformation locale de cortisone en cortisol.

III - L' INSULINO-RESISTANCE

L'insulino-résistance peut être définie comme l'incapacité d'une quantité normale d'insuline à augmenter l'incorporation du glucose et son utilisation dans les mêmes proportions que ce qui pourrait être observé dans une population présentant une insulino-sensibilité normale. L'action de l'insuline est la conséquence de la liaison de l'insuline à son récepteur dans la membrane plasmique et la transmission du signal à l'intérieur de la cellule à la suite d'interactions protéines-protéines.

Plusieurs mécanismes ont été proposés comme possible causes du développement de l'insulino-résistance.

Ils incluent : (A) des anomalies génétiques ou acquises de l'insuline ou d'une ou plusieurs protéines de la cascade de l'action de l'insuline (B) la malnutrition fœtale (C) une origine tissulaire spécifique en particulier l'augmentation de l'adiposité viscérale (D) des modifications des lipides membranaires qui ont conduit à l'hypothèse membranaire de l'insulino-résistance.

A - ANOMALIES GENETIQUES OU ACQUISES DE L'INSULINE, D'UNE OU PLUSIEURS PROTEINES DE LA CASCADE DE L'ACTION DE L'INSULINE

Des études de ségrégation familiale ont montré que la sensibilité à l'insuline est en partie génétiquement déterminée. Chez des descendants de parents diabétiques de type 2, une résistance à l'action de l'insuline a pu être mise en évidence avant l'apparition de perturbations de l'environnement métabolique (DeFronzo et al., 1997). En fait, de nombreuses études suggèrent que des facteurs génétiques influencent l'insulino-résistance. Cependant la majorité d'entre elles sont basées sur des ressemblances familiales, qui peuvent résulter d'influences environnementales partagées plutôt que de l'effet des gènes par eux mêmes (Stern, 2000)

Un gène candidat est habituellement défini comme un gène dont la protéine, basée sur son activité biologique, peut vraisemblablement influencer le paramètre considéré. Il est certain que dans le cas de l'insulino-résistance de telles protéines sont légions et des anomalies nombreuses ont pu être identifiées au niveau pré-récepteur, récepteur ou post-récepteur. Mais pour beaucoup d'entre elles, le caractère génétique ou acquis de l'anomalie ne peut être tranché.

A.1 - NIVEAU PRE-RECEPTEUR

Une sécrétion accrue de proinsuline inactive agissant comme inhibiteur compétitif pourrait expliquer un état d'insulino-résistance. Toutefois, une sensibilité faible à l'insuline n'est pas associée avec un rapport proinsuline/insuline élevé (Mykkanen et al., 1999).

Un déficit de l'action de l'insuline peut être dû à l'existence d'anticorps anti-insuline (Kondrat'eva et Meniavtsera, 1990) ou une dégradation augmentée de l'insuline mise en évidence dans le sérum de patients insulino-résistants et diabétiques de type 2 (Misbin et al., 1981; Standl et Kolb, 1984).

Enfin, avant d'atteindre son récepteur membranaire, l'insuline doit d'abord diffuser du compartiment plasmatique vers le milieu interstitiel. Il a été proposé qu'un ralentissement du passage de l'insuline à travers l'endothélium capillaire pouvait représenter une première étape limitante contribuant à l'état d'insulino-résistance (Bergman et al., 1992). Chez les sujets obèses, il existe une hypertrophie des fibres musculaires et une diminution de la densité des capillaires. Ces deux anomalies ralentiraient la diffusion de l'insuline vers les cellules-cibles et contribueraient ainsi à l'insulino-résistance. Par ailleurs, il existe une dysfonction endothéliale chez le sujet insulino-résistant ainsi qu'un défaut de vasodilatation normalement induite par l'insuline dans les territoires musculaires squelettiques (par exemple en réponse à un repas). Ces anomalies pourraient réduire la captation du glucose et aggraver une insulino-résistance (Wiernsperger, 1994; Steinberg et al., 1996).

A.2 - NIVEAU RECEPTEUR

La présence d'anticorps anti-récepteur de l'insuline est associée à des concentrations plasmatiques élevées d'insuline et à une insulino-résistance marquée (Di Paolo et al., 1990).

En absence d'anticorps anti-récepteur de l'insuline, il peut exister des altérations de la liaison de l'insuline à son récepteur due à une mutation au niveau du récepteur, à la diminution du nombre de récepteurs (*down régulation* des récepteurs due à l'hyperinsulinisme) ou de leur affinité. (Seely et Olefsky, 1993, Rau et al., 2000 ; Osawa et al., 2001).

Sur des biopsies musculaires, un défaut d'autophosphorylation du récepteur de l'insuline a été constaté (Maegawa, 1991). Enfin, on peut observer des altérations de la transduction du signal à la suite de la diminution de l'activité kinasique du récepteur. Toutefois, les altérations de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline ne semblent pas constituer une altération primaire mais résulter d'un certain nombre d'autres altérations métaboliques (Garvey et Birnbaum, 1993; Shao et al., 2000.)

A.3 - NIVEAU POST-RECEPTEUR

La liaison de l'insuline à son récepteur est normale mais le métabolisme intracellulaire sur lequel agit l'insuline, ainsi que la séquence des événements biochimiques intracellulaires sont altérés. Au niveau post-récepteur, il est également difficile de détecter si on est en présence d'altérations primaires ou secondaires.

a) Des altérations soit génétiques, soit acquises de la protéine G, ou de certaines enzymes intervenant au cours de l'action de l'insuline comme la PLC, les enzymes synthétisant le PA et le PI, les enzymes du métabolisme du DAG, peuvent également conduire à des altérations dans la transmission du signal par les deux médiateurs qui sont les têtes polaires et le système **DAG-PKC**.

b) Une altération directe de la PKC peut également survenir. En effet, il a été rapporté que le rat obèse fa/fa présentait une activation et une translocation de la **PKC** diminuées (Van De Werve et al., 1987).

c) Une autre hypothèse impliquerait les systèmes de signal des phospholipides. Une augmentation de la production du **DAG** peut provoquer secondairement une diminution de la translocation de la PKC. L'action du DAG est en effet biphasique, et intervient négativement à haute concentration (Turinski et al., 1990). Des études sur le rat Zucker génétiquement obèse insulino-résistant, ont démontré que le taux de DAG augmentait de plus de 82% dans le foie et de 136% dans les tissus musculaires (Turinski et al., 1990). Le mécanisme par lequel l'augmentation du DAG diminue la réponse à l'insuline doit impliquer à la fois une diminution de la liaison de l'insuline à son récepteur et une diminution de la phosphorylation de ce dernier. En effet, Bollag et al., 1986, ont observé que la phosphorylation du récepteur de l'insuline au niveau des résidus sérines par la PKC pouvait inhiber jusqu'à 65% de l'activité tyrosine kinase intrinsèque du récepteur et ceci à la fois en présence et en absence d'insuline. La stimulation excessive de ce système induirait donc la phosphorylation du récepteur au niveau du résidu sérine compromettant ainsi la phosphorylation du site tyrosine et donc la transmission du signal.

d) L'activation par l'insuline de l'enzyme **PI3 kinase** est reconnue actuellement comme étant essentielle pour la réponse métabolique de l'hormone. En effet, *in vitro*, l'inhibition de la PI3 kinase bloque complètement l'entrée du glucose dans la cellule en réponse à l'insuline. L'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) est fortement diminuée chez les rongeurs insulino-résistants et ce déficit est associé à une diminution marquée de la phosphorylation de la tyrosine de l'IRS-1 (Shulman, 1999). Par ailleurs, chez la souris ob/ob, une hyperinsulinémie chronique entraîne une diminution de l'expression de IRS-2, qui est phosphorylée en réponse à une stimulation par l'insuline et active la PI3K (White, 1998; Shimomura et al., 2000). Or, les rongeurs présentant une déficience génétique dans l'IRS-2 présentent une activation de la gluconéogenèse hépatique et une diminution de l'action de l'insuline à supprimer les efflux de glucose (Withers et al., 1998; Previs et al., 2000).

La PI3K, par phosphorylation des phosphoinositides, stimule plusieurs protéines intracellulaires dont la sérine/thréonine kinase Akt ou PKB (Wang Q et al., 1999, Tanti et al., 1997; Le Marchand-Brustel et al., 1999) ainsi que certains membres des protéines kinase C atypiques (PKC λ et ξ) (Kotani et al., 1998; Standaert et al., 1997) qui sont impliquées dans la voie de signalisation métabolique de l'hormone. Sur des biopsies musculaires au cours d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique, un défaut d'activation de la PI3K associée à IRS-1

ont été mis en évidence (Bjornholm et al., 1997). D'autre part, il a été montré que les acides gras libres, qui sont souvent élevés chez le patient diabétique et qui induisent une résistance à l'insuline, agissent essentiellement en diminuant la phosphorylation de la tyrosine de IRS-1 et par conséquent l'activation de PI3K en réponse à l'insuline (Shulman, 2000).

e) Il a été suggéré également que la sérine/thréonine kinase protéine kinase B (PKB/Akt) joue un rôle dans la régulation par l'insuline du transport du glucose. Une activation altérée de la PKB a été mise en évidence dans des situations d'insulino-résistance. Toutefois, des résultats contradictoires ont également été présentés et le rôle de la PKB dans le contrôle du transport du glucose reste controversé (Summers et al., 2000; Hadjuch et al., 2001).

f) Récemment, il a été montré que les patients diabétiques ont significativement moins de translocation de GLUT4 vers la membrane plasmique comparé à des sujets sains, alors que le nombre total de transporteurs n'est pas diminué (Garvey et al., 1998). Ces données suggèrent que des défauts de la signalisation intracellulaire de l'insuline menant à la **translocation du GLUT4** jouent un rôle important dans la physiopathologie de la résistance à l'insuline.

B - MALNUTRITION FOETALE

Il y a de nombreuses données qui suggèrent qu'une croissance intra-utérine retardée et un petit poids à la naissance augmente le risque d'insulino-résistance et de ses complications métaboliques à l'adolescence et l'âge adulte (Léger et al., 2000 ; Kuh et al., 2002) . Un poids faible à la naissance est associé à un retard dans la stimulation de la glycolyse/glycogénolyse dans le muscle squelettique en activité (Thompson et al., 1997). En fait, la malnutrition *in utero* pourrait entraîner une sélection de gènes favorables à la survie face à une carence nutritionnelle (Hales et Barker., 1992).

C - ORIGINE TISSULAIRE DE L'INSULINO-RESISTANCE

Le site tissulaire du déficit primaire conduisant à l'insulino-résistance est très controversé. Parmi les tissus périphériques sensibles à l'insuline : foie, muscle et tissu adipeux, un rôle central est attribué selon les auteurs au tissu adipeux ou au muscle.

C.1 - LE TISSU ADIPEUX

Le rôle central de l'adipocyte est associé aux modifications des acides gras non estérifiés et des protéines sécrétées par les adipocytes. Toutefois, les relations entre le tissu adipeux et l'insulino-résistance sont extrêmement complexes. Une augmentation de la masse grasse ne saurait être la seule cause de l'insulino-résistance. En effet, il existe des sujets obèses qui sont métaboliquement sains (Sims et al., 2001). En revanche, une modification de la répartition du tissu adipeux avec une augmentation du tissu adipeux viscéral aurait un rôle déterminant dans le développement de l'insulino-résistance.

C.1.1 - Rôle des acides gras non estérifiés.

Les acides gras libérés par le tissu adipeux au cours de la lipolyse jouent un grand rôle dans la physiopathologie de l'insulino-résistance. Chez les obèses, l'augmentation de la masse grasse est associée à un accroissement de la lipolyse qui entraîne une augmentation des concentrations circulantes d'acides gras libres. La production adipocytaire accrue des acides gras libres (AGL) stimule la gluconéogenèse car l'oxydation des AG fournit des co-facteurs indispensables à cette gluconéogenèse (acétyl-CoA, adénosine tri-phosphate, NADH) (Girard et al., 2000). Elle augmente la sortie du glucose hépatique induite par l'insuline. Dans le muscle squelettique, la libération accrue d'acides gras entraîne une résistance à l'insuline, du fait de leur utilisation préférentielle par rapport au glucose (Arner et al., 1995). Une oxydation accrue des acides gras entraîne une diminution de l'incorporation du glucose, de la glycolyse

et de la synthèse de glycogène. (Girard et al., 1995; Boden et al., 1997; Hawkins et al., 1997; Jucker et al., 1997 ; Boden et al., 1999). Si le muscle squelettique n'arrive pas à résorber cette hausse d'AGL plasmatiques, ceux-ci seront capturés et réestérifiés en triglycérides (TG) par les adipocytes. Ces TG vont être des stimulateurs et des substrats pour la production des VLDL hépatique et la gluconéogenèse. Au niveau de l'insuline, l'augmentation d'acides gras libres diminuerait l'extraction hépatique de l'hormone et contribuerait ainsi à l'hyperinsulinémie systémique (Björntorp, 1991). Enfin, la présence d'un excès d'AGL diminue la liaison de l'insuline à son récepteur. Par conséquent, la clairance hépatique de l'insuline diminue. L'hyperinsulinémie qui en résulte est responsable d'un phénomène de régulation négative du nombre des récepteurs de l'insuline dans les autres tissus et donc d'une augmentation de l'insulino-résistance. L'excès de tissu adipeux viscéral pourrait être ainsi responsable de l'insulino-résistance hépatique et musculaire.

C.1.2- Rôle des adipocytokines

D'autres preuves du rôle central de l'adipocyte sont apportées par le rôle des protéines sécrétées par l'adipocyte dans l'insulino-résistance.

Les sujets obèses surexpriment le gène du $\text{TNF-}\alpha$ dans le tissu adipeux et le muscle squelettique. Cette cytokine augmenterait l'afflux d'acides gras dans le muscle (Hotamisligil et Spiegelman, 1994). Le $\text{TNF-}\alpha$, qui potentiellement joue un rôle dans la résistance à l'insuline liée à l'obésité, agit en altérant la signalisation intracellulaire de l'insuline. Les femmes obèses ont des taux élevés de $\text{TNF-}\alpha$ et une corrélation positive entre le rapport taille/hanche et le taux de $\text{TNF-}\alpha$ plasmatiques a été démontrée (Tsigos et al., 1999). De nombreux résultats sont en faveur d'une implication du $\text{TNF-}\alpha$ dans l'insulino-résistance bien que ces conséquences métaboliques soient moins importantes chez l'homme que chez les animaux. Le $\text{TNF-}\alpha$ inhibe la différenciation de l'adipocyte en altérant la régulation de l'expression des facteurs de transcription tels le $\text{PPAR}\gamma$ et $\text{C/EBP}\alpha$ (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*), (Meng et al., 2001). Le $\text{TNF-}\alpha$ agit directement au niveau de la cascade de signalisation de l'insuline en induisant la phosphorylation d'un résidu sérine de l'IRS-1. Il altère également le métabolisme glucidique en bloquant la synthèse des GLUT4 et leur translocation (Hauner et al., 1995), et le métabolisme lipidique en augmentant la lipolyse et

par conséquent la production d'AGL (Kawakami et al., 1987). Il a un effet supresseur sur des gènes spécifiques de l'adipocytes (LPL, glycérol-3 phosphate deshydrogénase, GLUT4 et aP2) (Petruschke et Hauner, 1993, Kawakami et Kuroki, 1993). Le TNF- α a donc un effet autocrine et paracrine sur le glucose local de l'adipocyte, sur le métabolisme des AG et sur la différenciation de l'adipocyte.

In vitro, l'expression de l'**IL-6** au niveau de l'adipocyte viscéral serait plus importante que celle des adipocytes subcutanés et cette expression augmenterait avec l'indice de masse corporel (IMC) (Vgontzas et al., 2000). L'obésité serait considérée comme un état inflammatoire faible. L'IL-6 a de multiples actions. L'IL-6 qui a un effet direct sur l'axe HPAA (*hypothalamic-pituitary-adrenal-axis*), active la sécrétion du CRH (*corticotropin-releasing hormone*) et la production de l'ACTH (*adrenocorticotropic hormone*) et du cortisol, et la sécrétion des TG hépatiques chez le rat conduisant à un état de hypertriglycémie. Tout comme le TNF- α , l'IL-6 induit l'insulino-résistance indirectement en stimulant la lipolyse.

Le gène codant pour l'**adiponectine** est spécifique du tissu adipeux (Matsuzawa et al., 1999). Une expression diminuée de l'adiponectine est corrélée à l'insulino-résistance. Le degré d'adiponectinémie est plus fortement corrélé au degré d'insulino-résistance et à l'hyperinsulinémie qu'avec l'obésité (Weyer et al., 2001). Les thiazolidinediones, ligands des PPAR γ , augmenteraient la production d'adiponectine par un effet direct sur son promoteur en supprimant l'effet inhibiteur du TNF- α sur ce même promoteur (Maeda et al., 2001).

La résistine, protéine riche en cystéine, a été proposée comme lien entre l'obésité et le diabète. Dans des modèles animaux, les niveaux plasmatiques de résistine sont augmentés dans les formes génétiques et acquises de l'obésité et diminués après administration de rosiglitazone, molécule anti-diabétique (Steppan et al., 2001). Toutefois, des résultats contradictoires ont été obtenus chez les rongeurs (Way et al., 2001; Moore et al., 2001) et chez l'homme (Nagaev et Smith, 2001, Savage et al., 2001).

En ce qui concerne **la leptine**, son rôle éventuel dans l'insulino-résistance associée à l'obésité est encore mal élucidé (Fruhbeck et Salvador, 2000).

Le taux circulant de leptine est corrélé positivement avec l'IMC et l'obésité. La taille de la cellule adipeuse est associée positivement au taux de synthèse de la leptine (Couillard et al., 2000).

Des facteurs de transcriptions semblent impliqués dans la régulation de l'expression de la leptine et de la taille des adipocytes (Spiegelman et Flier, 1996). En effet, le promoteur du gène *ob* est positivement régulé par CEBP α alors que les agonistes du PPAR γ inhibent son expression (Baile et al., 2000).

C.1.3- Rôle de l'obésité et du tissu adipeux viscéral.

L'obésité est généralement associée à l'insulino-résistance. Toutefois, la relation est extrêmement complexe et il apparaît nécessaire de faire la distinction entre indice de masse corporelle, pourcentage de masse grasse, distribution du tissu adipeux, et insulino-résistance, en particulier si l'on considère les complications de l'insulino-résistance : diabète de type 2 et pathologies cardio-vasculaires. En premier lieu, la répartition des insulinémies à jeun pris classiquement comme critère d'insulino-résistance, est extrêmement large. Dans une population d'obèses, une fraction est saine sur le plan métabolique (Sims, 2001).

Par ailleurs, des hommes de poids normal mais ayant un pourcentage de masse grasse élevé (21,1-35,2) ont une prévalence plus élevée de facteurs de risque pour des pathologies cardio-vasculaires que des hommes ayant un pourcentage de masse grasse plus faible (6-10,4) (Tanaka et al., 2002). Ces observations ne sont pas retrouvées dans un groupe de femmes et bien que la distribution de la masse grasse n'ait pas été déterminée dans cette étude, elles confirment indirectement l'importance du tissu adipeux viscéral qui est caractéristique du sexe mâle.

L'obésité centrale (viscérale et abdominale), plutôt que l'obésité périphérique, est une des composantes essentielles du syndrome métabolique. Elle est fortement associée aux complications métaboliques et cardiovasculaires (Carey, 1998; Kobayashi, 2001; Lemieux,

2001 ; Hernandez-Ono et al, 2002). Ces complications et l'augmentation de l'incidence de mortalité sont associés à une augmentation du rapport taille/hanche (marqueur de l'obésité centrale) et non à l'IMC (Larsson et al., 1984; Lapidus et al., 1984).

L'activité lipolytique au niveau du tissu adipeux viscéral est importante car celui-ci est plus sensible aux catécholamines. L'afflux d'acides gras libres via la veine portale induit une insulino-résistance dans le foie (Bergman et al., 2001).

Enfin, les **glucocorticoïdes** qui sont importants dans la différenciation adipocytaire et le métabolisme de l'adipocyte pourraient jouer un rôle dans l'obésité viscérale. La densité des récepteurs aux glucocorticoïdes est plus importante dans le tissu adipeux viscéral que dans le tissu adipeux sous-cutané. Par conséquent, une surexpression ou une variation génétique des récepteurs aux glucocorticoïdes peuvent contribuer à l'apparition d'une obésité centrale (Stears et Byrne, 2001). Un polymorphisme dans la longueur du fragment de restriction Bcl1 a été détecté dans le gène du récepteur aux glucocorticoïde. Le polymorphisme le moins fréquent est associé à la prédominance de graisse abdominale viscérale (Buemann et al., 1997). Par ailleurs, des perturbations de l'axe HPAA (*hypothalamic-pituitary-adrenal axis*) conduisant à une sensibilité augmentée de l'organisme au stress pourrait potentiellement être une cause de l'adiposité viscérale. Enfin, les cellules stromales adipeuses peuvent produire du cortisol à partir de la cortisone à travers l'expression de la 11 bêta-hydroxystéroïdes déshydrogénase de type 1 (11 β HSD1). Or, l'activité de la 11 β HSD1 est plus importante dans les cellules stromales viscérales que dans les cellules provenant du tissu adipeux stromal sous-cutané (Marin et al., 1992) et pourrait constituer un troisième mécanisme conduisant à l'obésité viscérale et au syndrome métabolique. Il convient de noter qu'une obésité viscérale est rencontrée dans certaines pathologies telles le syndrome polycystique ovarien, la déficience en hormone de croissance, certaines formes de lipodystrophie, et le syndrome de Cushing, situations où il existe une insulino-résistance importante.

C.2 - LA CELLULE MUSCULAIRE

Selon Stears et Byrne (2001), le site primaire de l'insulino-résistance ne se situerait pas dans le tissu adipeux mais dans le muscle squelettique avec des changements dans le métabolisme de l'adipocyte survenant comme une conséquence du développement de l'insulino-résistance dans le muscle. Un déficit de l'entrée du glucose dans le muscle entraînerait une augmentation de l'entrée du glucose et des acides gras dans le tissu adipeux pour prévenir l'hyperglycémie. Le stockage accru de triglycérides entraînerait une augmentation de la masse grasse avec comme conséquence une production accrue de cytokines (TNF- α , IL-6, PAI-1, angiotensinogène). L'augmentation de la lipolyse (par exemple par le TNF- α) induisant une augmentation de la concentration des acides gras plasmatiques peut contribuer à amplifier une insulino-résistance préexistante dans le muscle en interférant avec l'oxydation du glucose (cycle de Randle). Des modèles animaux de souris transgéniques déficientes dans le récepteur de l'insuline au niveau du muscle squelettique présentent un tableau proche du syndrome métabolique avec une augmentation de leur masse de tissu adipeux, en particulier une localisation viscérale, associée à une profonde insulino-résistance dans le muscle (Moller et al., 1996). Ceci pourrait s'expliquer par une redistribution des substrats énergétiques du muscle vers le tissu adipeux (Kim et Moussa, 2000)

L'ensemble de ces résultats montrent que dans le syndrome métabolique, les altérations fonctionnelles du tissu adipeux viscéral et du muscle jouent un rôle considérable sans qu'il soit possible de déterminer quel tissu est à l'origine de ces altérations qui se répercutent sur le foie, majorant les troubles métaboliques.

D - HYPOTHESE MEMBRANAIRE DE L'INSULINO-RESISTANCE

D.1 - LA MEMBRANE PLASMIQUE

D.1.1 - Rappels sur la composition et la structure membranaire.

Chaque cellule est enfermée dans une membrane, enveloppe protectrice de 7,5-12,5 nanomètres (nm), qui délimite le compartiment cellulaire et la sépare du milieu environnant. La membrane cellulaire constitue à la fois une barrière de perméabilité et un lieu privilégié d'échanges. D'une part, elle contrôle l'entrée des substances nutritives et la sortie des déchets cellulaires, crée un milieu interne différent du milieu externe en maintenant des concentrations intracellulaires d'ions spécifiques. C'est un lieu d'échanges de matière et d'énergie entre la cellule et le milieu externe, grâce à de nombreux transporteurs de nature protéique localisés dans ces biomembranes. Enfin, elle renferme la plupart des récepteurs des signaux (chimiques ou physiques) venant du milieu environnant donnant de la sorte à la cellule la possibilité de répondre aux différents stimuli qu'elle reçoit.

Les constituants principaux de la membrane plasmique sont les lipides, les protéines et les hydrates de carbone dont les quantités varient d'un type cellulaire à un autre et d'un type de membrane à l'autre.

Tableau 4: Composition en % de quelques membranes plasmiques.

	Protéines (%)	Lipides (%)	Glucides (%)
Gaine de myéline	20	77	3
Hématie	50	42	8
Mitochondries membrane plasmique externe	50	48	2
Mitochondries membrane plasmique interne	75	24	1

⌘ Les lipides

Les lipides sont les constituants majeurs des membranes. Ils existent deux catégories de lipides qui participent à la structure des membranes: les phospholipides et les stérois.

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles comportant une tête polaire hydrophile et une partie hydrophobe formée de chaînes d'acides gras.

Ces caractéristiques moléculaires font que les phospholipides, plongés dans une solution aqueuse, forment une structure dans laquelle les têtes hydrophiles entrent en contact avec l'eau, tandis que les parties hydrophobes se disposent vers l'intérieur, s'isolant du milieu aqueux.

Un modèle de membrane cellulaire a été proposé par Danielli et Davson (1935), dans lequel les phospholipides s'organisent sous forme d'une bicouche.

Il existe deux types de phospholipides : les glycérolipides et les sphingolipides.

Le squelette des glycérolipides est le glycérol sur lequel sont fixés trois résidus. Deux de ses fonctions alcool sont estérifiées par des acides gras à longues chaînes. Ils peuvent être saturés ou comporter une ou plusieurs doubles liaisons (monoinsaturés ou polyinsaturés). C'est la partie hydrophobe de la molécule. Le troisième résidu comporte la partie polaire du lipide (tête polaire). Il est composé d'un acide phosphorique fixé au glycérol sur sa dernière fonction alcool par une liaison ester. Cet acide phosphorique est lui même estérifié par divers groupement : la choline, l'éthanolamine, la sérine et le *myo*-inositol. Les glycérolipides majeurs sont au nombre de quatre : la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI), (figure 7).

Les sphingolipides sont composés d'un amino-alcool comportant une longue chaîne latérale, la sphingosine. Sur la fonction amine est greffé un résidu acyl et la fonction alcool porte le groupement polaire, le plus fréquent étant la phosphorylcholine. Les lipides correspondants sont les sphingomyélines (SM).

Les stérois sont constitués d'un noyau stéroïde composé de quatre cycles saturés.

L'extrémité du noyau stéroïde comporte une chaîne latérale ramifiée possédant une ou plusieurs doubles liaisons. Le plus important des stérois participant à la structure des membranes des cellules eucaryotes est le cholestérol (CL) (figure 7). Il s'intercale entre les

chaînes carbonées des phospholipides sous forme libre. Le CL et la SM sont co-localisés dans la membrane plasmique (Slotte, 1999).

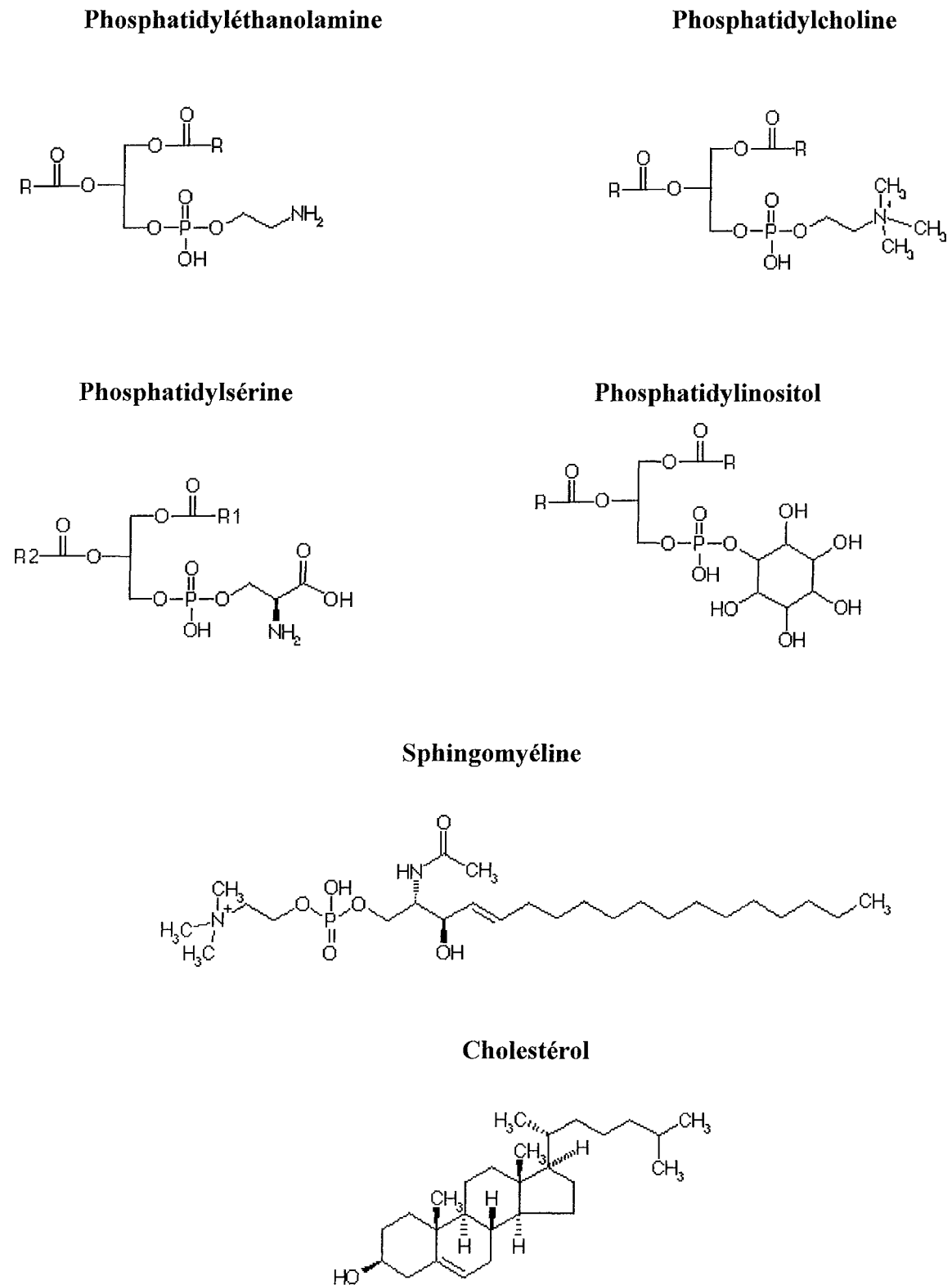


Figure 7: Structure des phospholipides et du cholestérol.

⌘ Les protéines

Singer et Nicholson (1972), en retenant le concept de bicouche lipidique, proposèrent le modèle membranaire de « mosaïque fluide » dans lequel ils ont introduit la distribution des protéines membranaires.

Dans la bicouche lipidique sont immergées des **protéines** qui sont classés en 2 catégories:

- les protéines périphériques (ou extrinsèques). Ces protéines semblent liées à la structure de la membrane par des interactions de nature principalement électrostatique.
- et les protéines intégrées (ou intrinsèques) très fortement liées aux membranes par des interactions hydrophobes avec les chaînes d'acides gras. Certaines de ces protéines traversent la bicouche lipidique et sont appelées protéines transmembranaires.

⌘ Les sucres

Les hydrates de carbone sont présents au niveau de la couche externe de la membrane cellulaire sous la forme d'oligosaccharides, chaînes formées par l'association de molécules de sucres simples. Ces chaînes sont à leur tour liées à des protéines ou des lipides, formant respectivement des **glycoprotéines** et des **glycolipides**. Elles forment le glycocalix. Les sucres neutres liés aux glycoprotéines sont majoritairement du D-galactose, D-mannose, D-glucose et D-fucose et les sucres aminés sont la N- acétylglucosamine, la N-acétylgalactosamine et l'acide N-acétylneuraminique. Le nombre de sucres attachés aux acides aminés varient entre 2 et 20-30, avec un nombre moyen proche de 7. Généralement, les glycoprotéines supportent en association avec les glycolipides les groupements qui confèrent aux cellules leur individualité biologique : groupements antigéniques, enzymes, transporteurs, récepteurs hormonaux.

D.1.2 - Asymétrie lipidique de la membrane plasmique.

La répartition des différentes classes de phospholipides dans les membranes cellulaires est asymétrique et dépend du type cellulaire. Les lipides neutres (phosphatidylcholine et sphingomyéline) se situent principalement dans le feuillet extracellulaire tandis que les lipides chargés anioniques (phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine) se regroupent dans le feuillet cytoplasmique. 80 % de la PI est retrouvée dans le feuillet cytoplasmique (Butikofer et al., 1990).

D.1.3 - Fluidité membranaire

Le modèle en « mosaïque fluide » proposé par Singer et Nicolson en 1972, décrit la membrane comme une bicouche de lipides, les protéines étant enfoncées plus ou moins profondément dans la bicouche. Il suggère que la matrice de la membrane n'est pas stabilisée par des interactions protéines-protéines. Au contraire, les lipides forment dans la membrane un continuum. Puisque les lipides membranaires tendent à avoir des chaînes hydrocarbonées fluides aux températures physiologiques, le continuum serait fluide. Ainsi, les lipides et les protéines membranaires pourraient diffuser librement dans le plan de la membrane.

De nombreuses expérimentations ont permis de vérifier la validité du modèle. Les lipides sont animés de plusieurs types de mouvements : diffusion latérale dans le plan de la membrane (le coefficient de diffusion D étant voisin de 10^{-7} - 10^{-8} $\text{cm}^2.\text{sec}^{-1}$), flexions des chaînes d'acides gras dues à l'agitation thermique, « flip-flop » correspondant au passage d'un phospholipide d'une couche lipidique à l'autre. La période temporelle du mécanisme de flip-flop peut varier de quelques dizaines de minutes à plusieurs heures. Les protéines se déplacent également dans le plan de la membrane, plus lentement que les lipides ($D > 5.10^{-11}$ $\text{cm}^2.\text{sec}^{-1}$). Elles peuvent se rassembler, dans certaines circonstances, à un pôle cellulaire (phénomènes de patching, capping).

Toutefois, la notion de continuum lipidique fluide a été approfondie depuis l'hypothèse de Singer et Nicolson. La fluidité de la bicouche lipidique dépend de nombreux facteurs : longueur des acides gras et leur degré d'insaturation. Les acides gras à longues chaînes et/ou saturés entraînant une augmentation des forces de Van der Waals, la cohésion est plus forte et la membrane est peu fluide. Les acides gras à courtes chaînes et/ou insaturés entraînent une diminution des forces de Van der Waals et donc la membrane est plus fluide. La présence de cholestérol impose des restrictions de mobilité. Par ailleurs, il a été montré que certains phospholipides avaient tendance à former des structures non pas en bicouche mais en phase hexagonale (HII) ainsi que des micelles inversés. Ces structures seraient trouvées au sein de la bicouche, dans certaines circonstances, notamment dans les cas de fusion de biomembranes ou de vésiculation (pinocytose, phagocytose) (Cullis et De Kruffyff, 1976). Enfin, il existe au sein des biomembranes des microdomaines avec des composition en lipides très spécifiques, les rafts et les cavéoles.

D.1.4 - Les « rafts » et « cavéoles ».

Il existe des microdomaines qui sont des invaginations de la membrane plasmique et qui présentent une composition particulière, caractéristique de ce qui a été désigné sous le terme de « radeaux lipidiques » ou « rafts » (Brown, 2001). Les rafts sont enrichis en CL et SM. Les cavéoles seraient le résultat de la coalescence de certains radeaux obtenus par oligomérisation des isoformes 1 et 2 d'une protéine: la cavéoline (Murata et al., 1995; Fielding et al., 2001). Par conséquent, dans la membrane plasmique coexisteraient deux phase fluides : une phase désordonnée enrichie en phospholipides et une phase ordonnée, les rafts et les cavéoles, enrichis en SM et CL. Les rafts et cavéoles qui sont de petite taille (< 100 nm) constituent des micro-domaines résistant aux détergents (Triton X, par exemple) (Roche-Arveiller & Couderc, 2000).

Les cavéoles existent dans les cellules endothéliales, les fibroblastes ou les cellules musculaires lisses, et sont particulièrement abondantes dans la membrane plasmique des adipocytes (Fan et al., 1983). Un grand nombre de protéines impliquées dans la transduction du signal sont localisées dans les cavéoles et/ ou dans les cavéoles lors de la transduction d'un signal. C'est le cas d'un grand nombre de récepteurs: par exemple, du récepteur à insuline (Gustavsson et al, 1999), du GLUT4 (Kandror et al., 1995), de la protéine kinase C, de la protéine G (petite protéine hétérotrimère), des récepteurs à tyrosine kinase (Chang et al., 1994; Li et al., 1995; Liu et al., 1997). De nombreux travaux ont montré que la cavéoline avait une fonction de structure et de régulation. En effet, la cavéoline régule de nombreuses protéines de signalisation dans les cavéoles: elle inhibe les protéines G, la famille kinase Src, l'oxyde nitrique (NO) synthétase, et la protéine kinase C à la suite d'interactions avec le domaine « *scaffolding* » de la cavéoline. Cette inhibition s'effectue par une interaction spécifique de ces molécules et la cavéoline par un motif: $\phi X\phi XXXX\phi$ ou $\phi XXXX\phi XX\phi$, où ϕ est un résidu aromatique).

D.2 – HYPOTHESE MEMBRANAIRE DE L'INSULINO-RESISTANCE.

Un certain nombre de travaux mettant en évidence des relations entre les propriétés structurales et dynamiques de la membrane et l'action de l'insuline permettent d'envisager une ou des hypothèses membranaires de l'insulino-résistance.

D.2.1 - Rôle des acides gras

Plusieurs équipes ont montré une relation entre la composition en acides gras des phospholipides et une ou plusieurs étapes de la réponse à l'insuline, en particulier l'interaction de l'insuline avec son récepteur.

In vitro, de nombreuses études ont montré les effets de l'insaturation des phospholipides sur les interactions de l'insuline avec son récepteur dans des cellules en culture. Le fait d'augmenter l'insaturation des lipides conduit à une augmentation de la concentration du récepteur de l'insuline associée à une diminution de l'affinité dans les cellules de Friend (Ginsberg et al., 1981) et dans les cellules d'Ehrlich (Ginsberg et al., 1982). En revanche, les cellules endothéliales bovines ne montrent aucune modification de la liaison de l'insuline, en dépit d'une insaturation augmentée des chaînes d'acides gras (Bar et al., 1984). La supplémentation du milieu de culture de cellules musculaires L-6 avec des acides gras n-6 et n-3 entraîne une augmentation de l'incorporation de ces acides gras dans les membranes et de l'affinité du récepteur de l'insuline. L'enrichissement en acide linoléique C18:2n-6 de cellules d'hépatome provoque une augmentation de la fluidité et du nombre de récepteurs de forte affinité mais une diminution de la synthèse du glycogène, suggérant des divergences entre la liaison de l'insuline et son action (Bruneau et al., 1987).

In vivo, dans des modèles animaux, la modification physiologique ou à la suite d'un régime alimentaire des acides gras des phospholipides et la modulation éventuelle du récepteur de l'insuline ont donné des résultats beaucoup plus controversés. Dans la membrane adipocytaire du rat âgé, le rapport acides gras saturés/insaturés est augmenté et est associée à une diminution des sites de haute affinité de liaison de l'insuline (Yegutkin et al., 1991). Par

contre, la liaison est augmentée dans l'adipocyte de rat après un régime riche en acides gras polyinsaturés qui a augmenté le contenu de ces acides gras dans les phospholipides membranaires (Field et al., 1990). L'augmentation d'acide linoléique C18:2n-6 était associée avec une augmentation dans la liaison de l'insuline, du nombre de récepteurs de l'insuline du transport du glucose stimulé par l'insuline et de la lipogenèse (Field et al., 1990). Les régimes riches en acides gras polyinsaturés, par modification de la composition des acides gras des phospholipides membranaires, augmentent la liaison de l'insuline dans le muscle squelettique de rat (Liu et al., 1994) et le transport du glucose dans les adipocytes de rats insulino-résistants (ayant un régime à base d'huile de poisson (Luo et al., 1996). Une proportion augmentée en AG saturés des phospholipides membranaires du muscle est associée à l'insulino-résistance. En revanche, un enrichissement en AG polyinsaturés n-3 est associé à une augmentation de la sensibilité de l'insuline, à une diminution des triglycérides plasmatiques et à une augmentation de l'expression de GLUT4 dans les adipocytes de rats insulino-résistants (Peyron-Caso et al., 2002).

De plus, un enrichissement en AG polyinsaturés à longue chaînes (20-22 carbones) est également associé une augmentation de la sensibilité de la cellule à l'insuline et il apparaît que, parmi les AG polyinsaturés, un rapport faible en n-6/n-3 favorise une bonne sensibilité à l'insuline (Storlien et al., 1991; Storlien et al., 1996).

In vivo, chez l'homme, l'insulino-résistance a été associée à des modifications structurales et dynamiques (fluidité) de la membrane (Devynck, 1995).

Un régime enrichi en acides gras n-3 pendant 8 semaines a pour conséquences une augmentation de l'insaturation des phospholipides de la membrane érythrocytaire et une augmentation du transport du glucose stimulé par l'insuline, estimé par la clairance métabolique du glucose après une administration simultanée de glucose et d'insuline (Popp-Snijders et al., 1987). L'augmentation d'acide linoléique C18:2n-6 dans la membrane érythrocytaire chez des femmes est associée à une augmentation de la liaison de l'insuline (Berlin et al., 1989). Dans le muscle squelettique d'hommes justifiées d'un pontage coronarien, une corrélation négative a été trouvée entre l'insulino-résistance et le pourcentage d'acide gras polyinsaturés, d'acide arachidonique, et le rapport C20:4n-6/C20:3n-6 (Borkman et al., 1993). Dans une autre étude sur le même tissu, les contenus en acide palmitique C16:0 et linoléique C18:2n-6 étaient respectivement négativement et positivement corrélés à la sensibilité périphérique à l'insuline chez des hommes sains âgés de 70 ans (Vessby et al.,

1994). Une étude plus détaillée de la composition en acides gras de deux classes de phospholipides, la PE et la PC a montré que ce sont les acides gras de la PC qui peuvent jouer un rôle important dans la relation entre les acides gras et la sensibilité à l'insuline (Clore et al., 1998). En effet, les mêmes auteurs ont montré que l'induction d'une insulino-résistance après un traitement d'un mois avec de l'acide nicotinique est associée à une augmentation des AG saturés et une diminution des AG polyinsaturés dans le muscle (Clore et al., 2000). Enfin, chez les jeunes enfants, un pourcentage plus faible d'acides gras à très longues chaînes en particulier l'acide docosahexaénoïque C22:6n-3 est associé à des glycémies à jeun plus élevées suggérant que la saturation des phospholipides du muscle peut influencer le développement ultérieur de pathologies associées à l'insulino-résistance (Baur et al., 1998). Ces résultats ont été confirmés récemment dans des modèles animaux impliquant une restriction protéique durant la grossesse et la lactation et un régime riche en acide gras saturés au début de la croissance. La composition en acides gras du muscle squelettique présentait une réduction en AG docosahexaénoïque 22:6n-3 (Loizou et al., 2001), similaire à celle des indiens PIMA, une population dont l'insulino-résistance à l'âge adulte est élevée lorsque le poids à la naissance est faible (Dabelea et Pettitt, 2001).

D.2.2 - Rôle des lipides.

Chez les patients obèses, la liaison à l'insuline du monocyte sanguin est réduite. Après un régime hypocalorique, la liaison de l'insuline est restaurée et est associée à une diminution du rapport cholestérol/phospholipides. L'amélioration de la liaison de l'insuline était due à une augmentation du nombre de récepteurs et de leur affinité (Neufeld et al., 1986). Toutefois, des résultats contradictoires ont été observés quand régime et exercice sont associés.

Par ailleurs, des travaux dans notre laboratoire ont montré que des changements de composition des phospholipides membranaires étaient associés à une baisse de l'action de l'insuline. Dans un groupe de femmes obèses non diabétiques, des marqueurs de l'insulino-résistance, l'insulinémie à jeun, le HOMA (Homeostasis model assessment), et les variations de concentrations d'insuline après une surcharge glucidique (AUC), sont associés à une diminution de la fluidité membranaire de la membrane d'érythrocyte et à une augmentation du contenu en SM (Candiloros et al., 1996).

Un résultat similaire a été trouvé dans le cas de cellules insulino-sensibles, les adipocytes. Une corrélation positive entre le contenu en SM de la membrane adipocytaire et l'insulinémie à jeun et le HOMA a été montrée dans un groupe de femmes obèses présentant des degrés variables d'insulino-résistance. Des changements affectaient d'autres classes de phospholipides : la PC et la PE. Cependant, une analyse de régression multiple a montré que seule la SM expliquait 45,6 et 43,8% de la variation de l'insulinémie à jeun et du HOMA (Zeghari et al., 2000 (a)).

Le contenu en SM de la membrane adipocytaire et les marqueurs de l'insulino-résistance (l'insulinémie à jeun et le HOMA) sont également négativement corrélés avec l'expression du PPAR γ chez des femmes obèses présentant des degrés d'insulino-résistance variable. Ainsi, les femmes obèses présentant l'insulino-sensibilité la plus faible sont caractérisées par l'expression la plus faible des PPAR γ dans le tissu adipeux sous-cutané (Zeghari et al., 2000 (b)).

L'existence de relations entre la SM et l'expression du PPAR γ peuvent être d'importance car le PPAR γ joue un rôle majeur dans la différenciation adipocytaire et a un rôle important dans la sensibilité des tissus cibles à l'insuline. Toutefois, ce ne sont que des corrélations et un effet direct de la SM sur l'expression du PPAR γ a été recherché *in vitro*.

L'addition de SM au milieu de cultures d'adipocytes entraîne une diminution de l'expression du PPAR γ (ARNm et protéines). Par ailleurs, plus la chaîne d'acide gras de la SM est longue, plus la diminution de l'expression du PPAR est importante, suggérant que la nature de l'acide gras et le caractère asymétrique du sphingolipide ont un rôle dans la régulation du PPAR γ (Al-Makdissy et al., 2001).

Ces données *in vitro* suggèrent qu'un excès de SM membranaire pourrait être à l'origine d'une insulino-résistance.

D.2.3 - Relations sphingomyéline (SM) et insulino-résistance

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'effet de la SM.

***une première hypothèse mettant en cause un rôle direct de la SM ou de ses métabolites dans la transduction du signal.**

La SM, par son effet rigidifiant, peut altérer l'action de l'insuline au niveau membranaire (Sandra et al., 1984). De plus, il existe un cycle de la SM dans lequel ses métabolites (le céramide et la sphingosine) ont un rôle important dans la transmission des signaux membranaires. Une surexpression du TNF- α est impliquée dans l'insulino-résistance. Or, cette cytokine affecte l'action de l'insuline en activant une sphingomyélinase qui va provoquer l'hydrolyse de la SM membranaire et la production de céramides. Un analogue du céramide, le C2-céramide régule négativement la translocation des GLUT1 et GLUT4 vers la membrane plasmique (Brindley et al., 1999), diminue le transport du glucose stimulé par l'insuline et la synthèse du glycogène dans une lignée de cellules musculaires (Hadjuch et al., 2001). L'action du céramide serait liée à une incapacité de la protéine kinase B à s'amarrer à la membrane plasmique. En effet, l'expression de la cible membranaire de PKB induit un augmentation du transport du glucose et le céramide n'a plu aucun effet sur l'action de l'insuline (Hajduch et al., 2001). La composition de la SM et de ses métabolites jouent probablement un rôle très important dans les propriétés métaboliques du muscle. En effet, il a été montré récemment chez le rat que l'exercice, connu pour améliorer la réponse à l'insuline, entraînait une diminution des acides gras liés à la SM et au céramide et en particulier des acides gras saturés et une diminution de l'activité de la sphingomyélinase (Dobrzyn et Gorski, 2002).

***une deuxième hypothèse prenant en compte les interactions sphingomyéline-cholestérol dans les membranes biologiques et une modulation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique**

Il existe une forte affinité entre la SM et le CL au sein des membranes cellulaires (Slotte, 1999). Une augmentation de la teneur en SM membranaire est suivie d'une augmentation du cholestérol membranaire (Gatt et Bierman, 1980; Al-Makdissy et al., 2001). De plus, dans l'étude *ex vivo* sur la membrane adipocytaire (Zeghari et al., 2000 (b)), l'expression du PPAR γ était corrélée négativement avec le contenu membranaire en SM mais également avec le contenu membranaire en cholestérol. Par conséquent, l'effet de la SM sur l'expression du PPAR γ pourrait être indirect et lié en fait à l'augmentation conjointe de CL. En effet, les niveaux de cholestérol cellulaires régulent l'activation des facteurs de transcription SREBPs (Wang et al., 1994). Lorsque le CL s'accumule dans les cellules, la forme active des SREBPs

est inhibée. Or, l'expression de la forme active des SREBPs augmente l'activité transcriptionnelle des PPAR γ . Les quantités augmentées de CL membranaires reflètent vraisemblablement un excès de CL intracellulaire qui inhiberait l'activation de SREBPs et par conséquent l'expression du PPAR γ .

***enfin, une troisième hypothèse reliant les cavéoles à l'insulino-résistance.**

Les cavéoles, microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et sphingomyélines sont vraisemblablement impliquées dans l'insulino-résistance.

La translocation des transporteurs de glucose GLUT4 suite à une stimulation par l'insuline, requière au moins 2 signaux médiés par le récepteur de l'insuline : l'un menant à l'activation de la PI3K et l'autre à l'activation de la protéine TC 10 qui se lie à la protéine GTP. Il a été montré que la translocation des GLUT4 après stimulation par l'insuline exige une séparation spatiale et une compartimentalisation distincte des voies de la PI3K et de la TC10, la protéine TC10 étant localisée dans les cavéoles (Watson et al., 2001). Une proportion importante de GLUT4 est située dans les cavéoles des adipocytes stimulés par l'insuline. La désorganisation des cavéoles par la filipine bloque l'internalisation des GLUT4 et la *down-regulation* de ces récepteurs initiées par la suppression de l'insuline. Ainsi, les cavéoles seraient un passage obligatoire pour les GLUT4 avant l'internalisation de ces transporteurs (Ros-Baro et al., 2001).

En ce qui concerne la cavéoline, l'insuline entraîne une redistribution de la cavéoline des fractions membranaires intracellulaires vers la surface cellulaire (Munoz et al., 1996). L'insuline stimule également spécifiquement la phosphorylation de la cavéoline suggérant l'implication d'une activité tyrosine kinase en aval du récepteur de l'insuline (Mastick et al., 1995). Cette kinase serait la protéine Fyn de la famille des kinases Src. Elle serait co-localisée avec la cavéoline et activée après la liaison avec Cb1, une protéine IRS qui se transloquerait dans les cavéoles après la stimulation par l'insuline (Mastick et Saltiel, 1997).

Enfin, des niveaux élevés de cavéolines ont été trouvés dans le muscle de modèles de rats insulino-résistants (James et al., 2001). Par ailleurs les pools cavéolaires de céramide, métabolite de la SM seraient des composants importants de l'insulino-résistance induite par le TNF- α (Grigsby et Dobrowsky, 2001).

IV- LIPOPROTEINES PLASMATIQUES ET INSULINO-RESISTANCE

A- LES LIPOPROTEINES: STRUCTURE ET FONCTION

Les lipoprotéines (LP) sont composées d'un cœur hydrophobe (esters de cholestérol, triglycérides) et d'une surface hydrophile constituée de phospholipides, de cholestérol libre et de protéines (figure 8). Les protéines présentes (nommées apoprotéines ou apolipoprotéines) se caractérisent par une structure secondaire à base d'hélices α amphiphiles.

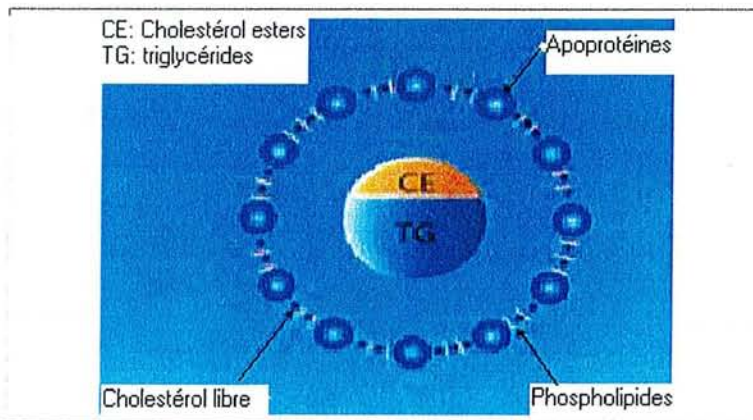


Figure 8: Structure générale des lipoprotéines.

A.1- APOLIPOPROTEINES (TABLEAU 5)

Outre le fait que les apolipoprotéines aident à "solubiliser" la fraction lipidique, certaines jouent un rôle dans la régulation de l'activité d'enzyme impliquées dans leur métabolisme, d'autres se lient spécifiquement à certains récepteurs des membranes cellulaires (B au récepteur LDL, A1 au récepteur HDL, ...). Elles ont en charge le transport plasmatique des lipides, insolubles en milieu aqueux.

Tableau 5: Caractéristiques des apolipoprotéines du plasma humain

apolipoprotéine	Masse moléculaire (Daltons)	Nombre d'acides aminés	Chromosome	Concentration plasmatique mg/l
A-I	28000	243	11	1200
A-II	16500	2x77	1	400
A-IV	46000	393	11	160
B-100	550000	4536	2	900
B-48	255000	2152	2	0
C-1	6500	57	19	50
C-II	8800	79	19	50
C-III	8750	79	11	130
D	29000	169	3	70
E3	39000	299	19	50

- Masse moléculaire des apolipoprotéines.

Les apolipoprotéines sont des glycoprotéines de masse moléculaire très variable : de 550000 daltons pour l'apoB-100 à 6500 pour l'apoC-I.

Les principales fonctions des apoprotéines:

- **Les apoprotéines A (A-I et A-II)**, constituants majeurs des HDL (*high density lipoprotein*). Les apolipoprotéines A-I n'existent à jeun qu'au niveau des HDL où elles représentent 65 % des apolipoprotéines, leur taux sérique est de $1,4 \pm 0,3$ g/L. L'apoprotéine A-I est synthétisée au niveau du foie et de l'intestin. Elle a un rôle majeur dans le transport de retour du cholestérol. L'apoprotéine A-II, également synthétisée dans le foie et l'intestin, a essentiellement un rôle structurel.

- **L'apoprotéine B (ou apo B-100)**, synthétisée au niveau du foie. Leur concentration dans le sérum est de $1 \pm 0,3$ g/L correspondant principalement (90 %) à celles des apoB des LDL. Elle a d'une part un rôle de structure pour les LDL (*low density lipoprotein*) et les VLDL (*very low density lipoprotein*), mais également un rôle métabolique majeur puisqu'elle permet l'interaction de ces LP avec les récepteurs B, E. Constituant protéique majeur (95 %) des LDL, elle est présente à des taux importants (40 %) dans les VLDL. Les chylomicrons comportent une forme différente d'origine intestinale, désignée sous le terme d'**apo B-48**.

- **Les apoprotéines C (C-I, C-II, C-III)**, principaux constituants des VLDL et des chylomicrons. L'apoprotéine C-II est le cofacteur d'une enzyme intervenant dans le métabolisme des LP riches en triglycérides, la lipoprotéine lipase. L'apoprotéine C-III a au contraire une action inhibitrice sur la lipoprotéine lipase activée.

- **L'apoprotéine E**, synthétisée au niveau du foie et des macrophages, a un rôle métabolique, permettant la captation des remnants des chylomicrons par les récepteurs B, E des hépatocytes

A.2- LIPOPROTEINES

Les LP se distinguent les unes des autres par leur composition, qui conditionne leur taille et leur densité. Les LP peuvent être séparées par électrophorèse, par ultracentrifugation ou par précipitation ; cette dernière technique permet en routine le dosage du cholestérol des LP. Cinq classes de LP sont habituellement distinguées: les chylomicrons, les VLDL, les IDL (LP de densité intermédiaire), les LDL, les HDL (Ginsberg, 1998; Havel et Kane, 1995).

La densité, la composition et les principales apolipoprotéines des LP sont données dans le tableau 6.

Tableau 6: Propriétés des lipoprotéines du plasma humain.

Lipoprotéines	Densité (nm)	% de protéines	% de lipides	Principaux lipides	Principales apolipoprotéines
Chylomicrons	< 0,99	2	98	TG	B48, C-II, C-III, A-I, A-IV
VLDL	0,99-1,006	10	90	TG	B100, C-II, E
IDL	1,006-1,019	20	80	TG	B100, E
LDL	1,019-1,063	25	75	CL	B100, Lp(a)
HDL2	1,063-1,125	50	50	PL	A-I, A-II
HDL3	1,125-1,21	50	50	PL	A-I, A-II

La composition des LP en triglycérides (TG), en cholestérol total (CT) et en phospholipides (phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylcholine (PC) et sphingomyéline (SM)) est donnée dans le tableau 7.

Tableau 7: Composition en triglycérides (TG), en cholestérol total (CT) et en phospholipides des LP (Bagdad et al., 1990).

Lipoprotéines	TG (mg/dl)	CT (mg/dl)	PE ($\mu\text{mol/ml}$)	PI ($\mu\text{mol/ml}$)	PC ($\mu\text{mol/ml}$)	SM ($\mu\text{mol/ml}$)
VLDL	44,0 \pm 26,3	8,9 \pm 5,9	ND	ND	0,159 \pm 0,09	0,047 \pm 0,02
LDL	31,2 \pm 7,7	112,9 \pm 29,0	ND	ND	0,686 \pm 0,15	0,279 \pm 0,08
HDL2	4,6 \pm 1,9	11,1 \pm 3,6	0,062 \pm 0,04	ND	0,092 \pm 0,10	0,035 \pm 0,03
HDL3	17,2 \pm 3,2	37,7 \pm 6,7	0,058 \pm 0,04	ND	0,509 \pm 0,11	0,077 \pm 0,00

ND: Non détecté

B- RAPPELS SUR LE METABOLISME DES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES (FIGURE 9)

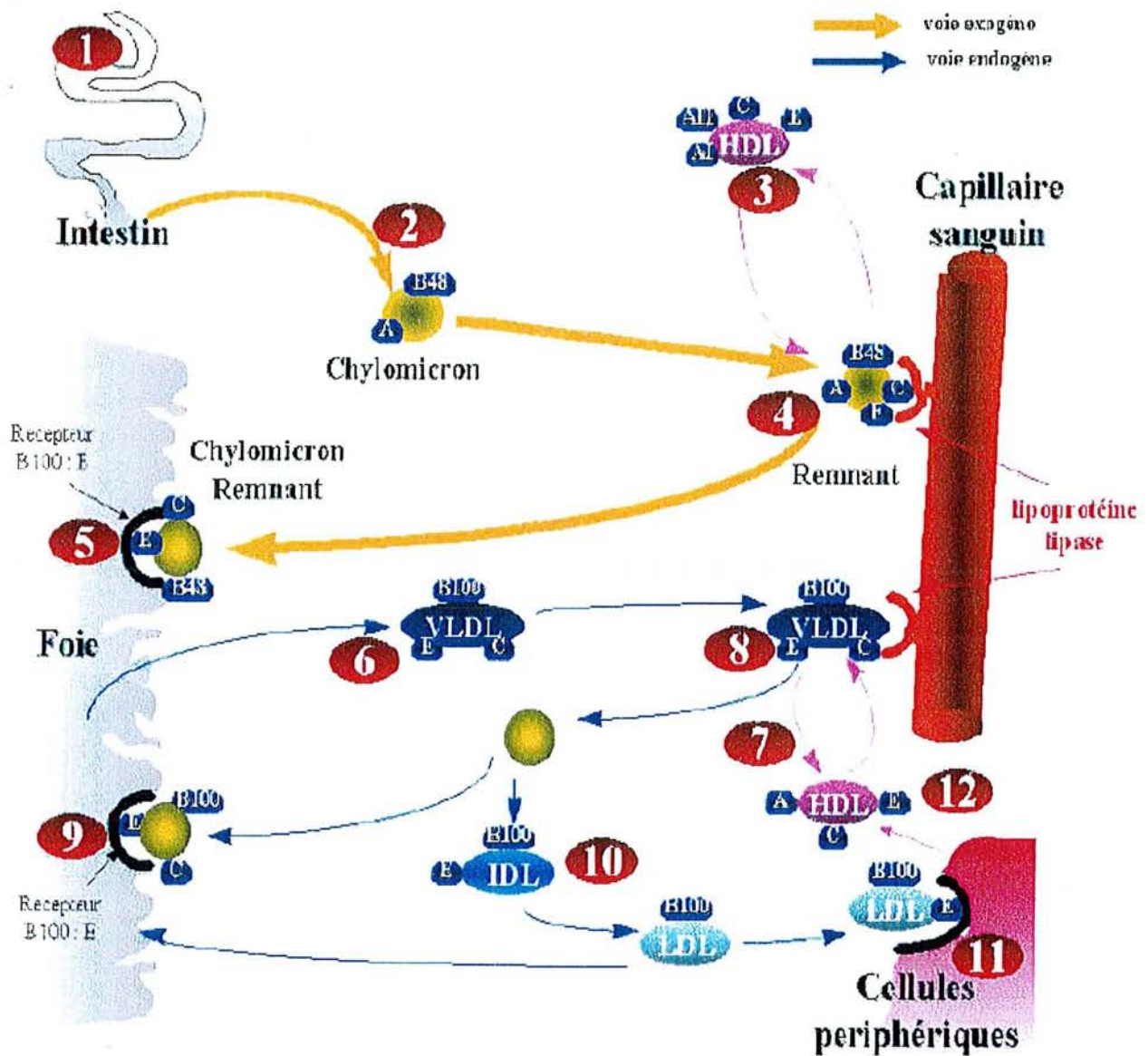


Figure 9: Métabolisme des lipoprotéines plasmatiques

B.1- ABSORPTION INTESTINALE

- Les lipides sont hydrolysés dans le duodénum par les enzymes pancréatiques : lipase, phospholipase, cholestérol estérase. L'hydrolyse des lipides nécessite une émulsification en gouttelettes grâce aux sels biliaires qui sont indispensables à l'action de la lipase pancréatique ainsi qu'un cofacteur protéique, la colipase.
- Les produits de la digestion des lipides sont des monoglycérides, des acides gras, du cholestérol et des lysophospholipides. Associés aux sels biliaires sous forme de micelles, ils sont absorbés par la bordure « en brosse » des entérocytes.
- Dans les entérocytes, les lipides sont synthétisés à nouveau à partir du glycérophosphate pour les phospholipides (voie de KENNEDY) et des monoglycérides pour les triglycérides (voie de CLARK et HUBSCHER). Une partie du cholestérol est estérifié dans les entérocytes (cholestérol esters), et l'autre partie est réexcrété vers la lumière intestinale sous forme de cholestérol libre.
- Les chylomicrons sont synthétisés par les entérocytes avec une partie centrale riche en triglycérides avec très peu d'esters de cholestérol et une couche superficielle contenant des apolipoprotéines (apoB-48, apoA-I et apoA-IV), des phospholipides et du cholestérol libre.
- Les chylomicrons sont drainés par les chylifères lymphatiques qui déversent la lymphe dans le sang veineux. Au cours de ce transport la couche superficielle des chylomicrons s'enrichit en apolipoprotéines d'origine hépatique (apoA-I, apoC-II, apoE).

B.2- METABOLISME DES CHYLOMICRONS

(FIGURE 10)

- Les apoC-II incluses dans la couche périphérique des chylomicrons permettent leur reconnaissance et leur dégradation plasmatique très rapide par les lipoprotéine lipases (LPL). Ces enzymes sont synthétisées par les tissus adipeux et musculaire et après leur sécrétion restent fixées aux cellules endothéliales, flottant librement dans la lumière des capillaires irriguant ces tissus. Les acides gras libérés lors de l'hydrolyse des triglycérides pénètrent dans

les tissus sous-jacents : les cellules musculaires les utilisent comme substrats énergétiques et les cellules adipeuses les réestérifient sous forme de triglycérides de réserve.

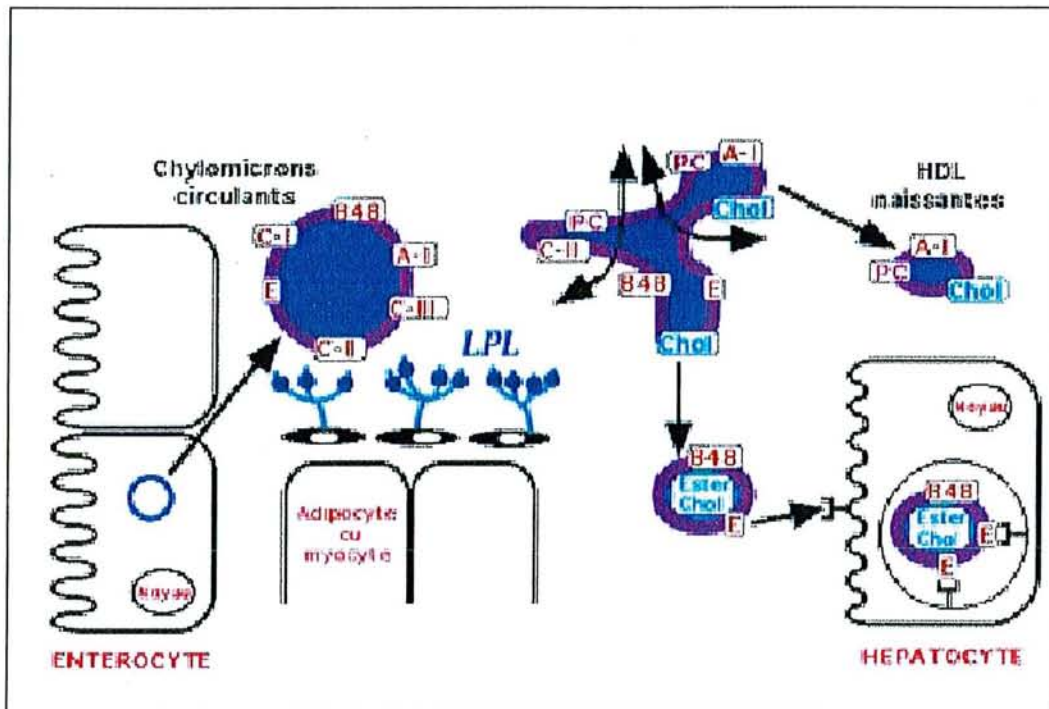


Figure 10: Métabolisme des chylomicrons.

- L'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons, crée une déplétion du volume central induisant des déformations. Des replis de la couche périphérique se forment par accolement de zones adjacentes et se détachent dans la circulation sous la forme de disques formés de phospholipides, cholestérol et apolipoprotéines de petite masse (apoC, apoA principalement) constituants des HDL naissantes discoïdales ou pré- β -HDL.
- Les édifices résiduels enrichis en apoB48 et E sont reformés autour des esters de cholestérol et des molécules restantes de triglycérides. Ces « remnants » de chylomicrons de diamètre très réduit (400 à 600 Å) sont encore appelés β -VLDL intestinales (de densité VLDL, mais de mobilité électrophorétique β) et sont dégradés par le foie qui les capture grâce à des récepteurs reconnaissant les apoE.

B.3- TRANSFORMATION DES VLDL EN LDL (FIGURE 11)

- La synthèse des VLDL est réalisée de façon continue par les cellules hépatiques permettant la sécrétion permanente des triglycérides de synthèse endogène. Cette synthèse augmente considérablement après les repas.

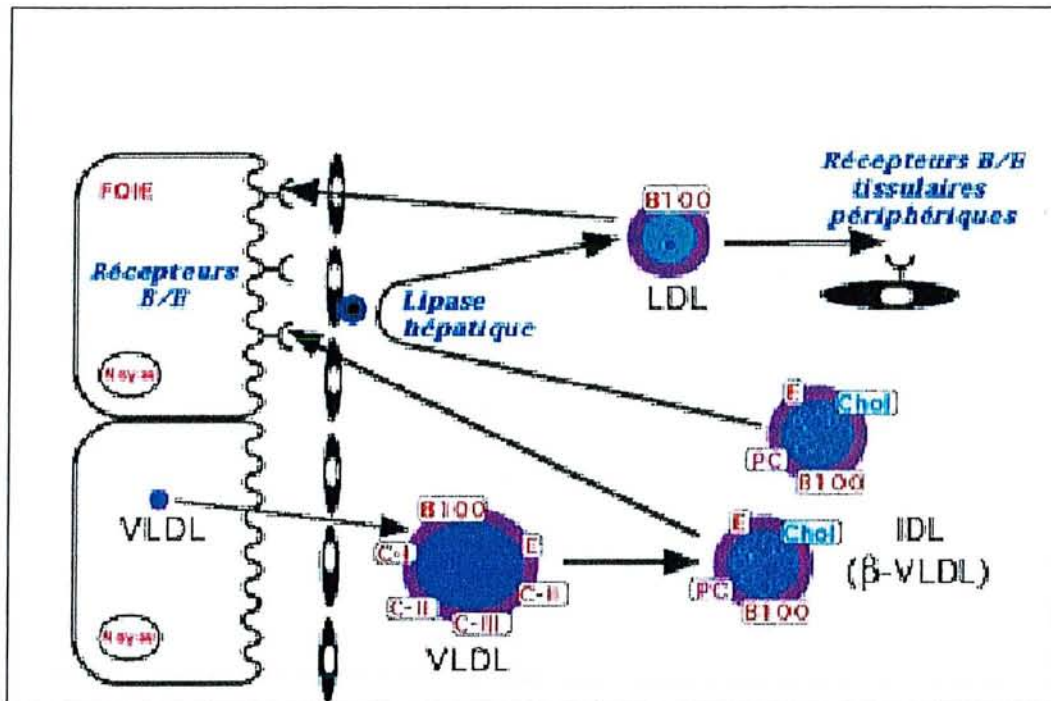


Figure 11: Transformation des VLDL en LDL.

- La dégradation plasmatique des VLDL est identique à celle des chylomicrons, dépendante de la lipoprotéine lipase (Sadurska et Skalska-Hilgier, 2001). Celles-ci sont activées par les apoC-II présentes à la surface des VLDL et l'hydrolyse des triglycérides assure un apport régulier d'acides gras aux tissus adipeux et musculaire. Au cours de cette hydrolyse, une partie des VLDL (comprenant des phospholipides et l'apo C et E) est transférée aux HDL.

- Comme dans la dégradation des chylomicrons l'hydrolyse des triglycérides induit des replis de l'enveloppe périphérique qui sont libérés dans la circulation, constituant un départ des apolipoprotéines C.

- Des édifices plus petits, enrichis en apoB-100 et E, se restructurent autour des esters de cholestérol et des molécules restantes de triglycérides. Les « remnants » de VLDL ainsi

formés sont des édifices plus petits que les VLDL, appelés IDL ou β -VLDL hépatiques. Deux voies métaboliques peuvent transformer les IDL: la voie des récepteurs, la lipase hépatique.

Une grande quantité des IDL formées est internalisée et dégradée dans le foie via les récepteurs B/E (récepteur LDL) (Betteridge, 1996), assurant la reconnaissance des apoE sous leur isomorphe normal E3/E3. Ces récepteurs sont distincts des récepteurs précédemment décrits pour le catabolisme des « remnants » de chylomicrons, car ils reconnaissent les apoE et les apoB-100 (Brown et Goldstein, 1990; Brown et Goldstein, 1981; Van der Westhuyzen et al, 1991).

- Une quantité plus faible de particules IDL est dégradée dans la circulation par la lipase hépatique (LH ou triglycéride lipase hépatique) dont la structure est homologue de celle des LPL mais qui est exclusivement synthétisée par les cellules hépatiques. La LH permet la transformation des IDL en LDL (Brown et al, 1990), qui doivent donc être considérées comme des produits terminaux du catabolisme des VLDL et des IDL.

- La reconnaissance des LDL par leurs apoB-100 se fait au niveau des récepteurs précédemment décrits pour les IDL (récepteur LDL), mais pour les LDL cette captation bien que principalement hépatique, a lieu aussi dans toutes les cellules de l'organisme.

Il existe sept sous-fractions de LDL selon leurs dimensions, LDL₁ représentant la plus grande et LDL₇, la plus petite (Austin et al, 1994; Slyper, 1994). Les LDL restent relativement longtemps dans la circulation (demi-vie ($t_{1/2}$) = 1,5 jour), et sont éventuellement dégradées par liaison avec les récepteurs LDL du foie et de certains tissus extra-hépatiques. Les LDL en circulation représentent environ 70 % du total. Lorsque le foie ou les tissus extra-hépatiques requièrent du cholestérol (pour la synthèse de nouvelles membranes, d'hormones stéroïdes ou d'acides biliaires), ils synthétisent des récepteurs LDL pour l'obtenir, et ils en diminuent la synthèse lorsqu'il y a un surplus en cholestérol (Brown et Goldstein, 1981).

B.4- METABOLISME DES HDL (I) (FIGURE 12)

- Les HDL naissantes ont une structure discoïdale composée d'une couche unique repliée sur elle-même, de molécules de phospholipides, de cholestérol et d'apolipoprotéines. L'origine des HDL est tissulaire ou plasmatique :

- le foie sécrète des HDL discoïdales essentiellement composées d'apoE,
- dans la circulation, les replis formés à partir des éléments de surface des chylomicrons et des VLDL, lors de l'hydrolyse des triglycérides, représentent une source importante d'HDL discoïdales contenant principalement des apoA-I et apoC.

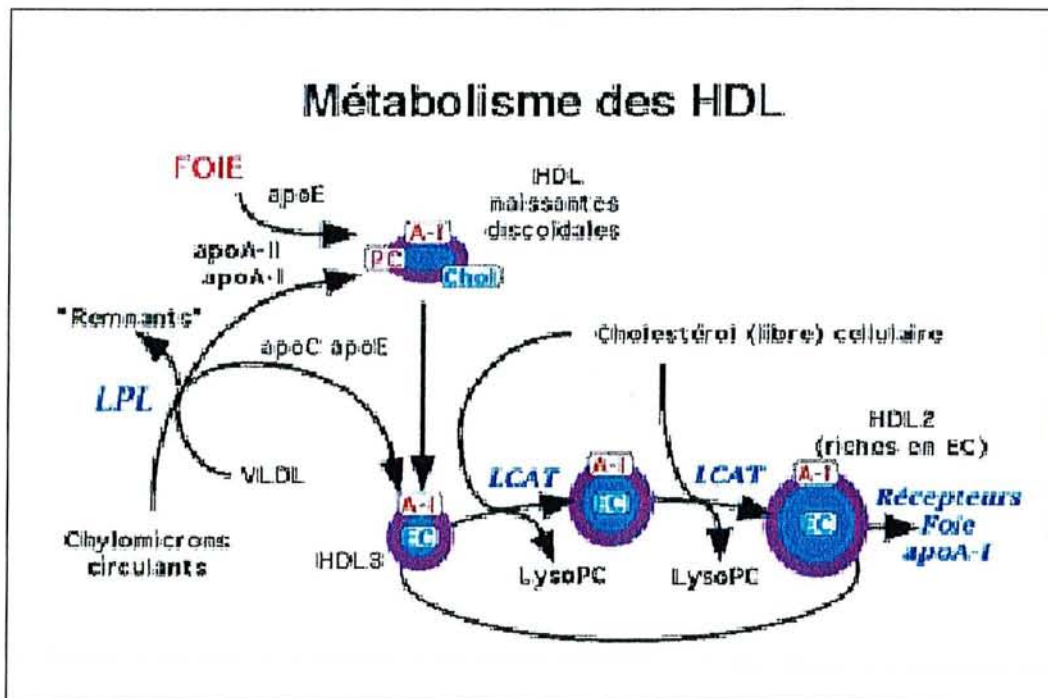


Figure 12: Métabolisme des HDL (I).

- Les HDL discoïdales riches en phospholipides peuvent s'enrichir en molécules de cholestérol qu'elles soustraient aux cellules périphériques. Une enzyme plasmatique la Lécithine Cholestérol Acyl-Transférase (LCAT) estérifie ces molécules excédentaires de cholestérol qui cessent d'appartenir à l'enveloppe périphérique des HDL et migrent au centre des édifices, transformant les HDL discoïdales en HDL3 sphériques. Les HDL3 représentent la fraction la plus dense et quantitativement la plus importante des HDL, de concentration à peu près identique dans les deux sexes. Les HDL3 à leur tour sont capables de capturer des molécules de cholestérol membranaire et après nouvelle action de la LCAT se transforment en édifices de plus en plus riches en esters de cholestérol. Les HDL2 ainsi obtenues ont une densité plus légère et un

diamètre plus grand que les HDL3. Cette fraction est habituellement beaucoup plus importante chez l'enfant et la femme que chez l'homme.

- La captation du cholestérol membranaire par les HDL réalise ce que l'on appelle le transport « reverse » du cholestérol car les HDL2 ainsi formées sont en grande partie reconnues et dégradées dans les cellules hépatiques par l'intermédiaire de récepteurs qui reconnaissent les apoA-I présentes dans la structure des HDL. Le cholestérol ainsi retourné au foie est éliminé dans la bile ou dégradé en acides biliaires. Dans ce transport « reverse » de cholestérol, seules certaines HDL ne contenant pas d'apoA-II mais constituées d'apoA-I, appelées lipoparticules LpA-I, sont capables d'induire ce mouvement du cholestérol hors des cellules.

B-5 METABOLISME DES HDL (II) (FIGURE 13)

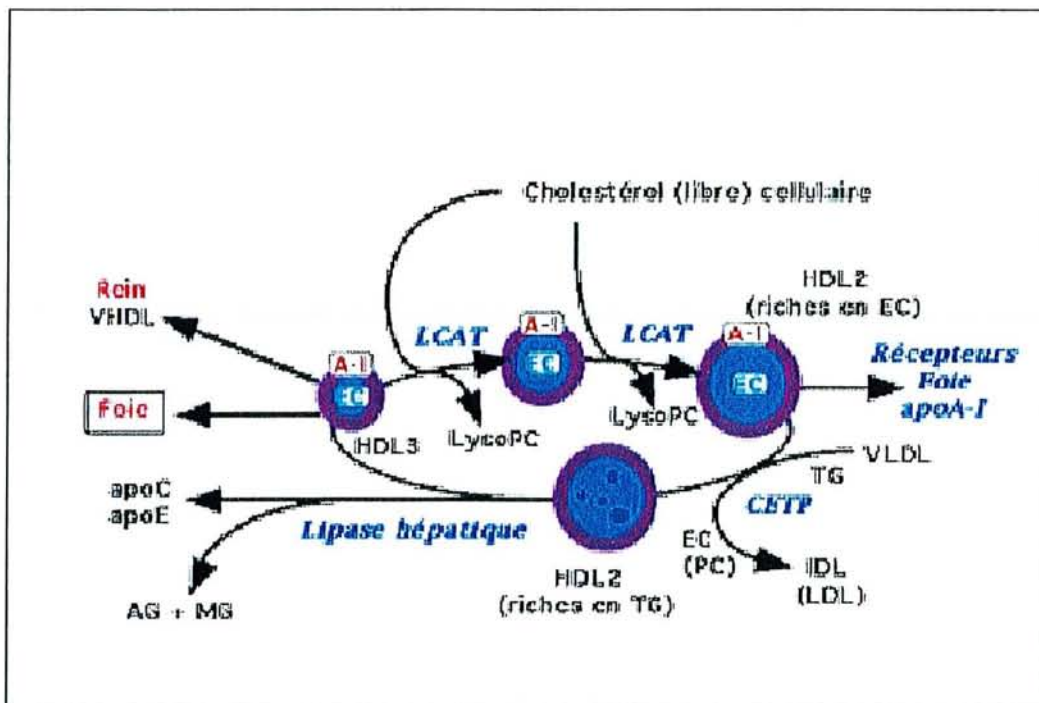


Figure 13: Métabolisme des HDL (II).

- Une fraction d'HDL2 peut se retransformer en HDL3 sous l'effet cumulé de deux étapes métaboliques.

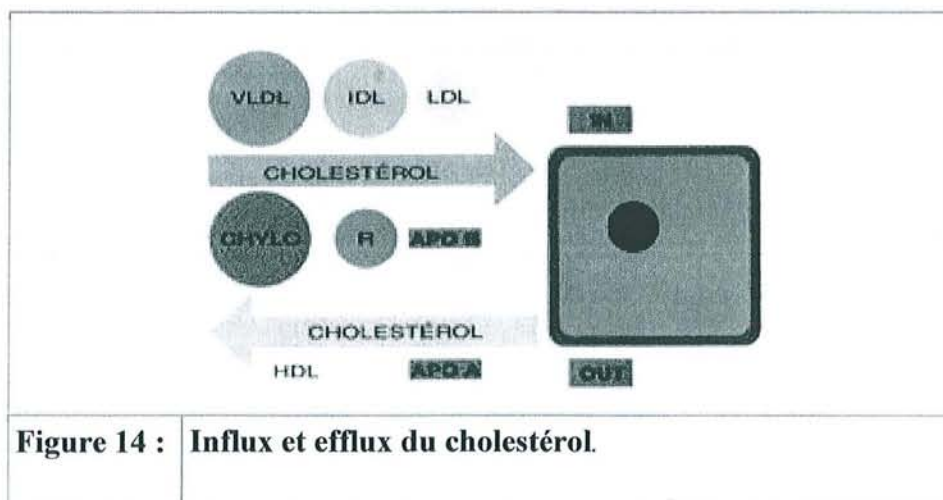
- 1) La première de ces étapes est réalisée par un groupe de protéines appelées *Cholesterol Ester Transfer Proteins* (CETP) qui effectue un échange des molécules d'esters de cholestérol

des HDL2, par des molécules de triglycérides venant de lipoprotéines riches en triglycérides, essentiellement des VLDL. Cette action a pour effet d'enrichir les HDL2 en triglycérides et les VLDL, en esters de cholestérol.

2) Dans une deuxième étape la lipase hépatique hydrolyse ces molécules de triglycérides et retransforme les HDL2 en HDL3, édifices de densité plus lourde et de diamètre plus petit.

Il faut noter que si ces transformations apparaissent cycliques, on manque encore de données sur l'importance de ce cycle, et s'il se situe de façon permanente ou accessoire en fonction des autres événements métaboliques des lipoprotéines, notamment ceux induits par les repas.

Il existe donc deux courants de cholestérol dans l'organisme: un courant d'influx cellulaire représenté par les chylomicrons, les VLDL, les IDL et les LDL, et un courant d'efflux ou de retour représenté par les HDL (figure 14). L'apoprotéine B, très abondante dans les LDL, est un marqueur du courant d'influx; l'apoprotéine AI, liée préférentiellement aux HDL, est un marqueur du courant de retour du cholestérol. On comprend que tout déséquilibre entre ces deux courants, au détriment du deuxième, s'accompagne d'une accumulation périphérique de cholestérol avec son corollaire artériel : l'athérosclérose.



C- ROLE DE L'INSULINE SUR LE METABOLISME DES LIPOPROTEINES

C.1.- INSULINE ET LIPOPROTEINES

L'insuline apparaît réduire la production des VLDL (diminution de la sécrétion d'apo B des VLDL dans les hépatocytes de rat (Jackson et al., 1990) et chez l'homme (Malmstrom et al., 1998), en diminuant le taux d'acides gras libres dans la circulation (substrats nécessaires à la formation des VLDL) et par un effet inhibiteur direct dans l'hépatocyte (Malmstrom et al., 1998).

Elle augmente l'activité de la lipoprotéine lipase (Fried et al., 1993), enzyme responsable du catabolisme des lipoprotéines riches en TG, chylomicrons, chylomicrons-remnants, VLDL et IDL.

L'insuline favorise également le catabolisme des LDL par augmentation de l'activité des LDL récepteur (Mazzone et al., 1984), et par augmentation du nombre de récepteurs aux LDL in vitro (Streicher et al., 1996).

Enfin, l'insuline intervient dans le métabolisme des HDL en activant la LCAT, enzyme responsable de l'estérification du cholestérol au sein des particules HDL. Par ailleurs, l'insuline paraît moduler l'activité de la lipase hépatique, enzyme en cause dans le catabolisme des HDL mais son rôle est encore discuté.

C.2- INSULINE ET PROTEINES DE TRANSFERT DES LIPIDES (PLTP)

L'insuline aurait un effet inhibiteur sur la PLTP et sur la CETP in vitro sur une lignée d'hépatocyte HepG2 (Kaser et al., 2001). Il a également été rapporté un effet activateur de l'insuline sur LCAT dans le métabolisme des HDL et un effet inhibiteur sur l'activité de la PLTP (Verges, 2001). Cependant, une augmentation de l'activité de la PLTP est observée chez les patients insulino-résistants (Riemens et al., 1998).

D- Conséquences de l'insulino-résistance sur le métabolisme des lipides: anomalies quantitatives et qualitatives de composition et de distribution des lipoprotéines plasmatiques.

D.1- LES ANOMALIES DU METABOLISME

Des anomalies du métabolisme des lipoprotéines ont été décrites dans l'insulino-résistance associée à l'obésité (Howard, 1999 ; Ginsberg et Huang, 2000). Ces anomalies se caractérisent par une hypertriglycéridémie, un cholestérol HDL bas, et une augmentation des petites et denses particules de LDL (Lamarche et al., 1999).

L'insulino-résistance périphérique est responsable d'une augmentation de la libération des acides gras par le tissu adipeux qui aboutit à une augmentation des VLDL par le foie. Les acides gras sont estérifiés en triglycérides. La présence de lipides facilite la production d'Apo B et donc la synthèse des VLDL. De plus, une augmentation de l'activité de la lipase hépatique, tout comme l'augmentation de l'activité de la lipoprotéine lipase plasmatique, a été associée à l'insulino-résistance (Despres et al., 1989). Les LDL et les HDL, anormalement riches en triglycérides seront des substrats pour la lipase hépatique, menant ainsi à la formation de particules LDL et HDL petites et denses.

La composition des particules riches en triglycérides est modifiée dans l'insulino-résistance, les VLDL étant augmentées en volume et plus riches en triglycérides (augmentation du rapport triglycérides/apoB).

Cette modification est concordante avec la diminution de la conversion des VLDL en LDL (ce qui expliquerait le taux normal de LDL) et de leur élimination directe. En effet, normalement ces « grosses » VLDL riches en triglycérides devraient être plus rapidement dégradées par la lipase, ce qui n'est donc pas le cas dans le syndrome métabolique. Cela peut être dû soit à des variations de composition des VLDL ou de la lipoprotéine lipase. De plus ces VLDL riches en triglycérides (dont l'hydrolyse est diminuée) vont stimuler l'activité de la CETP permettant l'échange des triglycérides avec des esters de cholestérol aboutissant à des VLDL dont le contenu en esters de cholestérol est augmenté donc plus athérogènes (Erkelens, 1998). La résultante de ces échanges est très délétère en termes de lipoprotéines, car l'échange du cholestérol et des triglycérides entre les VLDL et les HDL entraîne l'enrichissement des HDL en triglycérides et la diminution de leur efficacité pour le transport reverse du

cholestérol. De plus, la LCAT est incapable d'estérifier le cholestérol des HDL enrichis en TG (Skeggs et Morton, 2002). D'autre part l'échange du cholestérol entre les VLDL et les LDL et l'enrichissement des LDL en triglycérides (toujours par l'intermédiaire de l'action de la CETP) est responsable de la création de LDL petites et denses. L'enrichissement en TG des LDL est suffisant pour altérer l'incorporation et l'efflux du cholestérol (Skeggs et Morton, 2002).

La diminution du cholestérol HDL pourrait résulter aussi de plusieurs mécanismes physiopathologiques associés. Tout d'abord, le ralentissement du catabolisme des VLDL entraîne une diminution des particules HDL. Les HDL riches en triglycérides et pauvres en cholestérol sont ensuite hydrolysées au niveau hépatique par la lipase hépatique et leur apoprotéine A-I est éliminée par le rein. L'augmentation des activités CETP, sécrétée en partie par les adipocytes, et lipase hépatique au cours du diabète de type 2 pourrait rendre compte de la diminution du cholestérol HDL. Les androgènes stimulant l'activité de la lipase hépatique, ce dernier mécanisme serait particulièrement actif chez les hommes. L'action des lipases et l'augmentation de production des VLDL explique que la diminution des HDL dans le syndrome métabolique porte plus particulièrement sur la fraction HDL2, fraction la plus riche en cholestérol. L'ensemble des anomalies, augmentation des VLDL, HDL basses et augmentation des LDL denses est réversible sous fibrates (Bruckert et al., 1993). D'autres anomalies lipidiques ont été décrites mais leur importance dans le risque vasculaire reste à évaluer (Ginsberg et Huang, 2000).

Au total l'ensemble de ces modifications quantitatives mais aussi qualitatives est responsable d'un profil lipoprotéinique hautement athérogène avec des VLDL enrichies en ester de cholestérol, des LDL petites et denses qui sont préférentiellement internalisées par la voie *scavenger* des macrophages conduisant à une accumulation d'esters de cholestérol et de triglycérides et donc à la formation de cellules spumeuses. Celles-ci se forment d'autant plus facilement que les HDL chargées du transport reverse du cholestérol sont diminuées.

D.2- LES ANOMALIES DE COMPOSITION DES LIPOPROTEINES

D.2.1- Les phospholipides et les lipoprotéines

Quelques travaux mettent en évidence des anomalies au niveau des phospholipides des lipoprotéines. Une diminution de PE, PI+PS, et SM a été retrouvée dans les VLDL + LDL ainsi que dans les sous fractions HDL2 et HDL3 chez des patients hypertendus qui présentent fréquemment une baisse de la sensibilité à l'insuline (Bagdade et al., 1995). Une baisse significative des phospholipides totaux dans les HDL a également été rapportée chez des patients obèses non diabétiques mais insulino-résistants (Tilly-Kiesi et al., 1996). Cependant, chez des patients diabétiques de type II, il y a une augmentation de la SM et de la PC dans les HDL2 (Bagdade et al., 1990).

Les phospholipides des HDL (HDL PL) pourraient jouer un rôle particulièrement important dans l'efflux du cholestérol qui est en relation avec les sous classes de phospholipides dans les HDL, particulièrement la PC, SM et le rapport SM/PE (Fournier et al., 1997). Enfin, le taux de HDL PL semble lié au taux de triglycérides plasmatiques (Kahri et al., 1995), l'hypertriglycéridémie étant fréquemment associée à l'insulinorésistance dans le syndrome X.

D.2.2- Sphingomyéline et lipoprotéines

La SM est trouvée dans toutes les lipoprotéines (23% des phospholipides des VLDL, 25% des LDL et 13% des HDL) (Merrill et Jones, 1990). Les hépatocytes produisent des sphingolipides et les incorporent dans leurs membranes ainsi que dans les VLDL. La SM contenue dans les lipoprotéines affecte leur métabolisme. *In vitro*, la SM inhibe l'activité de la lipoprotéine-lipase. Elle diminue aussi l'affinité pour le récepteur à l'apolipoprotéine E. Ces deux effets entraînent un ralentissement de l'épuration des lipoprotéines (Saito et al., 2000).

En l'absence d'apolipoprotéine A-I, le traitement des fibroblastes par de la sphingomyélinase entraîne un flux de cholestérol à l'intérieur de la cellule et inhibe la synthèse de cholestérol endogène. En présence d'apoA-I, le traitement par la sphingomyélinase augmente préférentiellement l'incorporation de cholestérol dans les HDL (Ito et al., 2000), et donc le transport reverse. Cet effet est diminué par un excès membranaire de SM. Les régimes qui modifient les concentrations de cholestérol modifient aussi la SM. La pectine diminue la

cholestérolémie mais aussi la concentration de SM dans les VLDL chez le rat mais augmente la concentration de SM dans les HDL2 (Bladergroen et al., 1999). Une alimentation riche en cholestérol produit les effets exactement inverses.

E- INTERACTIONS LIPOPROTEINES-CELLULES : LE RECEPTEUR SR-BI ET LA PROTEINE ABCA-1

Les échanges de cholestérol et de phospholipides entre les lipoprotéines et les cellules peuvent s'effectuer par le biais d'un mécanisme d'endocytose, à la suite d'interactions avec des récepteurs en particulier le LDL récepteur. Toutefois, il existe d'autres processus indépendants de l'endocytose qui permettent l'influx du cholestérol et des phospholipides des lipoprotéines dans les cellules.

Par ailleurs, le transport reverse du cholestérol est l'un des principaux mécanismes de protection contre l'athérosclérose. Ce transport est associé à l'apoA-I et aux HDL qui récupèrent l'excès de cholestérol des tissus périphériques et le transportent vers le foie où il est dégradé sous forme d'acides biliaires (Glomset, 1968) (Figure 15).

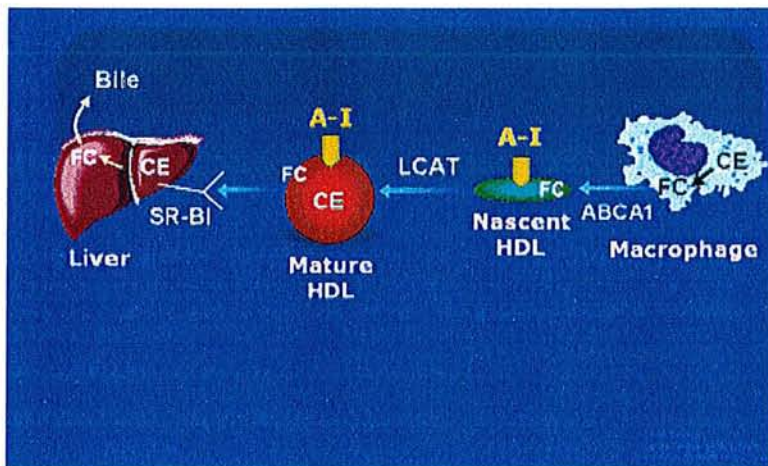


Figure 15: HDL et efflux de cholestérol.

Des efflux de phospholipides des cellules vers des accepteurs plasmatiques interviennent également.

Ces phénomènes d'influx et d'efflux de cholestérol et de phospholipides sont liés essentiellement à deux protéines: le « *scavenger* » récepteur BI (SR-BI) et l'« *ATP-binding cassette* » transporteur (ABCA-1). Essentiellement décrits dans les macrophages, ils sont également exprimés dans les lignées cellulaires d'adipocytes (Le Lay et al., 2001).

➤ **Le « *scavenger* » récepteur BI (SR-BI).**

Le SR-BI identifié chez la souris et le hamster, et l'homologue humain CLA-I, sont des « *scavenger* » récepteurs qui lient les lipoprotéines natives et modifiées (Calvo et al., 1998). Le SR-BI est considéré comme un HDL récepteur permettant la captation sélective du cholestérol estérifié et l'efflux du cholestérol (Ji et al., 1997).

Le SR-BI permet également l'incorporation de phospholipides (SM, PC et PE) à partir des LDL et des HDL. Les LDL faciliteraient le transfert de SM par rapport aux autres phospholipides, ces différences n'existant pas au niveau des HDL (Urban et al., 2000).

Le récepteur SR-BI a été identifié dans les cavéoles, microdomaines enrichis en stérol et sphingolipides où il se co-localise avec la cavéoline-1 (Babitt et al., 1997). La cavéoline-1 serait un régulateur négatif de la captation sélective du cholestérol estérifié par SR-BI (Matveev et al., 2001).

L'expression de SR-BI (et l'homologue humain CLA-I est augmentée par les agonistes du PPAR α et γ (Chinetti et al., 2000).

➤ **L'« *ATP-binding cassette* » transporteur (ABCA-1).**

La protéine ABCA-1 (*ATP-Binding Cassette* type A-1) (Langmann et al, 1999; Young et Fielding, 1999; Hayden et al., 2000 ; Wang et al., 2001) est une protéine transmembranaire impliquée dans l'efflux de cholestérol et de phospholipides des macrophages vers leur accepteur, l'apoA-I, en générant des HDL naissantes.

Des mutations dans le gène codant pour la protéine ABCA-1 sont à l'origine d'un dysfonctionnements du métabolisme des HDL, tels que:

- l'hypoalphalipoprotéinémie familiale (Hayden et al., 2000). C'est un désordre dominant se caractérisant par des taux de HDL bas (< 30 mg/dl) et des maladies cardio-vasculaires.
- la maladie de Tangier (Attie et al., 2001; Oram, 2002; Hayden et al., 2000): Cette dernière se caractérise par un désordre récessif rare dans lequel les patients ont un très faible taux plasmatiques des HDL. Ils présentent une accumulation d'ester de cholestérol dans les macrophages résidant dans différents tissus (comme le foie et la rate).

A l'inverse de SR-BI, la protéine ABCA-1 ne semble pas associée aux cavéoles (Mendez et al., 2001). Le gène ABCA-1 est régulé par les PPAR (Schmitz et Drobnik, 2002). En effet, les activateurs des PPAR α et γ induisent l'expression du gène de ABCA-1 (Hsueh et Law, 2001; Chinetti et al., 2000). Un agoniste du PPAR δ augmente l'expression de ABCA-1 (Oliver et al., 2001). Cependant, la régulation d'ABCA-1 par les PPAR γ semble indirecte. PPAR γ induit l'expression d'ABCA1 par l'intermédiaire d'une cascade transcriptionnelle liée au récepteur nucléaire LXR α (Chawla et al., 2001), (figure 16).

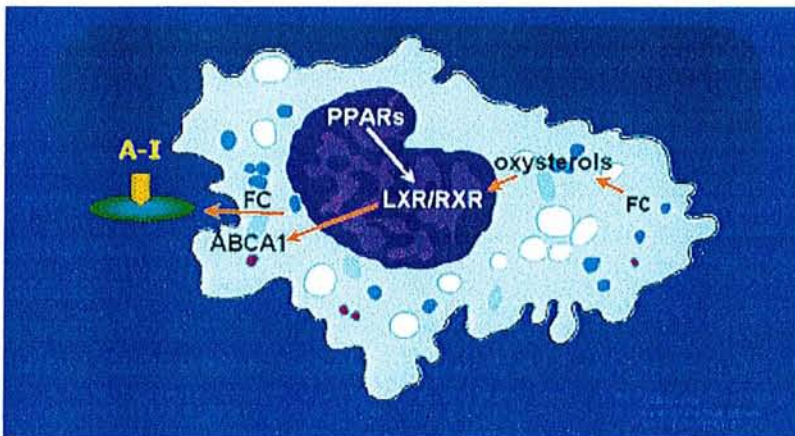


Figure 16: Régulation de l'efflux du cholestérol dans le macrophage.

L'ensemble de ces résultats met en évidence le rôle important des PPAR et du récepteur LXR α dans les premières étapes du transport reverse du cholestérol, par la régulation de l'expression et des fonctions d'ABCA-1 dans les macrophages humains, ce qui pourrait ainsi partiellement expliquer les effets anti-athérogéniques des fibrates et des glitazones.

CHAPITRE 2

Sujets et méthodes

I. SUJETS

A- SUJETS ETUDIÉS

Les adultes obèses ont été sélectionnés dans le service de Diabétologie, Maladies Métaboliques et Nutrition de l'hôpital Jeanne D'Arc de Toul (service du Professeur P. Drouin), **les enfants obèses** dans le service de Médecine Infantile III du professeur M. Vidailhet au CHU de Nancy, **les témoins adultes** par le centre d'Investigation Clinique INSERM-CHU de Nancy.

Tous les patients obèses ont été sélectionnés pour leur surcharge pondérale [Indice de masse corporelle (IMC) > 25 kg/m²].

1) Une première étude transversale de type cas témoins a inclus:

- 53 obèses femmes et 8 obèses hommes,
- 25 obèses enfants comprenant 19 obèses filles et 6 obèses garçons,
- 32 témoins dont 21 femmes et 11 hommes.

Cette étude fait partie du **programme GénOLor 1** (Gènes, Environnement, Obésité en Lorraine).

2) 24 femmes obèses et 21 femmes témoins ont été incluses dans une étude longitudinale comportant pour le groupe d'obèses une intervention nutritionnelle (GénOLor 2). Le groupe d'obèses a été étudié avant et après trois mois de régime hypocalorique. Chaque patients obèses s'est vu réduire son apport alimentaire de 600 Kcal (soit de 20 à 30 %) sans restriction concernant le choix alimentaire. Les glucides, lipides et protides représentent respectivement, 50, 30 et 20 % de l'apport énergétique.

3) 17 femmes obèses ont été étudiées avant et après un traitement médicamenteux (Orlistat) pendant 3 mois à raison de 120 mg 3 fois par jour. Ce traitement a été associé à un régime hypocalorique modéré (déficit de 500 kcal/j) comportant 30% des calories sous forme de lipides (10% d'acides gras saturés, 10% de monoinsaturés, 10% de polyinsaturés), 50% de

glucides, 20% de protéines. Les apports en cholestérol étaient limités à 300 mg/jour et la consommation d'alcool à 150 g/semaine..

4) 8 femmes obèses ont été incluses dans une étude comportant, outre les paramètres étudiées dans le cadre de cette thèse, une analyse de la lipémie postprandiale et une étude du tissu adipeux.

B- Critères d'inclusion

◆ Sujets en surpoids ou obèses:

-Hommes et Femmes non ménaupausées (à la phase folliculaire du cycle menstruel).

-Age des sujets: 18 à 55 ans.

-IMC compris entre 25 et 40 kg/m².

-Poids stable depuis trois mois.

-Patients motivés, acceptant d'observer rigoureusement les prescriptions diététiques hypocaloriques pendant 52 semaines et acceptant de prendre 3 repas par jour.

-Sédentarité.

◆ Sujets témoins:

-Même sexe et même tranche d'âge que les sujets obèses.

-Absence d'antécédents familiaux de diabète.

-IMC entre 19 et 25 kg/m².

◆ Enfants et adolescents obèses:

-Age: > 7ans et < 18 ans.

-Obésité: IMC supérieur au 97^{ième} centile de la distribution en fonction de l'âge dans la distribution française (Rolland Cachera, 1981).

C- Critères d'exclusion

-Obésité morbide: $IMC > 40 \text{ kg/m}^2$.

-Diabète non insulino-dépendant.

-Grossesse.

-Toute pathologie associée ou intercurrente, susceptible de modifier la sensibilité à l'insuline.

-Médicaments pouvant interférer avec le métabolisme glucido-lipidique (glucocorticoïdes, sulfamides, diurétiques thiazidiques, bêtabloquants, inhibiteurs de l'enzyme de conversion, traitement oestroprogestatif) et la fluidité membranaire (barbituriques, anesthésiques).

-Dyslipidémie primitive ou secondaire: hypertriglycéridémie ($TG > 3 \text{ g/L}$) et hypercholestérolémie ($CL > 2,5 \text{ g/L}$).

II METHODES

A- METHODES CLINIQUES

A.1- MESURES ANTHROPOMETRIQUES

-poids (kg),

-taille (m),

-calcul de l'indice de masse corporelle $IMC \text{ (kg/m}^2\text{)}$,

-circonférence au niveau de la taille (à mi-distance de l'épine iliaque antérosupérieure et la dernière côte) et des hanches,

-calcul du rapport taille/ hanches (RTH),

-diamètre sagittal de l'abdomen mesuré en position couchée.

Ces mesures sont effectuées par le même médecin du service des Maladies Métaboliques et de Nutrition du CHU de Nancy et permettent de définir la sévérité de l'obésité selon l'IMC et le morphotype (androïde: RTH > 0,85 ou génoïde < 0,85).

A.2- MESURE DE LA COMPOSITION CORPORELLE

C'est une technique directe permettant d'évaluer la composition corporelle (masse grasse, masse maigre, masse osseuse). L'appareil utilisée (DPX-L LUNAR-CONTRON, Strasbourg, France) est absorptiomètre biphotonique à rayon X (DEXA pour Dual Energy X-ray Absorbtiometry).

Le sujet est allongé sur la table d'examen en décubitus dorsal, les bras séparés du tronc. Le balayage corps entier est réalisé en 30 à 40 minutes environ, centimètre par centimètre. Le logiciel calcule la masse osseuse, la masse grasse et la masse maigre de chaque unité de surface étudiée (pixel) à partir de l'atténuation des 2 rayons X d'énergie différente (30 et 70 KeV). L'irradiation est inférieure à 3 millirem.

A.3- Z-SCORE

Le Z-score rend compte de la différence entre la mesure observée et la valeur médiane établie pour la population de référence. Cette différence est exprimée en prenant comme unité de mesure l'écart type de la distribution.

$Z\text{-score} = (\text{mesure} - \text{médiane}) / \text{écart type de la population de référence}$

La dispersion des valeurs de l'IMC en fonction de l'âge, de la naissance à 87 ans, a été établie en France par Rolland-Cachera et al., (1991), dans une population qui sert depuis de référence. L'intérêt du Z-score est de pouvoir évaluer l'important d'un excès ou d'un déficit de corpulence indépendamment de l'âge. En effet l'IMC varie en fonction de l'âge jusqu'à la fin de la croissance.

B- CLAMP EUGLYCEMIQUE HYPERINSULINEMIQUE

C'est une technique décrite par DeFronzo en 1979 permettant la quantification de la sensibilité à l'insuline.

B.1- PRINCIPE

La méthode repose sur la perfusion simultanée d'insuline et de glucose. L'insuline est perfusée à débit constant de façon à créer un hyperinsulinisme stable; le glucose est perfusé à débit variable afin de maintenir la glycémie constante. La quantité de glucose perfusée (M) reflète l'action de l'insuline (RIZZA, 1981).

En fait le glucose utilisé par les tissus correspond à la somme de la quantité de glucose perfusé et de la production hépatique de glucose (PHG). Pour les insulinémies élevées (> 100 mU/l), la production endogène est supprimée totalement. Pour des insulinémies inférieures, la détermination de l'utilisation du glucose nécessite l'emploi de traceurs du glucose pour mesurer la PHG. Cette technique permet de mesurer l'action de l'insuline pour différents niveaux d'insulinémie et ainsi de réaliser *in vivo* une courbe dose-réponse à l'action de l'insuline.

B.2- PROTOCOLE

Deux cathéters veineux sont mis en place: l'un pour la perfusion d'insuline et de glucose et l'autre, sur le bras opposé, pour les prélèvements sanguins destinés au dosage de la glycémie et de l'insulinémie.

L'insuline est perfusée pendant une période de 2 à 3 heures. Un plateau d'insulinémie voisin de 80 à 100 mU/l est obtenu pour un débit de 1 mU/kg/min d'insuline. Le débit de glucose perfusé pour maintenir la glycémie constante (4 à 10 mg/kg/min) peut être ajusté par un pancréas artificiel (type Biostator) ou de façon manuelle, par la mesure des glycémies capillaires toutes les 5 à 10 minutes et l'utilisation d'algorithmes plus ou moins compliqués. La quantité de glucose perfusé doit être stable au cours de la dernière demi-heure de perfusion d'insuline (notion de plateau).

L'insuline utilisée dans le protocole est une insuline d'action rapide (ACTRAPID®, laboratoires NOVO NORDISK Pharmaceutique, Boulogne Billancourt, France) à la concentration de 40 U/mL. La dilution dans la seringue était effectuée avec du sérum physiologique de telle façon que 1 ml de cette solution corresponde à 1,25 U d'insuline. La perfusion d'insuline était réalisée grâce à une seringue électrique GRASEBY (Laboratoires GRASEBY Medical).

La perfusion du glucose était assurée par une pompe IVAC (Laboratoires ABBOT, France) permettant de faire varier le débit de 0,1 ml/h. Le glucose était perfusé à la concentration de 20g/100 ml de solution (Laboratoires BRAUN Medical, Ludres, France). Du phosphate dipotassique était ajouté à la solution de glucose à raison de 2g dans 500 ml, afin d'éviter l'hypokaliémie, et l'hypophosphorémie potentiellement induite par l'augmentation de l'utilisation du glucose.

La surveillance glycémique était réalisée par un lecteur de glycémie de type ONE TOUCH II (Laboratoires LIFESCAN, Paris, France), dont la précision était régulièrement contrôlée par rapport à la méthode de référence.

B.3- PARAMETRES MESURES

La quantité de glucose perfusée (M) exprimée en mg/kg/mn, est déterminée pendant la dernière demi-heure pour le débit de perfusion d'insuline. Les patientes sont considérées insulino-résistantes pour des valeurs de $M < 8$ mg/kg/mn. Une courbe dose-réponse à l'insuline de la quantité de glucose perfusée peut être réalisée et déterminer ainsi l'action maximale de l'insuline (K 0,5), reflet de la sensibilité à l'insuline. L'interprétation des résultats est donc directe et ne nécessite pas l'emploi d'un traitement mathématique complexe.

C- ETUDE DE LA LIPEMIE POST-PRANDIALE

C.1- REPAS TEST ET CHARGE LIPIDIQUE DE 80 G DE LIPIDES

Les sujets reçoivent la veille au soir (19h30) un repas standardisé apportant 840 Kcal avec une répartition des nutriments: protéides: 18,7 %, lipides 34,2 %, glucides 47 % de l'apport énergétique.

Le lendemain à près 10 heures de jeûne, les sujets absorbent le repas test qui contient pour 100 ml: 22 g de chocolat, 23,75 g d'huile d'arachide, 19,25 g de beurre, 3,5 g de lait écrémé et 30,25 g d'eau. Les quantités étant ajustées pour un volume total de 200 ml. Ce repas se présente sous forme d'une émulsion semi-liquide et représente un apport calorique de 890 Kcal dont 80 % de lipides (soit 80 g), 13 % de glucides et 2 % de protéides.

C.2- TRAITEMENT DES TUBES DE SANG

Immédiatement après le prélèvement, le plasma est isolé après centrifugation du sang à 3500 trs/min pendant 10 min à 15 °C puis traité par un cocktail de conservateurs afin de limiter la peroxydation des lipoprotéines et les prolifération bactériennes et d'inhiber les protéases.

Les concentrations plasmatiques des conservateurs sont les suivantes:

- PMSF: 1 mmol/L
- Azide de sodium: 0,026 g/ml
- Aprotinine: 1,4 µg/ml
- Benzamidine: 0,3 µg/ml
- Gentamycine: 0,05 g/L
- Cloramphénicol: 0,02 g/L

D- PRELEVEMENTS SANGUINS

✕ Prélèvement sanguins pour l'étude transversale et longitudinale (à jeun):

Les érythrocytes seront obtenus par prélèvement sanguin effectués sur EDTA le matin à jeun.

✕ Prélèvement sanguins pour l'étude de la lipémie en postprandiale:

Les prélèvement sanguins sont effectués après mise en place d'un cathéter dans une veine anté-brachiale à T0, T4 et T10 heures sur tube EDTA (2 tubes de 7 ml pour chaque temps) pour l'étude des lipoprotéines.

Un prélèvement sanguin est réalisé sur tube hépariné à T0 pour l'étude de la composition membranaire des globules rouges.

E- BIOPSIE DU TISSUS ADIPEUX

Le prélèvement de tissu adipeux a été effectué par biopsie chirurgicale classique dans la région abdominale sous cutanée, sous anesthésie locale. Cette biopsie a permis d'obtenir des prélèvement de 5 à 10 grammes pour chaque patient. Immédiatement après son prélèvement, le tissu adipeux est mis dans l'azote liquide, transporté au laboratoire où il est conservée à -80 °C.

F- PARAMETRES METABOLIQUES ET LIPIDIQUES

L'insulinémie a été dosée à jeun par méthode radioimmunologique (coffret IMX, Laboratoire Abbott, Tokyo, Japon).

La glycémie a été dosée à jeun par méthode enzymatique utilisant la glucose oxydase (Beckman BGA II Glucose Analyser, Beckman Instruments Inc, Fullerton, CA, USA).

Le "Homeostasis model assessment" (**HOMA**) permet d'évaluer la résistance à l'insuline à l'aide d'un modèle mathématique décrit par Matthews, (1995), à partir de 2 dosages

d'insulinémie et de glycémie à jeun à 5 minutes d'intervalle. La valeur du HOMA est donnée par la formule: [Insulinémie à jeun (mU/l) x glycémie (mmo/l)] / 22,5

Dans le cas de l'étude de la lipémie post prandiale, les valeurs de l'aire sous la courbe (AUC) de l'évolution des paramètres lipidiques plasmatiques en fonction du temps ont été déterminées.

La cholestérolémie et la triglycéridémie ont été dosées par méthode enzymatique (coffret Boehringer, Mannheim, Allemagne).

Le cholestérol des HDL a été dosé par méthode enzymatique après précipitation sélective des VLDL et des LDL par l'acide phosphotungstique.

Le cholestérol des LDL a été calculé grâce à l'utilisation de la formule de Friedewald: Cholestérol LDL = Cholestérol total - (Cholestérol HDL + Triglycérides /5 (g/l)).

Ces dosages ont été réalisés au Laboratoire de Biochimie du Pr J.L. Guéant, CHU Nancy.

La leptine a été dosé par méthode radioimmunologique (LINCO Research Inc., Clinisciences, Montrouge, France). Ce dosage a été réalisé au laboratoire du Dr L. Mejean (INPL, Nancy).

G- ISOLEMENT DES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES PAR ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT DISCONTINU DE KBR (effectué au Laboratoire de Biochimie du Pr J.L. Guéant, CHU Nancy)

La séparation est obtenue par ultracentrifugation en gradient discontinu de bromure de potassium selon la méthode décrite par Redgrave, 1975.

Les échantillons de plasma sont tout d'abord ajustés à une densité de 1,21 par addition de KBr solide (0,325 g/ml de plasma). Des aliquots de 4 ml sont alors placés dans des tubes à ultracentrifugation en nitrate de cellulose (13,5 ml, Ultra-Clear centrifuge tube, Beckman).

Le gradient discontinu est réalisé en plaçant successivement au dessus du plasma:

3 ml d'une solution de KBr d'une densité de 1,063,

3 ml d'une solution de KBr d'une densité de 1,019

et 3 ml d'une solution de NaCl d'une densité de 1,000 (eau physiologique).

Chaque solution contient de l'EDTA (0,1 g/l) et 0,02 g/l d'azide de sodium.

Les tubes sont ensuite centrifugés grâce à une ultracentrifugeuse (Beckmann, XL-80) équipée d'un rotor SW 41 TI, pendant 24 heures à 40000 tours par minutes. Une seule centrifugation permet d'obtenir les classes majeurs des lipoprotéines:

- lipoprotéines riches en triglycérides LRT: Chylomicrons + VLDL ($d < 1,006$),
- IDL ($1,006 < d < 1,019$)
- LDL ($1,019 < d < 1,063$)
- HDL ($1,063 < d < 1,025$).

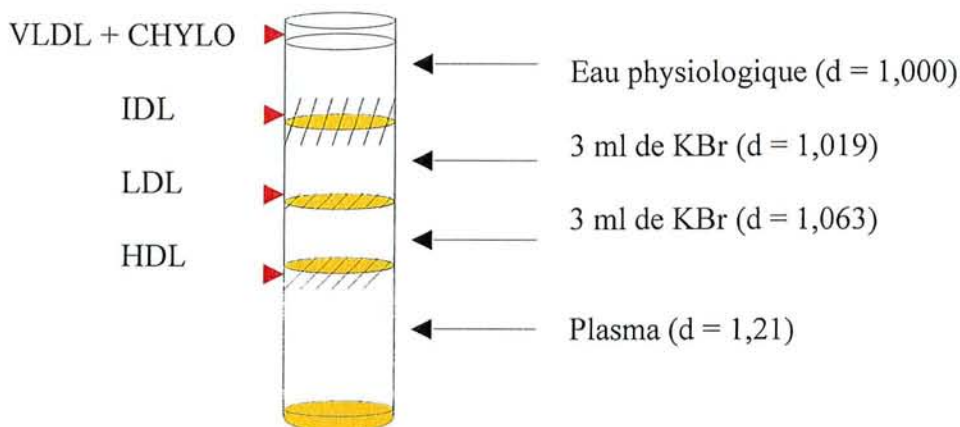


Figure 17: Les classe majeurs des lipoprotéines après ultracentrifugation.

Dans chaque classe de lipoprotéines à l'exception des IDL, a été déterminée la quantité de cholestérol total, de triglycérides, de phospholipides totaux. La PC et la SM. ont également été déterminées dans les HDL.

Ces dosages ont été effectués dans le laboratoire du **Pr J.L. Paul (Laboratoire de Biochimie Cardio-vasculaire, Hôpital Georges Pompidou, Paris)**.

H- ISOLEMENT DES MEMBRANES CELLULAIRES

H-1 MEMBRANES D'HEMATIES

H.1-1 Tampons

-NaCl (0,9%) dont le pH est compris entre 7,2 et 7,4: celui-ci est ajusté à l'aide d'une solution de NaHCO_3 , 0,145 M.

-Tampon d'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). Le pH de ce tampon doit être compris entre 7,2 et 7,4: celui-ci est ajusté à l'aide d'une solution de HCl 10 N.

H.1-2 Isolement des membranes

L'échantillon de sang (6 mL) est transvasé dans un tube à fond conique de 15 mL et centrifugé à 120 g (1200 rpm) pendant 15 minutes à 4°C. Le plasma est éliminé.

Le culot, redissous dans du NaCl, est transvasé dans un tube à centrifugation à fond conique de 50 mL, lavé 2 fois à 520 g (2000 rpm), pendant 10 minutes, à 4°C, dans une solution de NaCl à 0,9% (volume final de 30 mL). Le surnageant est éliminé par aspiration à l'aide d'une trompe à vide. Ces lavages vont permettre d'éliminer le plasma résiduel ainsi que les éléments figurés du sang tels que les leucocytes afin de ne récupérer que le culot d'hématies.

Le culot d'hématies est ensuite resuspendu dans 40 mL de tampon hémolyse. Il est maintenu sous agitation (Rotator: 50 tours/min), à 4°C, pendant 30 minutes. L'échantillon est centrifugé à 20000g (12000 rpm) pendant 15 minutes, à 4°C, (Rotor JA-17, centrifugeuse J 21, Beckman, Palo Alto, Ca, USA).

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 resuspendu dans 40 mL de tampon hémolyse. L'opération est répétée 4 à 5 fois jusqu'à obtention d'un culot de membranes parfaitement blanc. Celui-ci sera ensuite désagrégé à l'aide d'une seringue (gauge 25 ou 26), dans un tube à fond conique, 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.

H-2 MEMBRANES D'ADIPOCYTES

La préparation des membranes adipocytaires a été adaptée à partir de la méthode décrite par Mc Keel et Jarett (1970).

H.2-1 Préparation des Tampons:

- Tampon d'Homogénéisation:
 - 20 mM d'Hepes
 - 255 mM saccharose
 - 1 mM EDTA
 - 5 µg/ml Leupeptine
 - 5 µg/ml Pepstatine
 - 5 µg/ml Aprotinine
 - pH 7,4

- Tampon saccharose; saccharose 41 % (p/v) dans le tampon d'Homogénéisation.

- Tampon Tris:
 - 1 mM Tris
 - 1 mM EDTA
 - 10 mM NaCl

Le pH de ce tampon doit être compris entre 7,2 et 7,4.

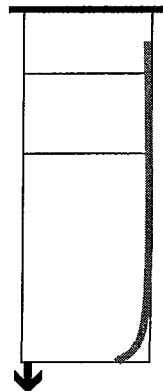
H.2-2 Isolement des membranes

La préparation des membranes d'adipocytes est réalisée selon le schéma suivant ci dessous:

Broyage du prélèvement au polytron PT-10 dans du tampon d'homogénéisation à 4 °C



Lavage à 1600 tr/min (500g) pendant 10 min à 4 °C



Fat cake

Surnageant

Tissus conjonctif
Globules rouges



Récupération du surnageant avec une seringue et centrifugation pendant 2 h à 37000 tr/min (150000g max) (Ultracentrifugeuse KONTRON (TGA 65), rotor TFT 6538)



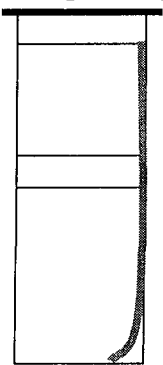
Resuspension du culot (membranes totales) dans 1,2 ml de tampon saccharose à 41 % (P/V)



Centrifugation à 27000 tr/min pendant 1 h à 4 °C (95000g max; rotor TFT 45.6)



Récupération des membranes plasmiques à l'interface



→ Membranes plasmiques



Lavage dans dans du tampon d'homogénéisation à 44000 tr/min pendant 20 min à 4 °C (200000g max; rotor TFT 6538)



Récupération du culot et resuspension dans du tampon TRIS

Conservation à - 80 °C après détermination des protéines

Figure 18: Préparation des membranes d'adipocytes.

H.3- DOSAGE DES PROTEINES MEMBRANAIRES: (LOWRY, 1951).

H.3.1- Réactifs

1- Solution alcaline de tartrate:

Na ₂ CO ₃	188,70 mM (20 g/l), (Merck réf: 6392)
Tartrate de sodium et de potassium	1,70 mM (0,480 g/l), (Prolabo réf: 27068.23)
NaOH	0,10 M (4 g/l), (Prolabo réf: 28252.293)
QSP	1000 mL

2- Solution cuivrique:

CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,5% (Merck réf: 2790.0250)
---------------------------------------	-----------------------------

3- Solution cuivrique alcaline (préparée extemporanément):

Solution alcaline de tartrate	25 mL
Solution cuivrique	0,5 mL

4- Folin (Prolabo réf: 31360.264)

H.3.2- Protocole de dosage

1) Formation d'un complexe cuivrique en milieu alcalin:

10 mL de solution cuivrique alcaline (préparée extemporanément) sont ajoutés à 1 mL de suspension membranaire (dilué préalablement au 1/3 dans du tampon homogénat), et à 1 mL de tampon hémolyse (pour le blanc).

2) Oxydation du complexe par le réactif de Folin:

Après 15 minutes d'incubation à l'obscurité, 1 mL de réactif de Folin, dilué préalablement au 1/4 dans de l'eau distillée, est ajouté au mélange.

Après une incubation de 15 minutes à l'obscurité, une lecture d'absorbance est effectuée à 750 nm sur un spectrophotomètre UV visible (UV-160, Shimadzu, Kyoto, Japon).

La quantité de protéines est estimée à l'aide d'une courbe étalon réalisée avec de l'albumine bovine.

I- DETERMINATION DE LA FLUIDITE MEMBRANAIRE PAR POLARISATION DE FLUORESCENCE

I.1- PRINCIPE

Le concept de mouvement et de rotation moléculaire est à la base de la polarisation de fluorescence. Dans le cas de sondes fluorescentes incorporées dans une structure membranaire, la polarisation de fluorescence consiste en une analyse de la faculté de rotation de ces sondes et permet une approche de la notion de fluidité membranaire.

Excités par une lumière polarisée verticalement, l'absorption par des fluorochromes sera:

- maximale lorsque la direction du champ 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 θ .

Certaines molécules, celles qui se trouvent avoir la bonne orientation, sont donc excitées préférentiellement. La fluorescence est émise préférentiellement dans la direction du moment de transition d'émission 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 même dans un échantillon en solution où les molécules sont orientées au hasard et que la polarisation ne peut être que partielle.

Si Ox est la direction de polarisation de la lumière incidente, la fluorescence émise a une composante d'intensité I verticale ou I parallèle ($I_{||}$) le long de Ox et des composantes d'intensité I horizontale ou I perpendiculaire (I_{\perp}) le long des directions orthogonales Oy et Oz. L'intensité de la fluorescence totale est la somme des composantes polarisées dans les trois directions, soit $I = I_{||} + 2I_{\perp}$

On définit l'anisotropie de fluorescence comme étant:

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}$$

En tenant compte que la probabilité d'excitation pour un fluorochrome est proportionnelle à $\cos^2\theta$, le calcul démontre que la valeur la plus élevée que l'on puisse obtenir de r est 0,4 dans le cas de molécules orientées au hasard et si les moments de transition d'absorption et d'émission sont parallèles. L'anisotropie est plus faible si les deux moments de transition (caractéristiques de la molécule) ne sont pas colinéaires, et si le fluorochrome a le temps de tourner sur lui même avant d'émettre sa fluorescence.

Or le temps moyen qui s'écoule entre l'absorption et l'émission est t_f , le temps de déclin de fluorescence. Les fluorochromes dans un certain environnement défini sont caractérisés par un temps de corrélation de rotation t_c , temps moyen que mettent les molécules pour tourner d'un radian.

Dans le cas où les temps de corrélation de rotation d'un fluorochrome dans un certain environnement et le temps de déclin de fluorescence seront de l'ordre de 10 nanosecondes, ces fluorochromes pourront être utilisés pour approcher la fluidité membranaire. Incorporées dans une structure membranaire, les sondes fluorescentes auront avant d'émettre leur fluorescence une faculté de rotation plus ou moins importante qui va dépendre de la cohésion (rigidité) de leur environnement. Plus l'environnement sera fluide, plus les sondes auront une faculté de rotation importante 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 de la fluorescence est donc en relation inverse avec la fluidité membranaire.

I.2- SONDES FLUORESCENTES

Deux sondes fluorescentes polyéniques ont été utilisées (Figure 18)

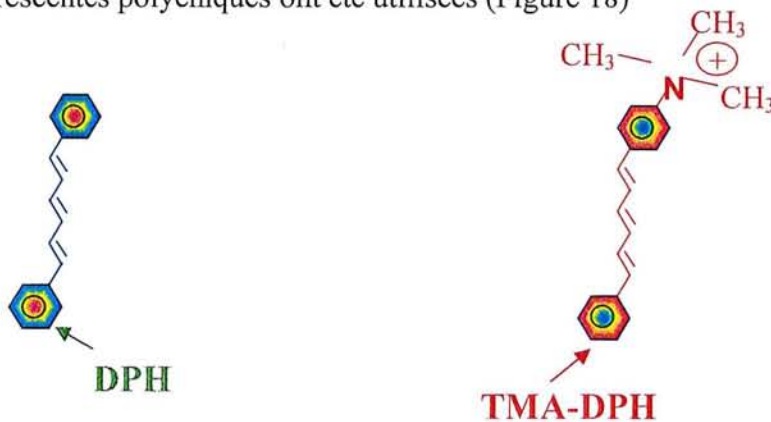


Figure 19: Représentation des sondes polyéniques, le DPH et le TMA-DPH.

1,6 diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH)

Le DPH est une molécule apolaire en forme de bâtonnet qui est soluble et fluoresce avec un rendement quantique élevé dans des milieux hydrophobes. Il s'incorpore facilement dans les membranes, parallèlement aux chaînes acyles et au niveau des régions profondes de la couche lipidique.

1-[4-(Triméthylamino)phényl]-6-phényl-1,3,5-hexatriène (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 ammonium chargé positivement, la partie DPH de la molécule étant intercalée dans les régions supérieures des chaînes acyles. Les propriétés photophysiques du TMA-DPH sont similaires à celles du DPH.

Les mouvements de ces deux sondes sont plus ou moins entravés par la cohésion de l'environnement lipidique dans lequel elles se trouvent. Par conséquent, l'anisotropie de la fluorescence émise par le DPH et le TMA-DPH donne une information sur la fluidité des régions lipidiques qui sont dans leur environnement immédiat.

En vue de l'incorporation dans des membranes d'hématies ou d'adipocytes, le DPH (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) et le TMA-DPH (Molecular Probes, Eugene City, Oregon, USA) sont dissous respectivement dans du tétrahydrofurane et du N-N-diméthylformamide à la concentration de $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$. Les solutions sont stockées dans l'obscurité à 4°C .

I.3- MARQUAGE DES MEMBRANES

La concentration en protéines des suspensions membranaires est ajustée à $50 \mu\text{g/ml}$. Pour le marquage, $1,5 \mu\text{l}$ de marqueur sont ajoutés à 3ml de suspension membranaires (dilution finale de la sonde : 10^{-6}M). L'incorporation des sondes dans les membranes est effectuée à l'obscurité pendant 15 minutes pour le TMA-DPH et 30 minutes pour le DPH. Parallèlement, un échantillon « blanc » est réalisé sans apport de sonde fluorescentes.

I.4- DETERMINATION DE L'ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE

Les mesures sont effectuées avec un appareil de polarisation de fluorescence en excitation continue (Fluofluidimètre, Régulest, Florange, France). L'appareil est basé sur un format en T pour l'émission. La longueur d'onde d'excitation est sélectionnée par un filtre interférentiel à 365 nm. L'émission est mesurée à travers un filtre à bande passante centré sur 420 nm. Les composantes $I_{b||}$ et $I_{b\perp}$ du blanc sont mesurées simultanément à travers des polariseurs parallèles ou perpendiculaires à la direction de polarisation du polariseur d'excitation suivi de la mesure des composantes $I_{f||}$ et $I_{f\perp}$ de l'échantillon marqué. L'anisotropie de fluorescence en excitation continue $\langle r \rangle$ est déterminée à partir de la relation suivante:

$$\langle r \rangle = \frac{[(I_{f||} - I_{b||}) - G(I_{f\perp} - I_{b\perp})]}{(I_{f||} - I_{b||}) + 2G(I_{f\perp} - I_{b\perp})}$$

où G est un facteur qui corrige pour les inégalités du format en T.

J- EXTRACTION DES LIPIDES MEMBRANAIRES (ROSE ET OKLANDER, 1965)

J.1- PRINCIPE

L'extraction des lipides des membranes est effectuée selon la méthode **Rose et Oklander, 1965**. Le principe de la méthode est basé sur la combinaison d'un solvant polaire, le méthanol, déstabilisant les liaisons hydrogènes, et d'un solvant non polaire, le chloroforme, entraînant les lipides membranaires.

J.2- REACTIFS

Méthanol: Prolabo, réf: 20865.297.

Chloroforme: Prolabo, réf: 22716.321.

BHT: Sigma, réf: B-1378.

J.3- PROTOCOLE DE DOSAGE

L'échantillon de membranes conservé à -80°C est décongelé dans un bain marie et immédiatement resuspendu en vortexant.

500 μg de suspension membranaire sont ajoutés, à 11 ml de méthanol dans un tube en verre "corex" de 50 ml. Le tube est alors fermé hermétiquement.

Le mélange est ensuite agité latéralement en position verticale pendant 1 heure et à température ambiante, avant d'ajouter, sous une hotte, 7 ml de chloroforme. Pour éviter toute évaporation, le tube est à nouveau fermé hermétiquement.

Après une nouvelle agitation d'une heure, les extraits sont filtrés sur un filtre hydrophobe (Whatman 1 ps) dans un nouveau tube en verre "corex". L'étape de filtration permet d'éliminer les débris membranaires dénaturés par les solvants.

Les extraits lipidiques sont ensuite évaporés à 37°C sous un flux d'azote jusqu'à l'obtention d'un résidu sec.

Dans le cas où le résidu sec est destiné au dosage des phospholipides, 100 μg d'étalon interne, L- α -lysophosphatidylcholine, (solution étalon à 1 mg/mL) sont ajoutés aux 500 μg de suspension membranaire et les lipides sont extraits. Le résidu sec est resuspendu dans 2,5 ml de chloroforme dans un cryotube de 5 ml. 0,75 mL sont prélevés dans un cryotube de 5 mL pour le dosage du cholestérol et le restant est destiné au dosage des phospholipides: ces deux tubes sont conservés à -20°C .

Dans le cas où le résidu sec est destiné au dosage des acides gras, 50 μg d'étalon interne, l'acide L- α -phosphatidylcholinediheptadécanoyle C17:0 (en solution à 1 mg/ml dans de l'hexane) sont ajoutés aux 500 μg de suspension membranaire préalablement. Ce résidu sec est resuspendu dans 2,5 ml d'une solution antioxydante de butyl hydroxytoluène (BHT) diluée dans du chloroforme (0,05 mg/ml de chloroforme) et conservé à -20°C .

K- DOSAGE DU CHOLESTEROL MEMBRANAIRE

K.1- PRINCIPE

La détermination du taux de cholestérol membranaire est faite selon la méthode décrite par Zlatkis et Zak (1969) utilisant l'ophtaldéhyde. Elle repose sur la réaction du cholestérol avec les aldéhydes aromatiques donnant lieu à une coloration rose stable mesurable par spectrophotométrie. L'ophtaldéhyde réagit spécifiquement avec le cholestérol, et cette méthode permet d'éviter les interférences dues aux autres stérols existant dans la membrane.

K.2- REACTIFS

*Acide acétique glacial,

*ophtaldéhyde (OPT): solution d'OPT (Sigma, Saint-Quentin Fallarner, France), préparée extemporanément à raison de 0,5 mg/mL d'acide acétique,

*acide sulfurique.

K-3 PROTOCOLE DE DOSAGE

A 250 μ L de suspension chloroformique (extrait lipidique, blanc et gamme étalon), sont ajoutés 2 mL de la solution d'OPT. Après une agitation vigoureuse au vortex et une incubation de 15 minutes à l'obscurité à température ambiante, 1 mL d'acide sulfurique est ajouté. Le mélange obtenu est vigoureusement homogénéisé jusqu'à obtention d'une coloration rose stable. Les absorbances sont lues à 560 nm après une incubation de 15 minutes à l'obscurité et à température ambiante.

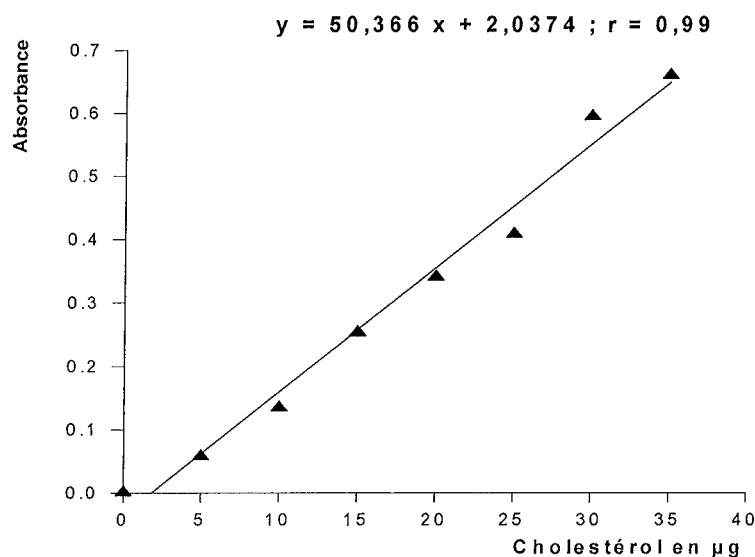


Figure 20: Courbe d'étalonnage du cholestérol.

L- DETERMINATION DES CLASSES DE PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

L.1- PRINCIPE

Les phospholipides membranaires sont analysés par CLHP. Cette technique permet la séparation d'un mélange d'espèces chimiques variables. En CLHP, la phase mobile liquide et la phase stationnaire solide sont confinées dans un même espace. Le débit de la phase mobile peut être contrôlé et la pression générée. L'échantillon élué de la colonne est directement détecté par un système branché en série qui permet une quantification directe.

Le système chromatographique est constitué:

- d'une pompe permettant de délivrer un flux de solvant uniforme,
- d'une boucle d'injection dans laquelle est introduit l'échantillon,
- d'une colonne permettant la séparation,
- d'un détecteur,
- et d'un système d'acquisition et de traitement des données.

L.2- APPAREILLAGE

La séparation des phospholipides a été effectuée avec un système HPLC Gold, (Beckmann, Palo Alto, Ca, USA), équipé de plusieurs modules:

- un module 126 équipé de deux pompes A et B,
- et un module d'interface permettant la compatibilité avec le détecteur à diffusion de lumière.

Le détecteur à diffusion de lumière utilisé est un modèle SEDEX 55 (SEDERE, France).

Tous ces modules sont programmables. Le système Gold est relié à un moniteur IBM équipé d'un logiciel d'analyse Gold. Le détecteur utilisé est un modèle SEDEX 55 (SEDERE, France). Les séparations ont été effectuées en phase normale sur une colonne en gel de silice contenant des particules de 5 μm de diamètre (Lichrosorb® Si 60, 5 μm , 4 x 250 mm, Merck, Darmstadt, Allemagne).

L.3- REACTIFS

Méthanol: Prolabo, réf 20865.297

Chloroforme: Prolabo, réf 22716.321

Ammoniaque: Prolabo, réf 21188.29

La calibration du détecteur est effectuée avec des concentrations différentes de lipides standards (Sigma, Saint Louis, MO, USA) se situant dans le domaine de linéarité du détecteur:

L- α - Phosphatidyléthanolamine réf: P 7523

L- α - Phosphatidylinositol réf: P 2517

L- α - Phosphatidyl-L-Sérine réf: P 8518

L- α - Lecithine/ sphingomyeline réf: LS 20

L- α - Lysophosphatidylcholine réf: L 4129

La lysophosphatidylcholine représente le standard interne.

Les standards lipidiques sont conservés dans du chloroforme.

L.4- PROTOCOLE

Après extraction, différentes injections sont effectuées: une première injection correspondant à 100 μ g de protéines permettra de quantifier les phospholipides phosphatidylinositol, phosphatidyl-L-sérine, phosphatidylcholine, sphingomyéline, une seconde, correspondant à 40 μ g de protéines permettra de quantifier la phosphatidyléthanolamine. Les volumes d'injection sont de 100 μ L.

Le protocole de séparation est dérivé de la méthode décrite par Stolywo (Stolywo et Martin, 1987) utilisant comme phase A 100 % de chloroforme et comme phase B un mélange de méthanol, eau, ammoniacque et chloroforme (92: 5: 2: 1, v/v). Tous les solvants sont filtrés sur filtre 0,45 μ m avant utilisation. Le profil du gradient est défini de la façon suivante: t= 0 min, B= 0 %; t= 10 min, B= 20 %; t= 20 min, B= 100 % avec un débit de 1,5 ml/min. La température de nébulisation du solvant et des particules séparées est fixée à 50°C et la pression d'air à 2 bar.

Les calibrations de l'appareil sont régulièrement effectuées.

L.5- PROFIL DE SEPARATION DES CLASSE MAJEURS DE PHOSPHOLIPIDES

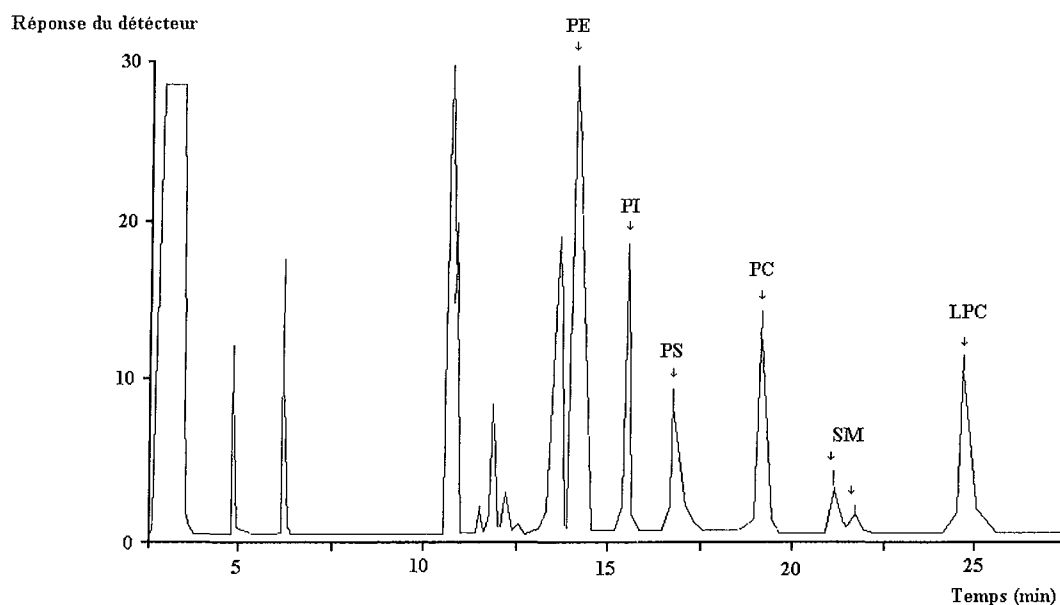


Figure 21: Profil de séparation par CLHP des classes majeurs de phospholipides

M- DETERMINATION DES ACIDES GRAS MEMBRANAIRES PAR CPG

M.1- METHYLATION DES ACIDES GRAS

L'analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG) nécessite leur méthylation préalable (Morisson et Smith, 1964). La méthylation (fixation d'un groupement méthyl $-CH_3$ sur la partie carboxylique des acides gras), a pour but de former des molécules apolaires et d'éviter ainsi leur réactivité avec la phase stationnaire de la colonne chromatographique. D'autre part, elle permet de rendre les acides gras plus volatils, condition nécessaire pour l'analyse en CPG. Pour cela, on transforme les acides gras des lipides analysés en esters méthyliques en utilisant le trifluorure de bore (BF_3 à 14 % dans le méthanol).

L'extrait lipidique dans le chloroforme est transvasé dans un tube en pyrex et évaporé sous flux d'azote jusqu'à obtenir un résidu sec.

On ajoute 1 ml de BF_3 à 14 % dans le méthanol (Sigma, réf: B-1252) et on laisse incubé pendant 2 h à $100^\circ C$.

Après refroidissement, on ajoute 2 ml de pentane et 1 ml d'eau bidistillée, après 20 sec d'agitation au vortex, on récupère la phase supérieure pentanique dans une fiole de Chromacol: la phase pentanique (apolaire) contient les esters méthyliques d'acides gras, la phase hydroalcoolique contient tous les composés polaires (ex: le glycérol et la partie non acides gras des phospholipides: choline, éthanolamine, inositol, et sérine. Le pentane évite l'oxydation des acides gras. Les fioles sont stockées à $-20^\circ C$.

Au moment de l'analyse de l'échantillon à la CPG, le pentane est évaporé sous flux d'azote, et les acides gras sont repris dans 20 μL d'hexane. 1 μL de cet essai est injecté dans la CPG à l'aide d'une seringue hamilton.

M.2- SEPARATION DES ACIDES GRAS METHYLES PAR CPG

M.2.1- Principe

Les molécules sont évaporées et véhiculées par un gaz vecteur inerte et chaud et passent à travers une longue colonne capillaire de quartz dont la matrice (polymère synthétique) est la phase stationnaire (liquide à température de travail). Différents types de groupements plus ou moins polaires sont greffés sur cette matrice et c'est en fonction de cette polarité que les molécules du mélange à analyser sont éluées dans la colonne à des vitesses différentes.

Ces vitesses sont conditionnées par le coefficient de répartition entre la phase gazeuse et la phase stationnaire: ainsi les molécules sortent donc de la colonne après différents temps de rétention. Leur présence dans le gaz effluent est détectée par des moyens chimiques ou physiques et la réponse du détecteur est quantifiée et retranscrite par un intégrateur-enregistreur.

M.2.2- Les éléments constituant la CPG

Le gaz vecteur est la phase mobile. La pression de sortie du gaz est réglée à 2,4 bars. Des gaz différents (hélium, argon; mélange d'hydrogène et d'azote) peuvent être utilisés. La qualité requise pour ces gaz est le degré de pureté le plus élevé, de façon à ce qu'aucune trace contaminante ne soit introduite sur la colonne (O₂, H₂O).

L'injecteur est chauffé par des résistances électriques à une température de 250°C. Les acides méthylés injectés à l'aide d'une micro-seringue, sont vaporisés à cette haute température.

L'enceinte chauffante thermostatée contient la colonne (fin capillaire de diamètre 0,5-0,25 nm et long de plusieurs dizaines de mètre (30 à 60 m).

Le système de détection est variable selon les modèles d'appareils. Le détecteur à ionisation de flamme, bien adapté à l'étude des molécules organiques et situé dans une enceinte chauffante différente, est constitué par une flamme d'hydrogène brûlant entre 2 électrodes convenablement polarisées et où débouche la colonne chromatographique. Lorsque des

substances organiques sont injectées dans la flamme, il se produit un courant d'ionisation proportionnel à la masse de la substance injectée. Ce courant est enregistré.

L'enregistreur permet d'obtenir à la sortie du détecteur l'enregistrement direct des composés élués par le gaz-vecteur, sous forme d'un tracé de pics. Son association avec un intégrateur permet de mesurer la surface sous chaque pic donc de quantifier de manière absolue lorsque l'on ajoute un standard interne, la quantité de substance correspondant à chaque pic.

M.2.3- Appareillage

La séparation et la quantification des acides gras méthylés ont été effectués avec un chromatographe DANI GC 1000, couplé à un intégrateur APEX Chromatography Workstation. L'appareil est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire en silice fondue de 0,32 mm de diamètre et 30 m de long, et contenant une phase stationnaire (phase de polyéthylène glycol) de 0,25 µm d'épaisseur (EC, WAX. Part N°.19654, Alltech).

La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 225°C.

L'azote qualité N50 est le gaz vecteur utilisé à un débit de 1,5 ml/min, sous une pression de 2,4 bars. Le split est dans un rapport 1/1: l'échantillon injecté passe entièrement dans la colonne.

La température du four est programmée: celle-ci augmente de 60°C à 160°C à raison de 15°C/min, puis de 160°C à 200 à 15°C/min. Après 1,5 min, la température augmente jusqu'à 225°C à raison de 4°C/min. Après un palier de 2 min, la température augmente jusqu'à 245°C à raison de 0,5°C/min.

L'analyse est réalisée en 45 min. Les quantités injectées à l'aide d'une seringue Hamilton de 1 µl, sont de l'ordre de 10 µg contenant 1 µg d'étalon interne (L-α-phosphatidylcholine diheptadécanoylé, C17:0) dans un volume de 1 µl d'hexane.

M.2.4- Quantification des acides gras

Un étalonnage du chromatographe GC 1000 est effectué périodiquement. Pour chaque acide gras, une quantité connue (dans un mélange standard) est injectée dans le chromatographe et donne un pic dont la surface est intégrée: ainsi pour chaque acide gras, on aura une relation entre la surface du pic et la masse.

Les acides gras méthylés sont identifiés suivant leur temps de rétention par comparaison avec des standards connus

- Lipid Standard, Sigma: réf 189-18: (C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C16:1n-7, C18:0, C18:1n-9, C18:2n-6, C18:3n-3, C20:0, C22:0, C22:1n-9, C24:0).
- Lipid Standard, Sigma: réf 189-13: (C20:1n-9, C20:2n-6, C20:3n-3, C20:4n-6, C20:5n-3).
- γ -Linolenic acid methyl ester, Sigma: réf L-6503: (C18:3n-6).
- Cis-7,10,13,16-docosatetraenoic acid, Sigma: réf D-3534: (C22:4n-6).
- Nervonic acid methyl ester nervonic, Sigma: réf N-6767: (C24:1n-9).
- Cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid methyl ester, Sigma: réf D-2659 (C22:6n-3).
- Cis-8,11,14-eicosatrienoic acid methyl ester, Sigma: réf E-3511 (C20:3n-6).
- Cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid methyl ester, Sigma: réf D-5679 (C22:5n-3).
- L- α -phosphatidylcholinediheptadecanoyl, Sigma: réf P-5014 (C17:0).

Le composé L- α -phosphatidylcholinediheptadécanoyle représente le standard interne.

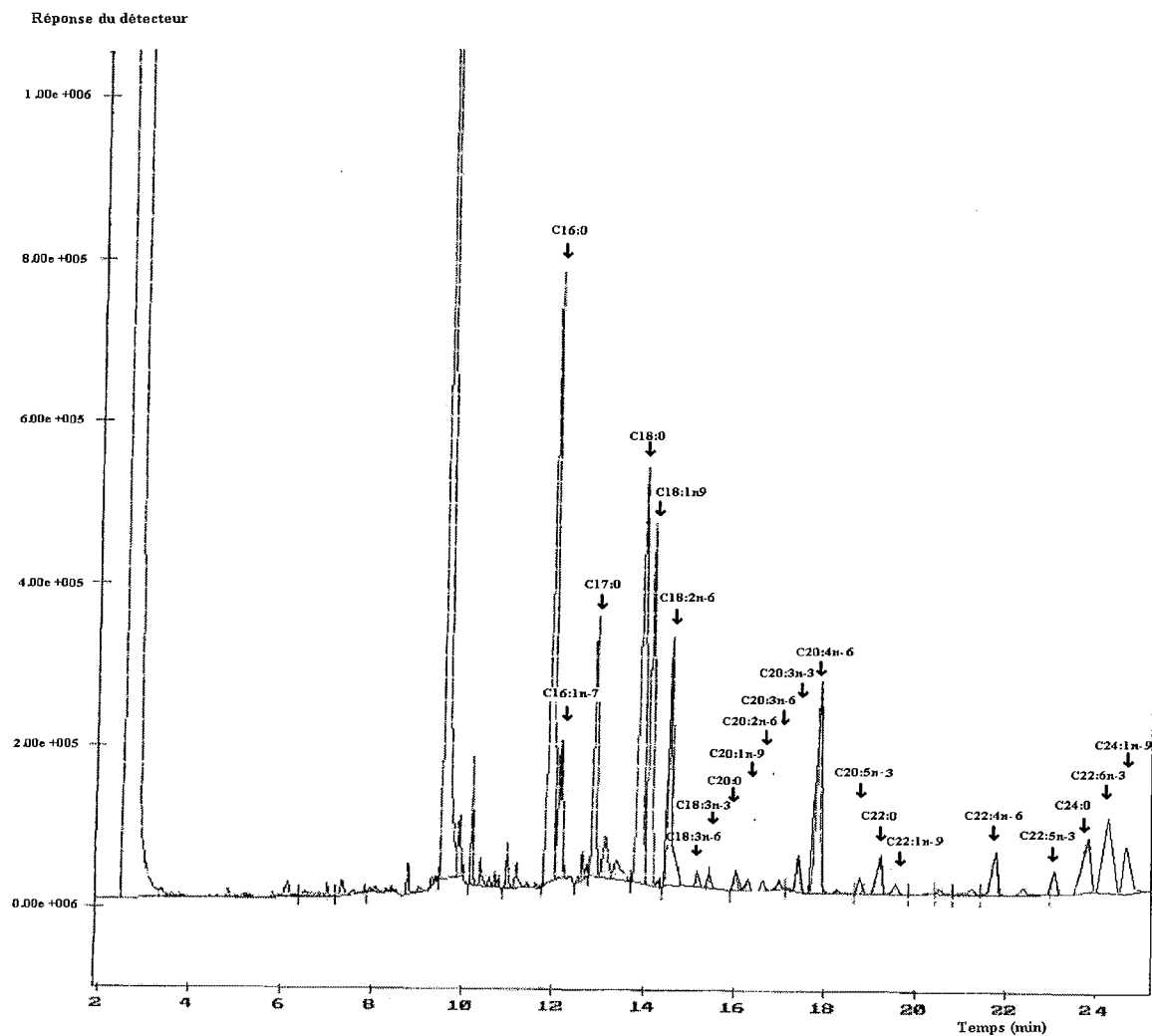


Figure 22: Profil de séparation par CPG des classes majeurs d'acides gras.

N- TESTS STATISTIQUES

Les tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel Statview.

Les valeurs sont exprimées en moyennes +/- SEM ou médianes avec le 25^{ième} et le 75^{ième} percentiles. La normalité de la distribution des valeurs au sein des différents groupes est vérifiée par un test d'aplatissement et d'asymétrie.

Les différences entre groupes sont déterminées par une ANOVA. Le groupe témoin et le groupe obèse ont été comparés par un test t non apparié, et le groupe obèse à l'état basal et après perte de poids ont été comparé par un test t apparié. Une analyse de régression linéaire a été menée pour déterminer des relations entre les différents paramètres (marqueurs de l'insulinorésistance, paramètres plasmatiques et membranaires).

Une analyse de régression pas à pas permet d'expliquer les variations d'un paramètre. La limite de la signification est fixée à $P = 0,05$. Les tests statistiques sont effectués à l'aide du logiciel Statview (Abacus Concepts, Berkeley, Ca, USA).

CHAPITRE 3

**Phospholipides de la membrane érythrocytaire:
une étude des relations avec l'hyperinsulinémie
chez des sujets sains, des enfants et adultes
obèses**

I- INTRODUCTION

Une étude antérieure menée au laboratoire a montré chez des femmes obèses non diabétiques une association entre le contenu de la membrane érythrocytaire en sphingomyéline (SM) et deux marqueurs de l'insulino-résistance. La SM expliquait 22% de la variance de l'insulinémie à jeun tandis que les triglycérides plasmatiques et l'apoA1 étaient des déterminants mineurs (Candiloros et al., 1996). La variance du HOMA était expliquée par les mêmes facteurs. Ultérieurement, nous avons étudié la composition en phospholipides de la membrane d'une cellule insulino-sensible : l'adipocyte dans un groupe de femmes obèses non diabétiques présentant des degrés variables d'insulino-résistance. Dans le cas de l'adipocyte, l'association entre SM et marqueurs de l'insulino-résistance était encore plus forte : 45,6 et 43,8% de la variance dans l'insulinémie à jeun et le HOMA était expliquée par la SM. (Zeghari et al., 2000 (a)).

Ces études nécessitaient des investigations supplémentaires pour plusieurs raisons.

Les études antérieures aussi bien sur l'hématie que sur l'adipocyte ne comportaient pas de groupe témoin. Or, il existe chez les sujets non obèses des variations individuelles marquées de concentrations d'insuline à jeun permettant de les définir comme insulino-sensibles ou insulino-résistants (Korshennikova et al., 2002). Par conséquent, il nous a paru nécessaire de rechercher si les anomalies de composition en phospholipides et particulièrement en SM étaient trouvées également chez des sujets non obèses pouvant être définis comme insulino-résistants.

Par ailleurs, la prévalence de l'obésité chez l'enfant a doublé dans les 20 dernières années et pose un réel problème de santé publique. Les enfants obèses ont un syndrome X qui présente les mêmes caractéristiques que le syndrome X chez l'adulte : hyperinsulinémie (Young-Hyman et al., 2001; Burrows et al., 2001), hypertriglycéridémie, perturbation du métabolisme des lipoprotéines (Frerichs et al., 1997), hypertension (Deckelbaum et Williams, 2001). La fréquence du diabète de type II est également augmentée chez l'enfant obèse (Pinhas-Hamiel et al., 1996). De plus, dans 80% des cas, les enfants obèses restent obèses à l'état adulte (Lloyd et al., 1961). Les facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires à l'âge adulte sont présents chez les enfants les plus insulino-résistants (Sinaiko et al., 2001). Le risque de

morbidité et de mortalité précoce est élevé chez les adultes ayant été obèses lors de leur adolescence, même après une perte de poids à l'âge adulte (Deckelbaum et Williams, 2001). A notre connaissance, il n'existe pas de données sur les classes de phospholipides des membranes cellulaires chez l'enfant obèse. Par conséquent, dans le cadre de cette étude, un groupe d'enfants obèses a été envisagé.

L'étude a été centrée sur la détermination des classes de lipides de la membrane érythrocytaire. En effet, une investigation sur des adipocytes nécessite des biopsies de tissu adipeux de l'ordre de 5 gr. Une telle biopsie est irréalisable chez l'enfant et très difficile chez les témoins en raison de conséquences esthétiques ultérieures. On peut argumenter que l'hématie est un mauvais substitut de l'adipocyte, cellule sensible à l'insuline. Toutefois, nous avons observé précédemment que le contenu en SM de la membrane adipocytaire était corrélé positivement à celui de la membrane érythrocytaire dans un groupe de sujets obèses non diabétiques et diabétiques. Lorsque ces sujets étaient répartis en tertiles selon leur insulïnémie à jeun, il y avait une augmentation progressive des contenus en SM des membranes érythrocytaire et adipocytaire du premier au troisième tertile (Zeghari et al., 2000 (a)).

L'étude a porté par conséquent sur la détermination de la composition en phospholipides de la membrane érythrocytaire chez 32 sujets adultes non obèses et 25 enfants obèses et l'étude des relations avec deux marqueurs de l'insulino-résistance : l'insulïnémie à jeun et le HOMA. Pour permettre une comparaison entre d'une part les adultes non-obèses et obèses et d'autre part les obèses enfants et adultes, un groupe de 61 obèses adultes a été inclus dans cette étude.

II- RESULTATS

L'étude a porté sur un groupe de **32 témoins adultes** (11 hommes et 21 femmes), **61 obèses adultes** (8 hommes et 53 femmes) et **25 enfants obèses** (6 garçons et 19 filles). Une étude préliminaire ayant montré que le sexe n'avait pas d'influence sur les paramètres membranaires, les résultats ont été rassemblés au sein de chaque groupe.

Comme cela était attendu, le **groupe des adultes obèses** diffère significativement des témoins par des valeurs plus élevées pour l'IMC, le tour de taille, le tour de hanche, le rapport taille/hanche, le pourcentage de masse grasse, la glycémie, l'insulinémie à jeun, le HOMA, les TG, la leptine (P toujours $< 0,0001$). Le cholestérol LDL est également plus élevé ($P < 0,05$). En revanche, ces obèses ont des concentrations en cholestérol HDL significativement plus faibles ($P < 0,0001$).

Le **groupe des enfants obèses** diffère significativement des adultes obèses par des valeurs plus faibles pour la glycémie ($P < 0,005$), les TG ($P < 0,005$) et le cholestérol LDL ($P < 0,05$), et par des valeurs plus élevées pour l'insulinémie à jeun ($P < 0,05$) et le CT ($P < 0,005$).

En ce qui concerne **les paramètres membranaires**, les teneurs en SM et en CL, ainsi que les rapports SM/PI et SM/PE, dans le groupe des adultes obèses sont significativement plus élevés que dans le groupe des témoins ($P < 0,005$, $P < 0,05$, $P < 0,0005$, $P < 0,05$, respectivement). Les teneurs en PI sont significativement plus faibles ($P < 0,01$).

Il n'y a pas de différence significative entre les obèses adultes et enfants en ce qui concerne les paramètres membranaires

L'examen des valeurs d'insulinémie à jeun dans le groupe des adultes obèses a révélé des variations individuelles importantes et un recouvrement partiel avec les valeurs d'insulinémie des témoins (Tableau 8). Par conséquent, le **groupe d'obèses adultes** a été divisé **en tertiles** selon la valeur de l'insulinémie à jeun.

Tableau 8: Intervalle de variations des données anthropométriques et métaboliques des témoins, des obèses adultes et enfants.

	Témoins <i>n</i> = 32 11H/21F	Obèses adultes <i>n</i> = 61 8H/53F	Obèses enfants <i>n</i> = 25 6H/19F
IMC (kg/m ²)	[17,6-25,6]	[24,4-44,1]	[20,4-38,7]
Masse grasse (%)	[10,3-35,3]	[23,5-55,2]	[24,5-51,0]
Insulinémie à jeun (mU/L)	[1,35-12,15]	[2,30-35,35]	[3,75-24,60]
HOMA	[0,32-2,65]	[0,47-8,11]	[0,79-5,60]

(*) valeurs extrêmes

A- CARACTERISTIQUES ANTHROPOMETRIQUES, METABOLIQUES ET LIPIDIQUES DES TEMOINS, OBESES ADULTES REPARTIS EN TERTILES ET OBESES ENFANTS (tableau 9).

Le tertile 1 correspond aux sujets présentant une insulinémie basse, et le tertile 3 aux sujets ayant une hyperinsulinémie.

Le tertile 3 diffère significativement des **témoins** par des valeurs plus élevées pour l'IMC, le tour de taille, le tour de hanche, le rapport taille/hanche, le pourcentage de masse grasse, la glycémie, l'insulinémie à jeun, le HOMA, les TG, la leptine (pour tous ces paramètres $P < 0,0001$). Les concentrations en cholestérol HDL sont significativement plus faibles ($P < 0,0001$).

Le tertile 3 diffère significativement du **tertile 1** par des valeurs plus élevées pour l'IMC ($P < 0,001$), le tour de taille ($P < 0,0005$), le rapport taille/hanche ($P < 0,05$), la glycémie ($P < 0,05$), l'insulinémie à jeun ($P < 0,0001$), le HOMA ($P < 0,0001$), les TG ($P < 0,05$), la leptine ($P < 0,05$) et le CT ($P < 0,05$). Ils ont des concentrations en cholestérol HDL significativement plus faibles ($P < 0,0001$).

Le groupe des enfants obèses diffère significativement **des témoins** par des valeurs plus élevées pour le pourcentage de masse grasse ($P < 0,0001$), la glycémie ($P < 0,05$), l'insulinémie à jeun ($P < 0,0001$), le HOMA ($P < 0,0001$), la leptine ($P < 0,0001$) et le CT ($P < 0,05$). En revanche, les enfants obèses ont des concentrations en cholestérol HDL significativement plus faibles ($P < 0,0001$).

Le groupe des enfants obèses diffère significativement des adultes **du tertile 3** par des valeurs plus élevées pour le CT ($P < 0,05$), le cholestérol HDL ($P < 0,05$), et par des valeurs plus faibles pour le pourcentage de masse grasse ($P < 0,05$), la glycémie ($P < 0,0001$), l'insulinémie à jeun ($P < 0,05$), le HOMA ($P < 0,0001$), et les TG ($P < 0,0001$).

B- PARAMETRES MEMBRANAIRES DES TEMOINS, DES OBESES ADULTES REPARTIS EN TERTILES ET DES OBESES ENFANTS (tableau 9).

Le tertile 3 présente des valeurs significativement plus élevées que celles des témoins et du tertile 1 pour la concentration en SM et la valeur du rapport SM/PI ($P < 0,0001$ tertile 3 *versus* témoins, et $P < 0,005$ tertile 3 *versus* tertile 1 pour les deux paramètres).

Le tertile 3 a des valeurs de PI significativement plus faibles que celles des témoins ($P < 0,005$).

Les enfants obèses, comme les adultes du tertile 3 ont des valeurs significativement plus élevées par rapport aux témoins pour la SM ($P < 0,005$) et le rapport SM/PI ($P < 0,05$). Ils ont également des valeurs significativement plus faibles en PI ($P < 0,05$).

En ce qui concerne **les paramètres membranaires**, il faut noter que les enfants obèses ne diffèrent pas du tertile 3 à l'exception du rapport SM/PI qui est plus faible ($P < 0,05$).

Tableau 9: Paramètres anthropométriques et métaboliques des sujets témoins, obèses adultes classés en tertile selon l'insulinémie, et enfants.

	Témoins	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3	Obèses enfants	ANOVA
	<i>n</i> = 32	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 25	<i>P</i>
Age (an)	36,0(29,5-44,0)	38,9 ± 1,3	35,0 ± 2,2	36,0 (27,0-41,5)	11,1 ± 0,5	
IMC (kg/m ²)	21,8(20,1-24,0)	31,1 (29-32,7)	31,7 (29,7-36,7)	35,4 ± 0,9	25,0(23,7-28,6)	
Z-score	-0,50 (0,70-0,10)	2,23 ± 0,17 ^c	3,09 ± 0,28 ^{e,α}	4,00 ± 0,29 ^{e,φ,*}	4,80 (3,85-5,45) ^{e,φ,****,++}	< 0,0001
Tour de taille (cm)	74,8 ± 1,4	93,8 ± 1,6	98,0 ± 1,5	102,0 (96,5-113,0)	86,3(78,0-96,5)	
Tour de hanche (cm)	95,0(91,0-100,5)	112,0(109-120)	115,5 (107,5-126,5)	118,4 ± 2,1	98,0 ± 2,7	
Rapport taille/hanches	0,78(0,72-0,82)	0,83 ± 0,14	0,83 (0,79-0,90) ^a	0,85 (0,83-0,93) ^{e,α}	0,89 ± 0,02 ^{e,α}	< 0,0001
Masse grasse (%)	22,5 ± 1,2	46,04(40,70-47,45) ^e	47,71 (39,17-53,35) ^e	46,67 (43,77-49,20) ^e	40,7(37,5-45,1) ^{e,***,+}	< 0,0001
Glycémie (mmol/L)	4,86(4,50-5,27)	5,24 ± 0,11 ^a	5,05 (4,87-5,53) ^a	5,61 (5,00-6,09) ^{e,α,*}	4,89(4,70-5,09) ^{a,*,+++}	< 0,0001
Insulinémie à jeun (mU/L)	4,6(4,0-6,0)	6,6 ± 0,4	11,1 (9,7-12,3) ^{e,φ}	15,0 (13,8-17,8) ^{e,φ,*****}	13,9 ± 0,9 ^{e,φ,***,+}	< 0,0001
HOMA	1,02(0,80-1,34)	1,48 ± 0,10	2,48 (2,23-2,79) ^{e,χ}	3,65 (3,36-4,92) ^{e,φ,*****}	3,01 ± 0,23 ^{e,φ,*,+++}	< 0,0001
Triglycérides (TG) (mmol/L)	0,66(0,55-0,80)	1,01(0,67-1,65) ^c	1,16 (0,80-1,32) ^c	1,34 (0,98-2,36) ^{e,α,*}	0,77(0,62-1,03) ^{α,+++}	< 0,0001
Cholestérol total (CT) (mmol/L)	5,02 ± 0,14	5,59 ± 0,23 ^b	5,12 (4,61-5,59)	5,18 ± 0,17 ^α	5,71 ± 0,15 ^{a,φ,***,+}	< 0,001
Leptine	7,15(3,2-9,9)	27,68 ± 2,47 ^c	36,50 (19,03-45,00) ^{e,α}	38,49 ± 3,44 ^{e,α}	31,15 ± 2,89 ^e	< 0,0001
Cholestérol HDL (g/L)	0,64 ± 0,02	0,57 ± 0,03	0,47 (0,41-0,58) ^c	0,43 ± 0,02 ^{e,χ}	0,55 ± 0,03 ^{e,+}	< 0,0001
Cholestérol LDL (g/L)	1,10 (0,98-1,31)	1,29 (1,16-1,60) ^b	1,31 ± 0,07 ^a	1,27 ± 0,06	1,17(0,97-1,29) ^{δ,**}	< 0,01

Les valeurs correspondent à des moyennes ± SEM ou des médianes avec le 25 ième et le 75 ième percentile (pour les distribution log normale).

^a *P* < 0,05, ^b *P* < 0,01, ^c *P* < 0,005, ^d *P* < 0,0005, ^e *P* < 0,0001, comparé au groupe témoin.

^α *P* < 0,05, ^β *P* < 0,01, ^χ *P* < 0,005, ^δ *P* < 0,001, ^ε *P* < 0,0005, ^φ *P* < 0,0001, comparé au tertile 1.

* *P* < 0,05, ** *P* < 0,01, *** *P* < 0,005, **** *P* < 0,0005, ***** *P* < 0,0001, comparé au tertile 2.

⁺ *P* < 0,05, ⁺⁺ *P* < 0,01, ⁺⁺⁺ *P* < 0,0001, comparé au tertile 3.

Tableau 10: Paramètres membranaires des sujets témoins, obèses adultes classés en tertile selon l'insulinémie, et enfants.

	Témoins	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3	Obèses enfants	ANOVA
	<i>n</i> = 32	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 25	<i>P</i>
Cholestérol membranaire (CL)	251 ± 12	285 ± 16	290 ± 17	248 (237-280)	265 ± 9	NS
Phosphatidyléthanolamine (PE)	258(238-314)	263 ± 9	276 ± 8	275 ± 6	272 ± 8	NS
Phosphatidylinositol (PI)	72(34-84)	45 (37-66) ^a	51 ± 3 ^a	35 (33-44) ^c	39(34-71) ^a	< 0,005
Phosphatidylsérine (PS)	127 ± 5	111 (101-128)	127 ± 5	113 ± 5	121(96-152)	NS
Phosphatidylcholine (PC)	234(210-269)	237 ± 9	241 (222-268)	258 (244-293)	256(239-267)	NS
Sphingomyéline (SM)	93 ± 3	101 ± 3	102 ± 3 ^a	112 ± 4 ^{d,β,*}	110 ± 3 ^c	< 0,0005
Phospholipides totaux (PL)	779 ± 17	749 (718-809)	794 ± 14	785 ± 13	781(743-837)	NS
CL/PL	0,32 ± 0,02	0,36 (0,28-0,45)	0,37 (0,28-0,44)	0,33 ± 0,02	0,33 ± 0,01	NS
CL/SM	2,92(1,99-3,33)	2,64 (2,29-3,51)	2,85 ± 0,15	2,37 ± 0,12	2,17(2,05-2,66)	NS
SM/PE	0,35(0,27-0,43)	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,41 ± 0,01	NS
SM/PC	0,40 ± 0,02	0,40 (0,38-0,48)	0,43 (0,39-0,45)	0,42 (0,39-0,45)	0,44 ± 0,01	NS
SM/PI	1,34(1,07-2,59)	2,43 (1,31-2,95)	1,93 (1,62-2,76)	3,18 ± 0,18 ^{d,β,**}	2,45 ± 0,26 ^{a,+}	< 0,001
PE/PC	1,14 ± 0,04	1,14 ± 0,05	1,08 (0,96-1,28)	1,05 (0,94-1,19)	1,07(1,01-1,19)	NS

PE, PI, PS, PC, SM et cholestérol: en µg/mg de protéines; les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM ou aux médianes avec le 25 ième et le 75 ième percentile (pour les distributions log normale).

^a *P* < 0,05, ^b *P* < 0,01, ^c *P* < 0,005, ^d *P* < 0,0001, comparé au groupe témoin.

^β *P* < 0,005, comparé au tertile 1.

* *P* < 0,05, ** *P* < 0,005, comparé au tertile 2.

⁺ *P* < 0,05, comparé au tertile 3.

C- CORRELATIONS SIMPLES ENTRE LES MARQUEURS DE L'INSULINO-RESISTANCE ET LES PARAMETRES ANTHROPOMETRIQUES, PLASMATIQUES ET MEMBRANAIRES

L'étude a été réalisée dans la population totale et au sein de chaque groupe.

C.1- POPULATION TOTALE

L'insulinémie à jeun est corrélée positivement à l'IMC ($r = 0,548$ $P < 0,0001$), au Z score ($r = 0,695$ $P < 0,0001$), au tour de taille ($r = 0,584$ $P < 0,0001$), au tour de hanche ($r = 0,353$ $P < 0,0001$), au rapport taille/hanche ($r = 0,410$ $P < 0,0001$), à la masse grasse ($r = 0,505$ $P < 0,0001$), à la leptine ($r = 0,445$ $P < 0,0001$) et aux triglycérides ($r = 0,273$ $P < 0,05$), et négativement à l'âge ($r = -0,236$ $P < 0,05$) et au cholestérol HDL ($r = -0,249$ $P < 0,01$).

En ce qui concerne les **paramètres membranaires**, l'insulinémie est corrélée positivement à la SM ($r = 0,448$ $P < 0,0001$), à la PC ($r = 0,261$ $P < 0,005$), et aux rapports SM/PE ($r = 0,332$ $P < 0,0005$), SM/PC ($r = 0,178$ $P < 0,05$) et SM/PI ($r = 0,489$ $P < 0,0001$), et négativement à la PI ($r = -0,356$ $P < 0,0005$), et aux rapports CL/SM ($r = -0,271$ $P < 0,005$) et PE/PC ($r = -0,234$ $P < 0,05$).

Des résultats similaires sont trouvés avec le **HOMA**.

C.2- TEMOINS

L'insulinémie à jeun est corrélée positivement avec seulement les **paramètres membranaires**: SM ($r = 0,526$ $P < 0,005$), PC ($r = 0,417$ $P < 0,05$), et phospholipides totaux ($r = 0,354$ $P < 0,05$).

Le HOMA est corrélé positivement avec les mêmes **paramètres membranaires**, la SM ($r = 0,500$ $P < 0,005$), la PC ($r = 0,480$ $P < 0,01$), les phospholipides totaux ($r = 0,346$ $P = 0,05$), et également avec les TG ($r = 0,338$ $P < 0,05$) et le cholestérol LDL ($r = 0,373$ $P = 0,05$).

C.3- OBESES ADULTES

L'insulinémie à jeun est corrélée positivement à l'IMC ($r = 0,475$ $P < 0,0001$), au Z score ($r = 0,600$ $P < 0,0001$), au tour de taille ($r = 0,530$ $P < 0,0001$), au tour de hanche ($r = 0,301$ $P < 0,05$), et aux triglycérides ($r = 0,273$ $P < 0,05$), et négativement à l'âge ($r = -0,253$ $P < 0,05$) et au cholestérol HDL ($r = -0,329$ $P < 0,05$).

Pour **les paramètres membranaires**, l'insulinémie est corrélée positivement à la SM ($r = 0,330$ $P < 0,01$), à la PC ($r = 0,272$ $P < 0,05$), au rapport SM/PI ($r = 0,441$ $P < 0,005$), et négativement à la PI ($r = -0,335$ $P < 0,05$) et au rapport CL/SM ($r = -0,298$ $P < 0,05$).

Des résultats similaires sont trouvés avec **le HOMA**.

C.4- OBESES ENFANTS

L'insulinémie à jeun est corrélée positivement à l'IMC ($r = 0,412$ $P < 0,05$), au tour de taille ($r = 0,431$ $P < 0,05$), à la masse grasse ($r = 0,456$ $P < 0,05$).

En ce qui concerne **les paramètres membranaires**, l'insulinémie est corrélée positivement à la SM ($r = 0,530$ $P < 0,01$), aux rapports SM/PE ($r = 0,614$ $P < 0,001$), SM/PC ($r = 0,479$ $P < 0,05$), SM/PI ($r = 0,602$ $P < 0,01$) et négativement à la PI ($r = -0,442$ $P < 0,05$), aux rapports CL/SM ($r = -0,487$ $P < 0,05$) et PE/PC ($r = -0,434$ $P < 0,05$).

Les corrélations avec **le HOMA** sont identiques à l'exception de la PI qui n'est pas corrélée.

Il faut noter que des corrélations existent dans ce groupe d'enfants obèses et de témoins entre **le cholestérol HDL** et des paramètres membranaires alors qu'elles n'apparaissent pas chez les obèses adultes et chez les témoins. **Le cholestérol HDL** est corrélé négativement aux TG ($r = -0,644$ $P = 0,0005$), aux rapports CL/PL ($r = -0,479$ $P < 0,05$) et SM/PC ($r = -0,550$ $P < 0,005$) et positivement à la PC ($r = 0,585$ $P < 0,005$).

D- ANALYSE DE REGRESSION PAS A PAS

Dans la population totale (tableau 11), l' IMC explique majoritairement la **variance de l'insulinémie à jeun** (26,1 %), avec la SM (13,8%) et le cholestérol HDL (2,9%), (r^2 ajusté = 0,412 $P < 0,0001$).

La **variance du HOMA** est également expliquée par l'IMC (29,1%), la SM (10,2%) et le cholestérol HDL (3,2%) (r^2 ajusté = 0,409 $P < 0,0001$).

Les résultats sont identiques lorsque les obèses sont répartis en tertiles selon le Z-score

Tableau 11: Analyse de régression multiple pas à pas expliquant l'insulinémie et le HOMA dans la population totale

Insulinémie

Variables	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
IMC	0,486	0,261	38,462	< 0,0001
SM	0,126	0,399	35,903	< 0,0001
HDL	-7,89	0,428	26,737	< 0,0001

r^2 ajusté = 0,412 $P < 0,0001$

HOMA

Variables	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
IMC	0,128	0,291	46,044	< 0,0001
SM	0,026	0,393	34,977	< 0,0001
HDL	-2,051	0,425	26,380	< 0,0001

r^2 ajusté = 0,409 $P < 0,0001$

Dans le groupe des témoins (tableau 12), la SM explique 27,7 % de la **variance de l'insulinémie à jeun** (r^2 ajusté = 0,253 $P < 0,005$), tandis que les TG et la SM expliquent 33,4 % et 21,1 % respectivement **de la variance du HOMA** (r^2 ajusté = 0,509 $P < 0,0001$).

Tableau 12: Analyse de régression multiple pas à pas expliquant l'insulinémie et le HOMA dans le groupe témoin.

Insulinémie

Variabes	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
SM	0,061	0,277	11,505	< 0,005

r^2 ajusté = 0,253 $P < 0,005$

HOMA

Variabes	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
TG	1,063	0,334	13,049	< 0,005
SM	0,011	0,545	14,989	< 0,0001

r^2 ajusté = 0,509 $P < 0,0001$

Dans le groupe des obèses adultes (tableau 13), le tour de taille, le rapport SM/PI et l'âge expliquent 29,4, 11,9 et 5,5 % respectivement de la **variance de l'insulinémie à jeun** (r^2 ajusté = 0,499 $P < 0,0001$). Le tour de taille et le rapport SM/PI expliquent 34,8 et 9,4 % respectivement de la **variance du HOMA** (r^2 ajusté = 0,417 $P < 0,0001$).

Tableau 13: Analyse de régression multiple pas à pas expliquant l'insulinémie et le HOMA dans le groupe des adultes obèses.

Insulinémie

Variabes	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
Tour de Taille	0,321	0,294	17,900	= 0,0001
SM/PI	0,348	0,413	14,751	< 0,0001
Age	-0,156	0,468	12,00	< 0,0001

r^2 ajusté = 0,499 $P < 0,0001$

HOMA

Variabes	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
Tour de Taille	0,089	0,348	24,013	< 0,0001
SM/PI	0,543	0,442	17,450	< 0,0001

r^2 ajusté = 0,417 $P < 0,0001$

Dans le groupe des obèses enfants (tableau 14), le rapport SM/PE et la masse grasse expliquent 41,9 et 15,6 % de la variance de l'insulinémie à jeun (r^2 ajusté = 0,534 $P = 0,0001$), les mêmes paramètres expliquant 32,1 et 17 % de la variance du HOMA (r^2 ajusté = 0,444 $P < 0,001$).

En ce qui concerne la variance du cholestérol HDL, elle est expliquée par les triglycérides (41,5 %) et la PC (21%), (r^2 ajusté = 0,591 $P < 0,0001$).

Tableau 14: Analyse de régression multiple pas à pas expliquant l'insulinémie, le HOMA et le cholestérol HDL dans le groupe des enfants obèses.

Insulinémie

Variabes	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
SM/PE	33,503	0,419	15,891	<0,001
Masse grasse (%)	0,293	0,575	14,180	= 0,0001

r^2 ajusté = 0,534 $P = 0,0001$

HOMA

Variabes	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
SM/PE	6,709	0,321	10,856	< 0,005
Masse grasse (%)	0,072	0,491	10,600	< 0,001

r^2 ajusté = 0,444 $P < 0,001$

Cholestérol HDL

Variabes	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
TG	-0,232	0,415	16,303	= 0,0005
PC	0,002	0,625	18,359	< 0,0001

r^2 ajusté = 0,591 $P < 0,0001$

III- DISCUSSION

Dans cette étude, pour la première fois, les relations éventuelles entre les marqueurs de l'insulino-résistance et les phospholipides membranaires ont été étudiées dans un groupe de **sujets sains non obèses**. L'insulinémie variant dans un rapport de 1 à 9 dans ce groupe, la SM explique près de 30% de la variance de l'insulinémie à jeun, confirmant la relation très forte entre la SM et l'insulino-sensibilité démontrée précédemment chez des sujets obèses (Candiloros et al., 1996).

Une relation entre la SM et l'insulino-résistance a été rapportée précédemment dans des modèles animaux. En effet, chez les rats hypertendus qui sont considérés comme un modèle d'insulino-résistance, la concentration en SM de la membrane érythrocytaire est augmentée par rapport à celle des rats témoins (Dorrance al., 2001).

La détermination des classes de phospholipides dans la membrane d'hématie du groupe d'**adultes obèses** présentant une large gamme d'insulinémie à jeun (et de HOMA) a permis de confirmer les résultats antérieurs (Candiloros et al, 1996). La répartition des obèses en tertiles montre que le **tertile 3 le plus hyperinsulinémique** est caractérisé par la présence d'**anomalies lipidiques** (TG et leptine plus élevés, et HDL cholestérol plus faible que le tertile 1), et également par une concentration membranaire en **SM plus importante**. Toutefois, dans notre étude, un autre phospholipide, le **phosphatidylinositol (PI)** est associé aux marqueurs de l'insulino-résistance. Comparée aux témoins, la concentration en PI est significativement diminuée dans les trois tertiles. La diminution est la plus importante dans le groupe le plus hyperinsulinémique (-51% par rapport aux témoins) et significativement différente des deux autres tertiles. Il en résulte que le rapport SM/PI est étroitement associé aux deux marqueurs de l'insulino-résistance et que ce rapport avec le tour de taille expliquent majoritairement la variance de l'insulinémie à jeun et du HOMA.

L'introduction de la PI comme phospholipide participant avec la SM aux **anomalies membranaires associées à l'insulino-résistance** n'est pas en contradiction avec les résultats antérieurs puisque ce phospholipide n'avait pas été déterminé dans l'étude précédente (Candiloros et al., 1996). Néanmoins, elle semble spécifique de sujets obèses. En effet, au sein de la population totale et du seul groupe des témoins, l'influence de la PI disparaît lors de

l'analyse de régression pas à pas, la SM restant le seul paramètre membranaire explicatif des variations de l'insulinémie à jeun.

La PI ne représente qu'un faible pourcentage des phospholipides totaux dans la membrane érythrocytaire (7 à 9%). elle fait partie de la famille des phosphoinositides qui jouent un rôle très important dans la transduction du signal en particulier le signal de l'insuline et de nombreuses fonctions membranaires.

Les mécanismes conduisant à une diminution de PI ne sont pas élucidés pour l'instant. Elle constitue un phospholipide mineur des HDL (environ 2,6%). Les compositions en acides gras de la PI des lipoprotéines et de la membrane érythrocytaire étant différentes, il a été suggéré que les échanges de PI entre lipoprotéines et cellules étaient peu probables (Breckenridge et Palmer, 1982).

Toutefois, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette diminution de PI. Bien qu'il soit admis en général qu'il n'y a pas de synthèse *de novo* de phospholipides, une biosynthèse a été rapportée dans les hématies humaines matures (Strunecka et Folck, 1988). Par ailleurs, il a été démontré que dans des hématies humaines, une déplétion en cholestérol entraînait une réorganisation des phosphoinositides dans des domaines membranaires où ils étaient moins accessibles aux kinases et phosphodiesterases (M'Zali et Giraud, 1986). Les quantités de cholestérol membranaire dans le groupe d'adultes obèses ne sont pas significativement plus élevées que chez les témoins. Toutefois, la SM est significativement plus élevée et on sait que la SM a une forte affinité pour le cholestérol (Slotte, 1999). On peut faire l'hypothèse que la formation de microdomaines contenant du cholestérol et enrichies en SM pourrait favoriser dans ce cas une hydrolyse des phosphoinositides, diminuant les taux de PI.

En ce qui concerne le groupe des **enfants obèses**, il n'existe, à notre connaissance, aucune donnée dans la littérature concernant l'étude des relations entre les marqueurs de l'insulino-résistance et les classes de phospholipides de la membrane érythrocytaire.

Les valeurs moyennes de l'insulinémie à jeun et du HOMA situent ce groupe entre les tertiles 2 et 3 des obèses adultes, mettant en évidence une insulino-résistance importante chez ces enfants.

En ce qui concerne **les paramètres lipidiques**, les **enfants obèses** inclus dans cette étude semblent former un groupe très particulier. En premier lieu, ce groupe d'enfants et les obèses adultes sont différents au niveau des lipides plasmatiques. La valeur moyenne des **TG** est

normale : 0,77mmol/L. Elles n'est pas significativement différente des valeurs observées pour les témoins adultes. En revanche, le **CT plasmatique** est significativement plus élevé que les valeurs des témoins adultes et des trois tertiles d'adultes obèses. Pour le **cholestérol HDL**, il est significativement plus élevé que celui du tertile 3 des obèses adultes et plus faible que celui des témoins. En ce qui concerne le **cholestérol LDL**, il n'est pas différent de celui des témoins adultes.

Les données lipidiques plasmatiques de ces enfants obèses diffèrent également des valeurs rapportées dans la littérature pour des enfants obèses d'âges voisin.

Les **TG** sont très proches des valeurs rapportées antérieurement pour un groupe d'enfants témoins (Curatola et al., 1987). Elles sont très similaires (Kitagawa et al., 1983) ou inférieures à celles rapportées pour des enfants obèses (Curatola et al., 1987 ; Young-Hyman et al., 2001).

En ce qui concerne le **CT plasmatique**, la valeur moyenne de 5,71 mmol/L est très supérieure aux valeurs de références pour des enfants non obèses d'âge similaire (4,65-5,06 mmol/L, Documenta Geigy) ou des valeurs rapportées pour des enfants obèses également d'âge similaire: 4,93 mmol/L (Kitagawa et al., 1983), 4,13 mmol/L (Curatola et al., 1987) et 4,23 mmol/L (Young-Hyman et al., 2001).

Pour le **cholestérol HDL**, il est similaire aux valeurs rapportées par Kitagawa et al., (1983) dans un groupe d'enfants obèses.

En ce qui concerne le **cholestérol LDL**, il est plus élevé que celui des enfants obèses (Young-Hyman et al., 2001).

Ces résultats opposés pour les **TG** et le **CT** plasmatique dans le cas d'enfants obèses sont vraisemblablement liés à des facteurs environnementaux ou aux origines ethniques différentes des populations étudiées.

Les **altérations membranaires** observées chez les obèses adultes sont retrouvées chez les enfants : une augmentation significative de la SM accompagnée d'une diminution significative de la PI, les concentrations membranaires de ces deux phospholipides étant très voisines de celles observées dans le tertile 3 des obèses adultes. Le rapport SM/PE et la masse grasse expliquent majoritairement la **variance de l'insulinémie à jeun** et celle du **HOMA**.

Il a été rapporté une diminution de la fluidité de la membrane érythrocytaire chez les enfants obèses, qui est corrélée positivement au rapport CL/PL (Ferretti et al., 1988). Dans notre étude, le rapport cholestérol/phospholipides de la membrane érythrocytaire n'est pas significativement modifié par rapport à celui des témoins adultes. Mais **la SM** et **la PE**

membranaire qui expliquent majoritairement la variation de l'insulinémie à jeun, peuvent avoir un rôle dans la transduction du signal de l'insuline, essentiellement par le caractère rigidifiant de la SM en raison des acides gras saturés qui la compose.

Dans ce **groupe d'enfants obèses**, les **TG** et un paramètre membranaire : la **PC** expliquent majoritairement la **variance du cholestérol HDL**. Il faut noter que dans le groupe d'obèses adultes, aucun paramètre membranaire n'explique la variance du cholestérol HDL. Pour l'instant, aucun élément ne permet d'émettre des hypothèses à propos de la relation PC membranaire-cholestérol HDL chez les enfants obèses d'autant plus que l'échantillon est petit.

Toutefois, leur taux de cholestérol HDL est faiblement diminué par rapport à celui des témoins adultes. Or, l'analyse de la composition en phospholipide des HDL chez des sujets caractérisés par un taux de cholestérol HDL élevé, a révélé la présence de forte proportion de PC dans les HDL alors que la SM et la PE ne varie pas (Ozerova et al., 2001). La PC de la membrane érythrocytaire a un turnover assez élevé et il est possible que la relation positive PC membranaire-HDL cholestérol ne soit que le reflet de l'équilibre de la PC entre les HDL et la membrane érythrocytaire.

Le **syndrome X** est caractérisé en particulier par l'insulino-résistance, une hypertriglycéridémie et un cholestérol HDL faible. Il est détecté chez les enfants et adolescents obèses (Falkner et Michel, 1999 ; Young-Hyman et al., 2001, Sinaiko et al., 2001). Notre étude permet d'apporter **une information nouvelle** sur les relations entre l'obésité infantile et la diminution de l'insulino-sensibilité. Dans le groupe d'enfants obèses étudié, la triglycéridémie étant normale et le cholestérol HDL moins diminué que chez les obèses adultes, on ne trouve pas l'ensemble des facteurs liés au Syndrome X. Par contre, les **anomalies membranaires en SM et PI** sont déjà présentes et on peut faire l'hypothèse que ce sont des **anomalies primitives** apparaissant avant le développement de la constellation de facteurs du Syndrome X et contribuant peut être à leur développement.

IV- CONCLUSION

L'insulinémie à jeun est corrélée à des **altérations de la composition en phospholipides** de la membrane érythrocytaire chez **des adultes et des enfants obèses mais également chez des témoins non obèses**. Dans les trois groupes, les sujets ayant l'insulinémie la plus élevée ont une concentration élevée de **SM**. Par ailleurs, deux autres phospholipides semblent associer à l'insulinémie dans les groupes d'obèses: **la PI** chez les adultes et **la PE** chez les enfants, varient en fonction inverse avec l'insulinémie.

L'étude du groupe d'enfants obèses a permis de **décélérer des anomalies membranaires** apparaissant avant le développement des facteurs caractéristiques du syndrome X. Ces anomalies pourraient peut-être contribuer à l'apparition de ces facteurs liés au syndrome X

La vérification de cette hypothèse nécessite une étude complémentaire sur un groupe d'enfants plus important.

CHAPITRE 4

Obésité et restriction calorique: relations entre la perte de poids, l'insulino-sensibilité et la composition lipidique de la membrane érythrocytaire

I- INTRODUCTION

La gestion du poids chez les sujets en surpoids et obèses est tout d'abord d'obtenir une réduction de poids significative et secondairement mais tout aussi important de maintenir cette perte de poids. Une approche traditionnelle est la prescription de régimes faiblement caloriques (800 à 1,500 kcal/jour) qui fournissent un apport énergétique inférieur à la dépense énergétique et il est reconnu que ces régimes faiblement caloriques peuvent être un traitement efficace de l'obésité (Finer, 2001).

Une amélioration de l'insulino-résistance associé à l'obésité après une perte de poids induite par un régime alimentaire n'est pas clairement établie. Un régime basé sur une absorption diminuée en graisses et augmentée en carbohydrates n'entraîne pas une diminution de l'insulino-résistance. De plus, de tels régimes peuvent accentuer les anomalies métaboliques du syndrome X. La substitution des graisses saturées par des graisses monoinsaturées et polyinsaturées n'affectent pas non plus l'insulino-résistance (Reaven, 2000; Reaven, 2001). En revanche, dans le cas d'études d'intervention à court terme (16 semaines) avec un régime hypocalorique, il semble bien établi qu'une perte de poids modérée augmente l'insulino-sensibilité (Weinstock et al., 1998 ; Pasanisi et al., 2001 ; Reaven, 2001 ; Janssen et al., 2002, WHO, 1998, Ziegler et al, 2001).

Par conséquent, la validation de l'hypothèse membranaire de l'insulino-résistance peut être approchée en effectuant une étude d'intervention sur un groupe de sujets obèses soumis à un régime hypocalorique et en déterminant l'évolution des paramètres indicateurs de l'obésité, de l'insulino-résistance et de la composition membranaire en phospholipides et acides gras.

A notre connaissance, aucune information n'est disponible sur des relations éventuelles entre la perte de poids et la composition membranaire en phospholipides et acides gras.

En ce qui concerne les acides gras, les modifications des acides gras lors d'une perte de poids après une restriction calorique ont été essentiellement relevées au niveau plasmatique. Elles concernent une réduction de l'acide linoléique et une augmentation de l'acide arachidonique (Schouten et al., 1981, Rossner et al., 1989 ; Phinney, 1991), une augmentation des acides gras n-3 (Christophe et Vermeulen, 1992) ou une augmentation des acides gras n-6

(Bonfond-Rousselot et al., 1999). Pour le tissu adipeux, il n'y avait pas de modifications des acides gras (Bonfond-Rousselot et al., 1999) ou de faibles variations se traduisant par une augmentation de l'acide palmitoléique et une diminution des acides gras saturés (Rossner et al., 1989), ou une diminution de l'acide linoléique (Hudgins et Hirsch, 1991 ; Tang et al., 1993). Dans l'ensemble de ces travaux, une association entre la variation d'insulino-résistance et la composition en acide gras aussi bien au niveau plasmatique que dans le tissu adipeux n'a pas été recherchée.

Par conséquent, une étude d'intervention a été entreprise sur 24 femmes obèses participant à un programme de réduction de poids de 3 mois qui combinait une restriction calorique modérée, une modification du comportement alimentaire et une activité physique régulière avec comme objectif une perte de poids de 5-10%. Les patientes devaient réduire leur apport calorique journalier de 600 kcal (environ 20-30%). Les carbohydrates, graisses et protéines représentaient 50, 30 et 20% respectivement de l'apport énergétique. La composition de la membrane érythrocytaire en phospholipides et acides gras a été déterminée à l'état basal et après trois mois de restriction calorique et les relations avec les marqueurs de l'insulino-résistance examinés. Un groupe de 21 femmes non obèses non soumises à une restriction calorique ont été considérées comme témoins et étudiées dans des conditions identiques.

II- RESULTATS

A- A L'ETAT BASAL

A.1- PARAMETRES ANTHROPOMETRIQUES, METABOLIQUES ET LIPIDIQUES

Les caractéristiques cliniques et métaboliques des 21 femmes témoins et des 24 obèses sont données dans la tableau 15.

Dans le groupe des 21 femmes **témoins**, l'IMC varie entre 17,6 et 24 kg/m², le pourcentage de masse grasse entre 14,8 et 35,5 %, l'insulinémie à jeun entre 2,15 et 8,55 mU/L, et le HOMA entre 0,4 et 2,6.

Dans le groupe des 24 femmes **obèses**, l'IMC varie de 25 à 41,1 kg/m², le pourcentage de masse grasse de 38,2 à 55,2 %, l'insulinémie à jeun de 4,6 à 17 mU/L, et le HOMA de 1,1 à 3,7.

Les 24 femmes obèses diffèrent significativement des témoins par des valeurs plus élevées pour l'IMC ($P < 0,0001$), le tour de taille ($P < 0,0001$), le rapport taille/hanche ($P < 0,0001$), le pourcentage de masse grasse ($P < 0,0001$), la glycémie ($P < 0,05$), l'insulinémie à jeun ($P < 0,0001$), le HOMA ($P < 0,0001$), les TG ($P < 0,001$), le CT ($P < 0,05$), et le cholestérol LDL ($P < 0,01$). En revanche, elles ont des concentrations en cholestérol HDL significativement plus faibles ($P < 0,01$).

Afin de mieux présenter les effets de la différence dans le niveau d'hyperinsulinémie basale sur la composition lipidique de la membrane et compte tenu d'un certain recouvrement des insulinémies entre le groupe des obèses et le groupe des témoins, les 24 sujets obèses ont été séparés en 2 sous groupes A et B selon leur insulinémie à jeun. Le seuil entre A et B est la moyenne de l'insulinémie à jeun + 2 déviations standard déterminée chez le groupe témoin.

Le groupe A, dont l'insulinémie à jeun est $< 9,55$ mU/L (9 sujets), est défini comme insulino-sensible, et **le groupe B**, dont l'insulinémie à jeun est $> 9,55$ mU/L (15 sujets), comme insulino-résistant. L'insulinémie à jeun et le HOMA sont significativement plus élevés ($P < 0,0001$) et le cholestérol total significativement plus faible dans le groupe B que dans le groupe A ($P < 0,05$).

Tableau 15: Paramètres cliniques et métaboliques des femmes témoins, de tous les obèses et des obèses avec Ins < 9,55 mU/L (groupe A) et Ins > 9,55 mU/L (groupe B) à l'état basal.

	Témoins <i>n</i> =21	Tous les obèses <i>n</i> =24	Groupe A: Ins < 9,55 mU/L <i>n</i> =9	Groupe B: Ins > 9,55 mU/L <i>n</i> =15	Anova ^o <i>P</i>
Age (an)	35,4 ± 2,2	35,7 ± 2,2	40,9 ± 1,2	32,6 ± 3,3	NS
IMC (kg/m ²)	21,0 ± 0,4	32,5 ± 0,9 ^f	31,1 ± 0,7 ^f	33,3 ± 1,3 ^f	<0,0001
Tour de taille (cm)	71,0 ± 1,2	95,4 ± 1,4 ^f	93,8 ± 1,7 ^f	96,5 ± 2,1 ^f	<0,0001
Rapport taille/ hanches	0,76 ± 0,01	0,83 ± 0,01 ^f	0,84 ± 0,03 ^e	0,82 ± 0,01 ^e	<0,0005
Masse grasse (en %)	24,6 ± 1,4	45,2 ± 1,0 ^f	44,0 ± 1,3 ^f	45,9 ± 1,4 ^f	<0,0001
Glycémie (mmol/L)	4,77 ± 0,13	5,14 ± 0,11 ^a	5,24 ± 0,16	5,08 ± 0,15	NS
Insulinémie à jeun (mU/L)	4,6 (4,1-6,0)	10,6 ± 0,7 ^f	6,9 ± 0,4 ^a	12,8 ± 0,6 ^{f**}	<0,0001
HOMA	1,0 ± 0,1	2,4 ± 0,2 ^f	1,6 ± 0,1 ^a	2,9 ± 0,1 ^{f**}	<0,0001
Triglycérides (TG) (mmol/L)	0,73 ± 0,06	1,11 (0,72-1,52) ^d	1,27 ± 0,23 ^c	1,16 (0,65-1,46) ^a	<0,005
Cholestérol total (CT) (mmol/L)	4,82 ± 0,15	5,42 ± 0,20 ^a	5,89 ± 0,35 ^c	5,07 ± 0,18 [*]	<0,005
Cholestérol HDL (g/L)	0,67 ± 0,03	0,54 ± 0,03 ^b	0,58 ± 0,03	0,52 ± 0,04 ^b	<0,05
Cholestérol LDL (g/L)	1,04 ± 0,05	1,30 ± 0,07 ^b	1,46 ± 0,12 ^c	1,21 ± 0,08	<0,005

Les valeurs correspondent à des moyennes ± SEM ou des médianes avec le 25 ième et le 75 ième percentile (pour les distribution log normale).

Anova^o: entre le groupe de témoins, le groupe A et le groupe B.

^a *P* < 0,05, ^b *P* < 0,01, ^c *P* < 0,005, ^d *P* < 0,001, ^e *P* < 0,0005, ^f *P* < 0,0001, comparé au groupe témoin.

* *P* < 0,05, ** *P* < 0,0001, groupe B comparé au groupe A.

A.2- COMPOSITION EN PHOSPHOLIPIDES DE LA MEMBRANE D'HEMATIE

Le tableau 16 rassemble les données concernant le CL et les classes majeurs de phospholipides détectées dans la membranes d'hématie, ainsi que le rapport CL/ PL.

Les teneurs en CL et SM membranaires (**dans la population totale des femmes obèses**) sont significativement plus élevés que dans le groupe des témoins ($P < 0,05$). Les teneurs en PI sont significativement plus faibles ($P < 0,05$).

Le CL membranaire et le rapport Chol/PL dans le groupe A sont significativement plus élevés que dans le **groupe des témoins** ($P < 0,05$).

La SM dans le **groupe B hyperinsulinémique**, est significativement plus élevée que dans le groupe des **témoins** ($P < 0,05$). Par contre, les quantités de PI sont significativement plus faibles ($P < 0,05$). De plus, le **groupe B** est caractérisé par des teneurs élevés en PE et en phospholipides totaux par rapport au **groupe A** (respectivement, $P < 0,01$, $P < 0,005$) et par rapport au groupe des témoins ($P < 0,05$, $P < 0,05$).

A.2.1- Corrélations simples entre les marqueurs de l'insulino-résistance et les paramètres anthropométriques, plasmatiques et phospholipides membranaires

Afin de cerner les relations pouvant exister entre les marqueurs de l'obésité, de l'insulino-résistance et les propriétés structurales et dynamiques de la membrane érythrocytaire, une étude de corrélation entre l'insulinémie à jeun et les paramètres cliniques et membranaires a été réalisée au sein de la population totale.

Ce regroupement paraît justifié par le fait que 9 des 21 femmes témoins ont un % de masse grasse supérieur à 25% et comme signalé précédemment, il y a un recouvrement des insulinémies entre le groupe des obèses et le groupe des témoins.

L'insulinémie à jeun est corrélée positivement avec l'IMC ($r = 0,719$, $P < 0,0001$), le tour de taille ($r = 0,728$, $P < 0,0001$), le rapport taille/hanche ($r = 0,367$, $P < 0,05$), la masse grasse ($r = 0,675$, $P < 0,0001$), les TG ($r = 0,514$, $P < 0,0005$), et négativement avec le cholestérol HDL ($r = -0,543$, $P < 0,0005$).

Pour les **paramètres membranaires**, l'insulinémie à jeun est corrélée positivement avec les phospholipides totaux ($r = 0,503$, $P < 0,0005$), la PE ($r = 0,458$, $P < 0,005$), la SM ($r = 0,466$, $P < 0,005$), la PC ($r = 0,364$, $P < 0,05$), et négativement avec la PI ($r = -0,332$, $P < 0,05$).

Des corrélations similaires ont été obtenues avec le HOMA.

Tableau 16: Paramètres membranaires des femmes témoins, de tous les obèses et des groupes A et B, à l'état basal.

	Témoins <i>n</i> =21	Tous les obèses <i>n</i> =24	Groupe A <i>n</i> =9	Groupe B <i>n</i> =15	Anova° <i>P</i>
A l'état basal					
Cholestérol membranaire (CL)	239 ± 13	284 ± 14 ^a	297 ± 20 ^a	277 ± 16	0,06
Phosphatidyléthanolamin (PE)	265 ± 9	277 ± 8	250 ± 11	293 ± 8 ^{a**}	< 0,05
Phosphatidylinositol (PI)	66 ± 7	48 ± 4 ^a	55 ± 7	44 ± 4 ^a	<0,05
Phosphatidylsérine (PS)	125 ± 6	123 ± 5	113 (105-119)	127 ± 7	NS
Phosphatidylcholine (PC)	239 ± 11	248 ± 8	229 ± 13	260 ± 10	NS
Sphingomyéline (SM)	92 ± 4	103 ± 4 ^a	96 ± 4	107 ± 5 ^a	0,05
Phospholipides totaux (PL)	762 ± 21	796 ± 14	748 ± 19	824 ± 14 ^{a***}	< 0,05
CL/PL	0,32 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,40 ± 0,03 ^a	0,34 ± 0,02	0,07
Anisotropie <r> (DPH)	0,248 ± 0,001	0,246 ± 0,001	0,245 ± 0,002	0,246 ± 0,001	NS

PE, PI, PS, PC, SM et CL: en µg/mg de protéines; les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM ou aux médianes avec le 25 ième et le 75 ième percentile (pour les distributions log normale).

Anova: entre le groupe témoins, le groupe A et le groupe B.

^a $P < 0,05$, ^b $P < 0,01$ comparés au groupe témoin.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$, **** $P < 0,001$, groupe B comparé au groupe A.

A.2.2- Analyse de régression multiple

Une analyse de régression multiple dans la **population totale** a montré que la PE, la SM, le % de masse grasse et les TG étaient des prédicteurs des 2 indices d'insulino-résistance (r^2 ajusté = 0,689, $P < 0,0001$).

Dans le **groupe des obèses**, la PE et la SM membranaires, le rapport CL/PL et le cholestérol HDL plasmatique expliquent majoritairement la variance de l'insulinémie à jeun (r^2 ajusté = 0,673, $P < 0,0001$) après ajustement sur le % de masse grasse. De même, la PE membranaire, le rapport CL/PL et le cholestérol HDL plasmatique expliquent majoritairement la variance du HOMA (r^2 ajusté = 0,613, $P < 0,0001$)

Dans le cas des **témoins**, seules la PE et la SM sont des prédicteurs de l'insulinémie plasmatique (r^2 ajusté = 0,372, $P < 0,01$), et du HOMA (r^2 ajusté = 0,383, $P < 0,005$).

A.3- COMPOSITION EN ACIDES GRAS

Les tableaux 17a et 17b rassemblent les données concernant la composition en acides gras totaux de la membrane érythrocytaire des femmes témoins, de la population totale des obèses et des groupes A et B à l'état basal. Pour faciliter la lecture des résultats, un schéma du métabolisme des acides gras est donné à la figure 23.

Le **groupe entier de femmes obèses** est caractérisé par une diminution significative des acides gras n-6 ($P < 0,005$), en particulier de l'acide linoléique C18:2n-6 ($P < 0,05$) et de l'acide arachidonique C20:4n-6 ($p < 0,05$). Le rapport n-6/n-3 est également significativement diminué par rapport au groupe témoin ($p < 0,01$). En revanche, l'acide érucique est significativement augmenté ($P < 0,05$).

Le **groupe B (obèses hyperinsulinémiques)** a une diminution significative des acides gras n-6 ($P < 0,005$), en particulier de l'acide arachidonique C20:4n-6 ($P < 0,05$), du rapport n-6/n-3 ($P < 0,01$) par rapport au groupe témoin.

En revanche, le **groupe A (obèses insulino-sensibles)** présente une diminution significative des acides gras n-6 ($P < 0,05$) par rapport au groupe témoin et en particulier de l'acide eicosadiénoïque C20:2n-6 par rapport au groupe témoin ($P < 0,005$) et au sous groupe B ($P < 0,0005$).

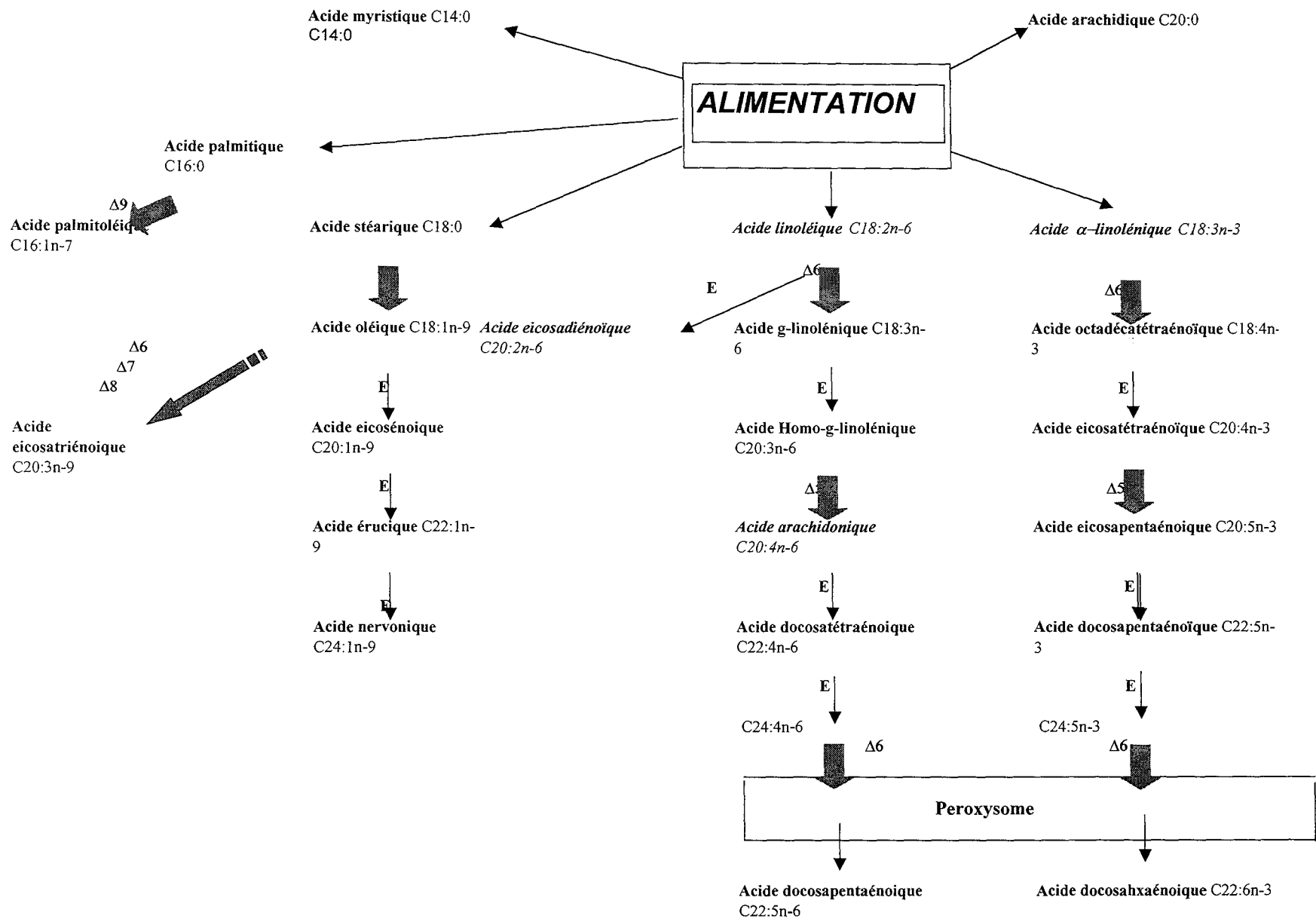


Figure 21: Métabolisme des acides gras n-3, n-6, et n-9.
 E=élongase, Δ = désaturase

A.3-1 Corrélations simples entre les marqueurs de l'insulino-résistance et les acides gras membranaires

L'analyse de corrélation dans la **population totale (obèses et témoins)** montre que l'insulinémie est corrélée négativement aux acides gras n-6 ($r = -0,383$, $P < 0,05$) et en particulier à l'acide arachidonique ($r = -0,419$, $P < 0,005$), au rapport n-6/n-3 ($r = -0,421$, $P < 0,005$) et positivement à l'acide palmitoléique ($r = 0,358$; $P < 0,05$), à la $\Delta 9$ désaturase 1 ($r = 0,345$; $P < 0,05$) et aux acides gras n-3 ($r = 0,344$, $P < 0,05$).

Chez les **obèses**, l'insulinémie est corrélée négativement à l'acide eicosénoïque C20:1n-9 ($r = -0,521$; $P < 0,01$), l'acide arachidonique ($r = -0,487$; $P < 0,05$) et positivement à l'acide eicosadiénoïque C20:2n-6 ($r = 0,420$, $P < 0,05$) et à l'acide lignocérique ($r = 0,393$, $P < 0,05$).

Dans le **groupe témoin**, l'insulinémie est uniquement corrélée positivement à l'acide oléique ($r = 0,471$; $P < 0,05$) et à la $\Delta 9$ désaturase 2 ($r = 0,531$, $P < 0,05$).

Des corrélations pratiquement identiques sont obtenues avec le HOMA.

A.3.2- Analyse de régression pas à pas

Une analyse de régression multiple pas à pas a été entreprise pour identifier les déterminants spécifiques indépendants de l'insulinémie à jeun.

Dans la **population totale** (obèses et témoins), les acides palmitoléique C16:1n-7, arachidonique C20:4n-6 et les acides gras n-3 expliqueraient 12,8, 10,8 et 9% respectivement de la **variance de l'insulinémie à l'état basal** (r^2 ajusté = 0,276, $P < 0,005$).

Dans la seule **population des obèses**, un modèle permet d'expliquer l'insulinémie à jeun par l'acide **arachidonique** (23,7%) et l'acide **eicosadiénoïque** C20 :2n-6 (17,9%) avec un r^2 ajusté égal à 0,360, $P < 0,005$. Toutefois, on peut retenir un second modèle qui inclut l'acide **arachidonique** (23,7%) et l'acide **lignocérique** (15,4%) avec un r^2 ajusté égal à 0,332, $P < 0,01$.

Tableau 17a et 17b: Composition en acides gras totaux de la membrane érythrocytaire des femmes témoins, de la population totale des obèses et des groupes A (Ins < 9,55 mU/L) et B (Ins > 9,55 mU/L) à l'état basal.

Tableau 17a

	Témoins <i>n=21</i>	Population totale d'obèse <i>n=24</i>	Groupe A Ins < 9,55 mU/L <i>n=9</i>	Groupe B Ins > 9,55 mU/L <i>n=15</i>	Anova ^o
Acide palmitique C16:0	29,14 ± 0,91	28,98 ± 0,65	28,78 ± 0,93	29,10 ± 0,91	
Acide palmitoléique C16:1n-7	0,75 ± 0,16	1,06 ± 0,16	0,96 ± 0,20	1,12 ± 0,23	
Acide stéarique C18:0	22,49[20,84-25,29]	24,46 ± 1,08	25,22 ± 1,88	24,01 ± 1,35	
Acide oléique C18:1n-9	9,45 ± 0,72	9,18[7,55-12,31]	11,42 ± 1,48	8,38[7,55-10,60]	
Acide linoléique C18:2n-6	8,24 ± 0,64	6,82 ± 0,39 ^a	6,76[6,42-7,28]	7,08 ± 0,49	
Acide α-linolénique C18:3n-3	0,94 [0,33-1,27]	0,48[0,09-1,52]	0,52[0,36-0,66]	0,18[0,08-2,57]	
Acide arachidique C20:0	0,69[0,39-1,13]	1,12[0,48-1,79]	1,31 ± 0,42	1,10[0,56-1,86]	
Acide eicosénoïque C20:1n-9	0,38[0,22-0,78]	0,79 ± 0,16	1,13 ± 0,25	0,25[0,04-0,91]	
Acide eicosadiénoïque C20:2n-6	0,30[0,18-0,63]	0,22[0,12-0,45]	0,17 ± 0,08 ^c	0,30[0,20-0,55] **	<i>P</i> < 0,001
Acide eicosatriénoïque C20:3n-3	0,83[0,59-1,41]	1,12[0,67-1,64]	1,16[0,81-1,89]	1,09 ± 0,14	
Acide arachidonique C20:4n-6	10,34[9,57-11,16]	9,33 ± 0,29 ^a	9,73 ± 0,29	9,09 ± 0,42 ^a	<i>P</i> < 0,05
Acide eicosapentaénoïque C20:5n-3	0,32[0,23-0,54]	0,31[0,20-0,51]	0,44 ± 0,10	0,28[0,19-0,47]	
Acide béhénique C22:0	1,46 ± 0,27	2,24 ± 0,30	2,17 ± 0,46	2,24[1,41-2,71]	
Acide érucique C22:1n-9	0,94[0,48-1,50]	1,60 ± 0,16	1,64 ± 0,26	1,58 ± 0,21	
Acide docosatétraénoïque C22:4n-6	2,30[1,66-3,65]	2,15 ± 0,16	2,30 ± 0,23	2,06 ± 0,21	
Acide lignocérique C24:0	1,95 ± 0,29	1,38 ± 0,28	0,73 ± 0,30	1,76 ± 0,39	
Acide docosahxaénoïque C22:6n-3	3,66 ± 0,43	4,89[2,66-6,44]	4,23 ± 0,75	4,99[3,07-6,71]	
Acide nervonique C24:1n-9	1,41 ± 0,27	0,94 ± 0,22	0,86 ± 0,36	0,99 ± 0,29	

Les valeurs correspondent aux moyennes ± erreur standard (valeurs exprimées en pourcentage) ou médianes avec le 25^{ième} et le 75^{ième} percentile (pour les distributions suivant une log normale).

^a *P* < 0,05; ^b *P* < 0,01 ; ^c *P* < 0,005 ; comparé au groupe témoin.

* *P* < 0,05 ; ** *P* < 0,0005 ; groupe A comparé au groupe B.

Anova^o entre groupe témoin, groupe A et B.

Tableau 17b

	Témoins <i>n</i> =21	Population totale d'obèse <i>n</i> =24	Groupe A Ins < 9.55 mU/L <i>n</i> =9	Groupe B Ins > 9.55 mU/L <i>n</i> =15	Anova ^o
SFA (somme des saturés)	57,45 ± 1,22	58,61 ± 1,16	58,22 ± 1,70	58,84 ± 1,60	
UFA(somme des insaturés)	42,56 ± 1,23	41,26 ± 1,15	41,56 ± 1,64	41,08 ± 1,59	
PUFA(somme des polysaturés)	28,70 ± 0,87	26,58 ± 0,86	25,54 ± 1,08	27,21 ± 1,22	
MUFA(somme des monosaturés)	13,86 ± 0,89	12,89[11,54-16,25]	16,02 ± 1,41	12,13[11,1-15,17]	
PUFA/SFA	0,509 ± 0,024	0,462 ± 0,022	0,444 ± 0,026	0,474 ± 0,033	
Somme des acides gras (n-9)	13,12 ± 0,87	11,82[10,88-15,14]	15,06 ± 1,49	10,95[11-12,74]	
Somme des acides gras (n-6)	22,45 ± 1,02	18,67 ± 0,50 ^c	18,58 ± 0,86 ^a	18,73 ± 0,64 ^c	<i>P</i> < 0,01
Somme des acides gras (n-3)	6,25 ± 0,46	7,53[6,31-8,81]	6,97 ± 0,54	7,80[6,31-9,39]	
n-6/n-3	3,40[2,54-4,61]	2,51[2,04-2,95] ^b	2,83 ± 0,31	2,50[1,93-2,86] ^b	<i>P</i> < 0,05
□9 desat1 (C16:1-7/C16:0)	0,027 ± 0,006	0,037 ± 0,005	0,035 ± 0,070	0,038 ± 0,07	
□9 desat2(C18 :1-9/C18:0)	0,416 ± 0,039	0,458 ± 0,049	0,50 ± 0,09	0,38[0,25-0,55]	

Les valeurs correspondent aux moyennes ± erreur standard (valeurs exprimées en pourcentage) ou médianes avec le 25^{ième} et le 75^{ième} percentile (pour les distributions suivant une log normale).

^a *P* < 0,07; ^b *P* < 0,05; ^c *P* < 0,01 ; ^d *P* < 0,005 ; comparé au groupe témoin.

* *P* < 0,05 ; ** *P* < 0,005 groupe A comparé au groupe B.

Anova^o entre groupe témoin, groupe A et B.

B- APRES UN REGIME HYPOCALORIQUE DE 3 MOIS

B.1- CARACTERISTIQUES ANTHROPOMETRIQUES, METABOLIQUES ET LIPIDIQUES

Après un régime hypocalorique de 3 mois, sur les 24 obèses, 23 ont perdu du poids et le poids d'une patiente est resté stable.

La moyenne de la perte de poids est de $4,7 \pm 0,6$ kg, ($-5,7 \pm 0,7$ %), soit une diminution du IMC de $32,5 \pm 0,9$ à $30,6 \pm 0,9$ kg/ m² ($-5,8$ %, $P < 0,001$).

On enregistre une diminution significative de $4,5 \pm 0,8$ % du tour de taille ($P < 0,001$), de $1,7 \pm 0,5$ % du rapport taille/ hanche ($P < 0,01$), de $4,1 \pm 0,5$ kg (soit $-11,3 \pm 1,4$ %) de la masse grasse ($P < 0,001$), et seulement de $0,4 \pm 0,3$ kg de la masse maigre.

L'insulinémie à jeun est diminuée significativement ($-10,2 \pm 5,4$ %, $P < 0,05$) tout en demeurant supérieur à celle du groupe témoin. La baisse du HOMA ($-8,4 \pm 5,8$ %, $P = 0,08$) n'est pas significative. La glycémie, les TG et le cholestérol HDL ne varient pas. Par contre, on observe une baisse significative du CT ($-5,6$ %, $P < 0,05$) et du cholestérol LDL ($-6,9$ %, $P < 0,05$).

Les variations de ces paramètres ont également été étudiées dans les groupe A et B.

La perte de poids est similaire dans le groupe A ($-5,9 \pm 1,1$ %) et le groupe B ($-5,5 \pm 0,9$ %). Cependant, **le groupe B, insulino-résistant, présente une diminution significative de l'insulinémie à jeun** ($-18,8 \pm 6,1$ %, $P < 0,01$) **et du HOMA** ($-16,2 \pm 7,5$ %, $P < 0,05$). En revanche, le groupe A, insulino-sensible, ne présente pas de variations significatives de l'insulinémie et du HOMA.

B.2- COMPOSITION EN PHOSPHOLIPIDES DE LA MEMBRANE D'HEMATIE

Le tableau 18 rassemble les données concernant les **paramètres membranaires**. Pour faciliter les comparaisons, les données à l'état basal ont été également incluses dans le tableau 17.

Une diminution significative du CL membranaire ($-12,4 \pm 4,4 \%$, $P < 0,05$), et du rapport CL/PL ($-11,1 \pm 4,5 \%$, $P < 0,01$) est observée. La variation des autres paramètres membranaires n'est pas significative.

Les variations des paramètres membranaires ont également été étudiées dans le groupe A et B. La perte de poids est similaire dans le groupe A ($-5,9 \pm 1,1 \%$) et le groupe B ($-5,5 \pm 0,9 \%$). Cependant, **le groupe B, insulino-résistant**, présente une diminution significative du CL membranaire ($-13,7 \pm 5,6 \%$, $P < 0,05$), du rapport CL/PL ($-12,0 \pm 5,4 \%$, $P < 0,05$) et de l'anisotropie de fluorescence du DPH ($-1,71 \pm 0,43 \%$, $P < 0,005$). On note également une diminution de la SM membranaire mais non significative ($-5,1 \pm 3,0 \%$, $P = 0,09$).

Le groupe A, insulino-sensible, ne présente pas de variations significatives des paramètres membranaires après perte de poids. On note, cependant, une diminution significative de la PI membranaire ($-16,4 \pm 9,3 \%$, $P < 0,05$).

En comparant les groupes A et B, seules la PE membranaire et l'anisotropie de fluorescence du DPH varient de façon significative dans le groupe B après perte de poids ($P < 0,001$ et $P < 0,05$ respectivement).

Il n'existe pas de variation significative de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH.

Tableau 18: Paramètres membranaires des femmes témoins, de tous les obèses et des groupes A et B, avant et après perte de poids.

	Témoins <i>n</i> =21	Tous les obèses <i>n</i> =24	Groupe A Ins < 9,55 mU/L <i>n</i> =9	Groupe B Ins > 9,55 mU/L <i>n</i> =15	Anova° <i>P</i>
A l'état basal					
Cholestérol membranaire (CL)	239 ± 13	284 ± 14 ^a	297 ± 20 ^a	277 ± 16	0,06
Phosphatidyléthanolamine (PE)	265 ± 9	277 ± 8	250 ± 11	293 ± 8 ^{a***}	< 0,05
Phosphatidylinositol (PI)	66 ± 7	48 ± 4 ^a	55 ± 7	44 ± 4 ^a	<0,05
Phosphatidylsérine (PS)	125 ± 6	123 ± 5	113 (105-119)	127 ± 7	NS
Phosphatidylcholine (PC)	239 ± 11	248 ± 8	229 ± 13	260 ± 10	NS
Sphingomyéline (SM)	92 ± 4	103 ± 4 ^a	96 ± 4	107 ± 5 ^a	0,05
Phospholipides totaux (PL)	762 ± 21	796 ± 14	748 ± 19	824 ± 14 ^{a***}	< 0,05
CL/PL	0,32 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,40 ± 0,03 ^a	0,34 ± 0,02	0,07
Anisotropie <r> (DPH)	0,248 ± 0,001	0,246 ± 0,001	0,245 ± 0,002	0,246 ± 0,001	NS
Après perte de poids					
Cholestérol membranaire (CL)	239 ± 13	243 ± 12 ⁺⁺⁺	258 ± 17	233 ± 16 ⁺	NS
Phosphatidyléthanolamine (PE)	265 ± 9	264 ± 7	236 ± 11	280 ± 6 ^{****}	< 0,05
Phosphatidylinositol (PI)	66 ± 7	40 (36-54) ^a	43 ± 4 ^{a,+}	50 ± 6 ⁺	< 0,05
Phosphatidylsérine (PS)	125 ± 6	116 ± 4	117 ± 5	115 ± 6	NS
Phosphatidylcholine (PC)	239 ± 11	256 ± 8	250 ± 10	259 ± 11	NS
Sphingomyéline (SM)	92 ± 4	99 ± 4	97 ± 6	100 ± 5	NS
Phospholipides totaux (PL)	762 ± 21	782 ± 15	743 ± 20	805 ± 18	NS
CL/PL	0,32 ± 0,02	0,31 ± 0,02 ⁺⁺	0,34 ± 0,02	0,29 ± 0,02 ⁺	NS
Anisotropie <r> (DPH)	0,248 ± 0,001	0,244 ± 0,001 ^a	0,247 ± 0,001	0,242 ± 0,001 ^{b,*,+++}	< 0,01

PE, PI, PS, PC, SM et CL: en µg/mg de protéines; les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM ou aux médianes avec le 25 ième et le 75 ième percentile (pour les distributions log normale).

Anova: entre le groupe témoin, le groupe A et le groupe B.

^a *P* < 0,05, ^b *P* < 0,01 comparés au groupe témoin.

* *P* < 0,05, ** *P* < 0,01, *** *P* < 0,005, **** *P* < 0,001, groupe B comparé au groupe A.

⁺ *P* < 0,05, ⁺⁺ *P* < 0,01, ⁺⁺⁺ *P* < 0,005, comparaison des groupes obèses à l'état basal et après perte de poids.

B.3- COMPOSITION EN ACIDES GRAS

Les tableaux 19a et 19b rassemblent les données concernant la composition en acides gras totaux de la membrane érythrocytaire, de la population totale des obèses et des groupes A et B après le régime hypocalorique de 3 mois. Les valeurs enregistrées pour les femmes témoins ont été remises dans les tableaux pour comparaison.

B.3.1- Variations par rapport à l'état basal

Des modifications importantes du profil d'acides gras sont observées dans le groupe entier des obèses:

- une diminution significative des acides gras saturés (-12,1 %, $P < 0,005$), dont :
 - l'acide palmitique C16:0 (-6,3 %, $P < 0,05$) et l'acide stéarique C18:0 (-13,6 %, $p < 0,01$).
- une augmentation significative des acides gras insaturés (+17,8 % ; $P < 0,005$) dont :
 - l'acide palmitoléique C16:1n-7 (+150 %, $P < 0,005$), la $\Delta 9$ désaturase 1 (C16:1n-7/C16:0) étant également, significativement augmentée. (+62,5 %, $P < 0,005$)
 - les **acides gras n-6** (+20,2 %, $P < 0,0001$), particulièrement l'acide arachidonique C20:4n-6 (+13,2 %, $P < 0,01$) et l'acide docosatétranoïque C22:4n-6 (+ 73 %, $P < 0,01$).
- Il en résulte une augmentation des acides gras polyinsaturés (+15,5 %, $P < 0,0005$) et du rapport PUFA/SFA (+26 %; $P < 0,0005$).

Des variations pratiquement identiques sont retrouvées dans le sous-groupe B hyperinsulinémique, après perte de poids :

- une diminution significative des acides gras saturés (-12,2%, $P < 0,0005$), dont :
 - l'acide palmitique C16:0 (-8,5%, $P < 0,05$), l'acide stéarique C18:0 (-16,7%, $P < 0,05$), et l'acide arachidique C20:0 (-41,8%, $P < 0,05$).
- une augmentation significative des acides gras insaturés (+17,4%, $P < 0,0005$) dont :
 - l'acide palmitoléique C16:1n-7 (+187,5%, $P < 0,01$), l'activité de la $\Delta 9$ désaturase 1 étant également augmentée (+228,9%, $P < 0,01$).
 - des **acides gras n-6** (+22,4%, $P < 0,0001$), particulièrement de l'acide arachidonique C20:4n-6 (+19,9%, $P < 0,01$) et de l'acide docosatétranoïque C22:4n-6 (+96%, $P < 0,01$).

- Il en résulte une augmentation des acides gras monoinsaturés (+40%, $P < 0,05$), des polyinsaturés (+15,6%, $P < 0,005$) et du rapport PUFA/SFA (+29,1%, $P < 0,005$).

Par contre, dans le sous-groupe A insulino-sensible, après perte de poids, on observe seulement une diminution des acides gras n-9 (-21,3%, $P < 0,05$), une augmentation d'un acide gras saturé : l'acide lignocérique C24:0 (+246%, $P < 0,01$), des acides gras polyinsaturés (+15,4%, $p < 0,05$), dont les acides gras n-6 (+16,4%, $P < 0,05$).

B.3.2- Variations par rapport au groupe témoin.

Après perte de poids, dans le groupe entier des obèses, les anomalies significatives constatées à l'état basal par rapport au groupe témoin au niveau des acides gras n-6, linoléique C18:2n-6, arachidonique C20:4n-6 et érucique C22:1n-9, ont disparu. Toutefois, le rapport n-6/n-3 reste significativement diminué ($P < 0,05$).

En ce qui concerne l'évolution du profil d'acides gras dans les sous groupe A et B, les résultats de l'ANOVA montrent également qu'après perte de poids, les anomalies au niveau des acides gras n-6 dans les sous groupe A et B, l'acide arachidonique C20:4n-6 dans le sous groupe B et l'acide ecosadiénoïque C20:2n-6 dans le sous-groupe A par rapport au groupe témoin ont disparues.

En revanche, des variations significatives dans les proportions de certains acides gras par rapport au groupe témoin sont apparues.

Le groupe entier d'obèses après un régime hypocalorique de 3 mois présente par rapport aux témoins :

- des proportions significativement plus faibles en acides gras saturés (-9,3%, $P < 0,05$), particulièrement l'acide stéarique C18:0 (-5,0%, $P < 0,01$),

- des proportions significativement plus élevées dans les acides gras insaturés (+12,4%, $P < 0,05$), dont :

- l'acide palmitoléique C16:1n-7 (+254,6%, $P < 0,005$), l'activité de la $\Delta 9$ désaturase 1 étant également augmentée (+48,2%, $P < 0,005$).

- les acides gras n-3 (+35,5%, $P < 0,005$), particulièrement l'acide docosahexaénoïque C22:6n-3 (+53,3%, $P < 0,001$).

- Il en résulte une augmentation du rapport PUFA/SFA (+14,3%, $P < 0.05$).
- Le rapport n-6/n-3 qui était significativement diminué à l'état basal reste significativement diminué (-20,9%, $P < 0,05$).

Par comparaison au groupe des témoins, on retrouve pratiquement dans le groupe B hyperinsulinémique les mêmes variations que dans le groupe total des obèses.

- des teneurs significativement plus faibles en acides gras saturés SFA (-10%, $P < 0,005$), en particulier l'acide stéarique (-14,5%, $P < 0,05$),
- des teneurs significativement plus élevées en acides gras insaturés (+13,3%, $P < 0,005$) dont :
 - les monoinsaturés (+21%, $P < 0,05$) et particulièrement l'acide palmitoléique (+329%, $P < 0,0005$), une activité élevée de la d9 désaturase 1 étant également constatée (+29,1%, $P < 0,0005$).
 - les acides gras n-3 (+47%, $P < 0,0005$), en particulier l'acide docosahexaénoïque (+61,2%, $P < 0,005$).
- le rapport PUFA/SFA est significativement augmenté (+20,2%, $P < 0,01$)
- le rapport n-6/n-3 reste significativement diminué (-22,7%, $P < 0,05$).

En revanche, dans le sous groupe A insulino-sensible, on observe aucune variation significative d'acides gras après le régime et ceci par rapport aux témoins.

Tableau 19a et 19b: Composition en acides gras totaux de la membrane érythrocytaire des femmes témoins, de la population totale des obèses et des groupes A (Ins < 9,55 mU/L) et B (Ins > 9,55 mU/L) après perte de poids.

Tableau 18a

	Témoins <i>n=21</i>	Population totale d'obèse <i>n=24</i>	Groupe A Ins < 9,55 mU/L <i>n=9</i>	Groupe B Ins > 9,55 mU/L <i>n=15</i>	Anova ^o
Acide palmitique C16:0	29,14 ± 0,91	27,16 ± 0,54 ⁺	28,04 ± 1,14	26,64 ± 0,52 ⁺	
Acide palmitoléique C16:1n-7	0,75 ± 0,16	2,65 ± 0,53 ^{o,+++}	1,71 ± 0,54	3,22 ± 0,76 ^{o,++}	<i>P</i> < 0,001
Acide stéarique C18:0	22,49[20,84-25,29]	21,14 ± 0,65 ^{o,++}	23,04 ± 1,22	20,00 ± 0,60 ^{o,+,*}	<i>P</i> < 0,05
Acide oléique C18:1n-9	9,45 ± 0,72	10,10 ± 0,56	9,19 ± 0,77	10,64 ± 0,53	
Acide linoléique C18:2n-6	8,24 ± 0,64	7,01[6,63-7,46]	7,17 ± 0,42	7,02[6,70-7,72]	
Acide α-linolénique C18:3n-3	0,94 [0,33-1,27]	0,51[0,16-1,51]	1,29 ± 0,49	0,74 ± 0,20	
Acide arachidique C20:0	0,69[0,39-1,13]	0,66[0,48-0,97]	0,72[0,52-1,48]	0,63 ± 0,08 ⁺	
Acide eicosénoïque C20:1n-9	0,38[0,22-0,78]	0,32[0,20-0,76]	0,46 ± 0,20	0,35[0,26-0,77]	
Acide eicosadiénoïque C20:2n-6	0,30[0,18-0,63]	0,24[0,15-0,74]	0,23[0,16-0,18]	0,24[0,13-0,79]	
Acide eicosatriénoïque C20:3n-3	0,83[0,59-1,41]	1,26 ± 0,11	1,00 ± 0,20	1,42 ± 0,13	
Acide arachidonique C20:4n-6	10,34[9,57-11,16]	10,56 ± 0,33 ⁺⁺	9,98 ± 0,56	10,90 ± 0,39 ⁺⁺	
Acide eicosapentaénoïque C20:5n-3	0,32[0,23-0,54]	0,37[0,28-0,47]	0,28[0,17-0,46]	0,38[0,32-0,47]	
Acide béhénique C22:0	1,46 ± 0,27	1,98 ± 0,19	2,11 ± 0,29	1,89 ± 0,25	
Acide érucique C22:1n-9	0,94[0,48-1,50]	0,70[0,32-1,44]	1,26 ± 0,40	1,03 ± 0,27	
Acide docosatétraénoïque C22:4n-6	2,30[1,66-3,65]	3,72 ± 0,50 ⁺⁺	3,19 ± 0,75	4,04 ± 0,67 ⁺⁺	
Acide lignocérique C24:0	1,95 ± 0,29	2,53 ± 0,28 ⁺	2,53 ± 0,43 ⁺⁺	2,52 ± 0,37	
Acide docosahxaénoïque C22:6n-3	3,66 ± 0,43	5,61 ± 0,32 ^d	5,13 ± 0,68	5,90 ± 0,31 ^e	<i>P</i> < 0,01
Acide nervonique C24:1n-9	1,41 ± 0,27	0,46[0,14-1,68]	0,94 ± 0,34	1,28 ± 0,42	

Les valeurs correspondent aux moyennes ± erreur standard (valeurs exprimées en pourcentage) ou médianes avec le 25^{ième} et le 75^{ième} percentile (pour les distributions suivant une log normale).

^a *P* < 0,05; ^b *P* < 0,01; ^c *P* < 0,005; ^d *P* < 0,001; ^e *P* < 0,0005; comparé au groupe témoin.

* *P* < 0,05 ; groupe A comparé au groupe B.

⁺ *P* < 0,05; ⁺⁺ *P* < 0,01; ⁺⁺⁺ *P* < 0,005; ⁺⁺⁺⁺ *P* < 0,001; ⁺⁺⁺⁺⁺ *P* < 0,0005; ⁺⁺⁺⁺⁺ *P* < 0,0001; l'état basal comparé à l'état après perte de poids.

Anova^o entre groupe témoin, groupe A et B.

Tableau 19b

	Témoins <i>n</i> =21	Population totale d'obèse <i>n</i> =24	Groupe A Ins < 9,55 mU/L <i>n</i> =9	Groupe B Ins >9,55 mU/L <i>n</i> =15	Anova ^o
SFA	57,45 ± 1,22	52,14 [49,62-55,98] ^{a,+++}	57,00 ± 2,38	51,69 ± 0,80 ^{c,++++,*}	<i>P</i> < 0,01
UFA	42,56 ± 1,23	47,83 [44,00-50,38] ^{a,+++}	43,03 ± 2,43	48,22 ± 0,81 ^{c,++++,*}	<i>P</i> < 0,01
PUFA	28,70 ± 0,87	30,71 ± 0,70 ⁺⁺⁺⁺	29,47 ± 1,30 ⁺	31,45 ± 0,78 ^{a,+++}	<i>P</i> = 0,09
MUFA	13,86 ± 0,89	15,57 ± 0,78	13,56 ± 1,49	16,78 ± 0,75 ^{a,+,*}	<i>P</i> = 0,05
PUFA/SFA	0,509 ± 0,024	0,582 ± 0,022 ^{a,++++}	0,531 ± 0,043	0,612 ± 0,021 ^{b,++*,*}	<i>P</i> < 0,05
Somme des (n-9)	13,12 ± 0,87	12,92 ± 0,70	11,85 ± 1,37 ⁺	13,55 ± 0,74	
Somme des acides gras (n-6)	22,45 ± 1,02	22,44 ± 0,57 ⁺⁺⁺⁺⁺	21,63 ± 1,12 ⁺	22,92 ± 0,62 ⁺⁺⁺⁺⁺	
Somme des acides gras (n-3)	6,25 ± 0,46	8,47 ± 0,45 ^c	7,28 ± 0,67	9,19 ± 0,54 ^{c,*}	<i>P</i> < 0,001
Rapport n-6/n-3	3,40 [2,54-4,61]	2,69 [2,20-3,16] ^a	3,09 [2,26-3,67]	2,62 ± 0,16 ^a	<i>P</i> < 0,05
Δ9 desat1 (C16:1-7/C16:0)	0,027 ± 0,006	0,04 [0,01-0,05] ^{c,+++}	0,065 ± 0,023	0,125 ± 0,031 ^{c,++,*}	<i>P</i> < 0,005
Δ9 desat2 (C18 :1-9/C18:0)	0,416 ± 0,039	0,494 ± 0,030	0,421 ± 0,055	0,537 ± 0,031 ^a	<i>P</i> = 0,06

Les valeurs correspondent aux moyennes ± erreur standard (valeurs exprimées en pourcentage) ou médianes avec le 25^{ième} et le 75^{ième} percentile (pour les distributions suivant une log normale).

^a *P* < 0,05; ^b *P* < 0,01; ^c *P* < 0,005; ^d *P* < 0,001; ^e *P* < 0,0005; comparé au groupe témoin.

* *P* < 0,05 ; groupe A comparé au groupe B.

⁺ *P* < 0,05; ⁺⁺ *P* < 0,01; ⁺⁺⁺ *P* < 0,005; ⁺⁺⁺⁺ *P* < 0,001; ⁺⁺⁺⁺⁺ *P* < 0,0005; ⁺⁺⁺⁺⁺ *P* < 0,0001; l'état basal comparé à l'état après perte de poids.

Anova^o entre groupe témoin, groupe A et B.

C- ANALYSE DES RELATIONS ENTRE LES VARIATIONS DES PARAMETRES APRES LE REGIME HYPOCALORIQUE

Dans la population totale des obèses, nous avons étudié les relations entre les variations d'insulinémie entre l'état basal et le régime hypocalorique, et les caractéristiques cliniques, les lipides plasmatiques et les composants membranaire de l'hématie (exprimées en pourcentage de variation entre l'état basal et après perte de poids), en effectuant une analyse de régression linéaire.

Les **variations de l'insulinémie à jeun entre l'état basal et après perte de poids**, sont positivement corrélées avec les variations de l'IMC ($r = 0,573 P < 0,005$), du tour de taille ($r = 0,573 P < 0,01$), de la masse grasse ($r = 0,494 P < 0,05$) (figure 22A).

Elles sont également corrélées avec les variations de l'anisotropie de fluorescence du DPH ($r = 0,615 P < 0,005$), de la SM ($r = 0,516 P < 0,01$) (figure 22B), et négativement corrélées avec les variations de la PE ($r = -0,41 P < 0,05$) (figure 22C).

De plus, **les variations de la SM** sont négativement corrélées avec les variations de la PI ($r = -0,497 P < 0,05$) (figure 22D), et positivement corrélées avec les variations d'anisotropie de fluorescence du DPH ($r = 0,587 P < 0,005$).

Des relations similaires ont été retrouvées avec **les variations du HOMA**.

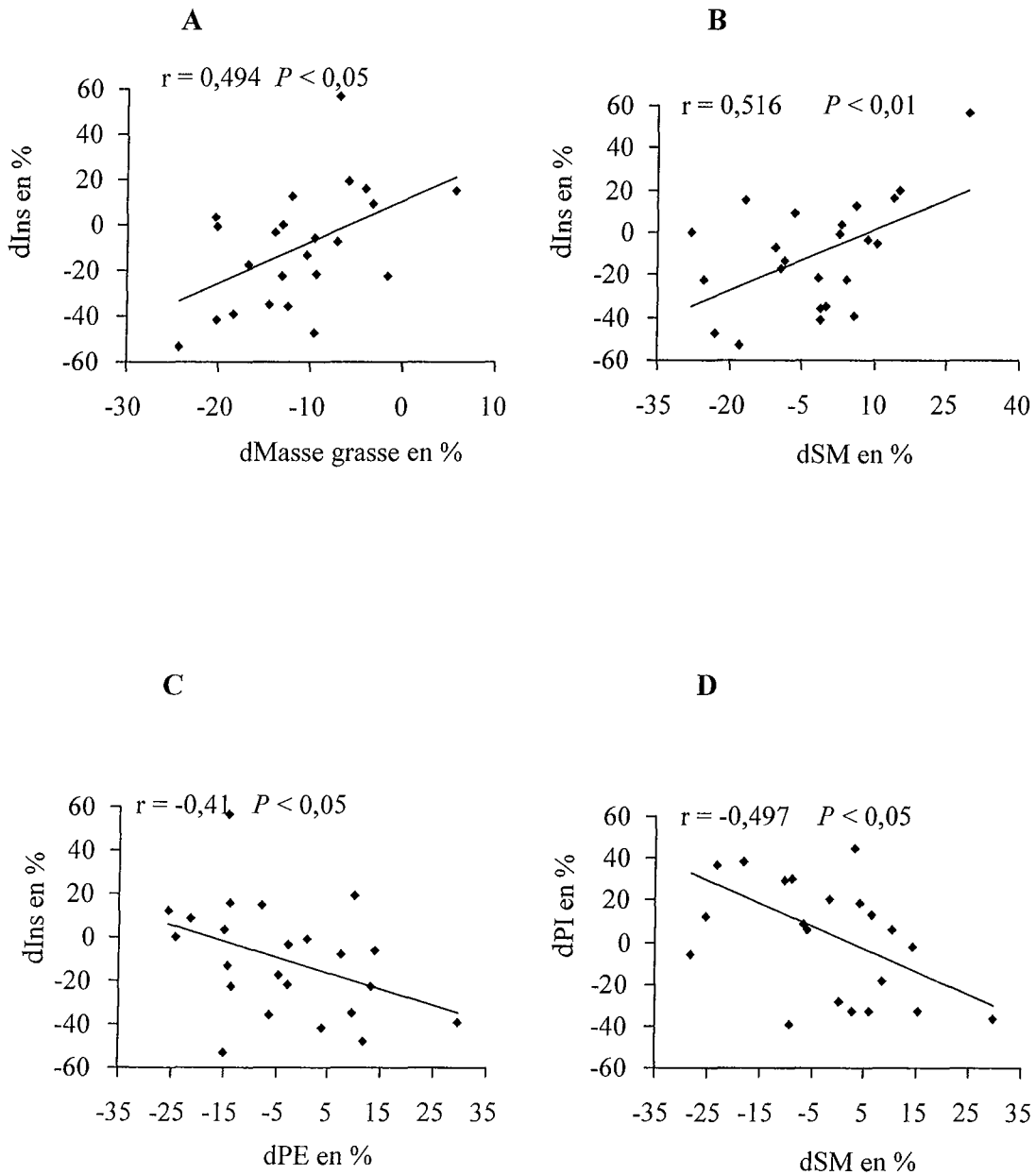


Figure 24: Relations entre les variations d'insulinémie (dIns en %), entre l'état basal et après perte de poids, et les variations du pourcentage de masse grasse (Masse grasse en %) (A), de la SM membranaire (dSM en %) (B), de la PE membranaire (dPE en %) (C), et relation entre les variations de SM membranaire (dSM en %) et les variations de PI membranaire (dPI en %) (D).

En ce qui concerne **les acides gras**, en dépit de variations significatives dans les proportions de nombreux acides gras après perte de poids, l'analyse de corrélation simple dans la population totale des obèses montre que la **variation de l'insulinémie** entre l'état basal et après le régime hypocalorique est **corrélée** uniquement **négativement** à la **variation de l'acide arachidonique C20:4n-6** ($r = -0,417$ $P < 0,05$) (Figure 23).

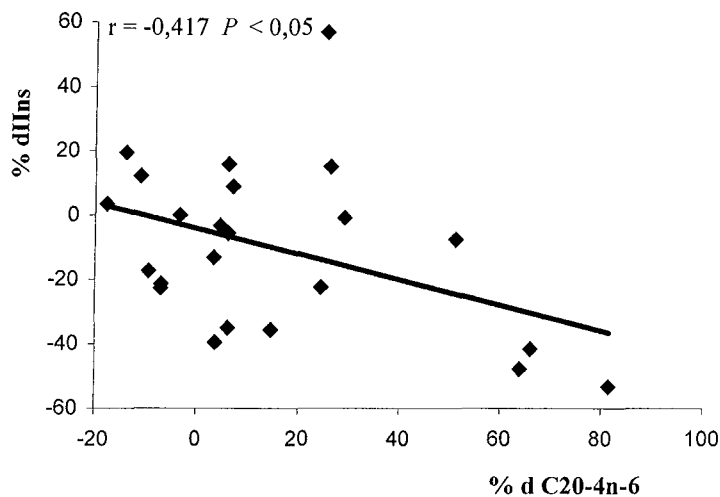


Figure 25: Relations entre les variations d'insulinémie (dIIIns en %), entre l'état basal et après perte de poids, et les variations de l'acide arachidonique (d C20-4n-6 en %).

Cette corrélation se retrouve également dans **le groupe B hyperinsulinémique** ($r = -0,569$, $P < 0,05$) et il faut noter qu'aucune corrélation n'est mise en évidence dans **le groupe A insulino-sensible**.

D- ANALYSE DE REGRESSION PAS A PAS

Une analyse de régression pas à pas a été effectuée pour déterminer les facteurs indépendants les plus significatifs prédictifs de la variation de l'insulinémie à jeun, (tableau 20).

Un modèle de régression pas à pas, très significatif ($r^2 = 0,704$, $P < 0,001$), fait ressortir 3 facteurs (**dMasse grasse**, **dSM** et **dPE**) qui expliquent respectivement 27,8 %, 26,6 % et 20 % de la **variation totale de l'insulinémie**, après le régime hypocalorique de 3 mois.

Des facteurs identiques expliquent **les variations du HOMA**.

Dans le cas des acides gras, les **variations d'insulinémie** à jeun après perte de poids seraient expliquées par les variations des acides **eicosadiénoïque** C20:2n-6 (26,8%) et **arachidonique** C20:4n-6 (15,2%) avec un r^2 ajusté de 0,356, $P < 0,01$.

Afin de préciser la contribution respective des variations des phospholipides et des acides gras dans la variation de l'insulinémie à jeun, une analyse a été effectuée en incluant dans le modèle les phospholipides, le CL, le rapport CL/PL et les acides gras dont les variations sont significatives après perte de poids. La variation de la masse grasse a également été incluse dans le modèle.

Dans **un premier modèle**, la variation de la SM, de la PE et de la masse grasse expliquent respectivement 26,6, 27,8 et 20,0 % des variations de l'insulinémie à jeun (r^2 ajusté = 0,704, $P < 0,0001$).

L'introduction « forcée » dans le modèle de l'acide **arachidonique** C20:4n-6 et de l'acide **eicosadiénoïque** C20:2n-6 fournit un modèle dont le r^2 ajusté est voisin du précédent : 0,709, $P < 0,0001$, la somme des deux acides gras, la masse grasse, la SM et la PE expliquant respectivement 38,4, 14,6, 10,8 et 13,7% des variations de l'insulinémie après perte de poids.

Tableau 20: Modèle de régression pas à pas expliquant la variation de l'insulinémie (dIns (%)) après le régime hypocalorique.

Variable	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
dMasse grasse (%)	0,528	0,278	11,908	< 0,0005
dSM (%)	0,516	0,266	7,607	< 0,05
dPE (%)	-0,463	0,20	18,419	< 0,0001

r^2 ajusté : 0,704; F: 18,419 and $P < 0,0001$.

Variable	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
d C20:4n-6 (%)	-0,397	0,174	4,421	< 0,05
d C20:2n-6 (%)	+0,005	0,384	6,223	< 0,01

r^2 ajusté = 0,322; F = 6,223; $P < 0,01$

III- DISCUSSION

Les résultats antérieurs (Candiloros et al., 1996; Zeghari et al., 2000 (a), chapitre 3) ont montré une corrélation positive entre l'insulinémie à jeun ou le HOMA, et le contenu membranaire en SM chez des sujets obèses.

Les études transversales ne permettent pas de déterminer si l'altération de la composition membranaire est une conséquence de l'obésité associée à l'insulino-résistance ou au contraire, une cause menant à un état d'insulino-résistance.

Dans cette étude, une perte de poids a été utilisée pour la démonstration. En effet, une perte de poids même modérée chez des individus obèses peut améliorer la sensibilité à l'insuline (WHO, 1998; Ziegler et al, 2001; Ross et al, 2000). Par conséquent, l'objectif de ce travail a été de montrer si une perte de poids, généralement associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline et consécutive à un régime hypocalorique, pourrait entraîner des modifications de la composition en phospholipides et en acides gras des membranes cellulaires.

Nos résultats indiquent que **la perte de poids** induite par un régime entraîne globalement une **diminution de l'hyperinsulinémie** et peut **corriger les altérations de la membrane en phospholipides et en acides gras**, tout au moins en partie.

A- INSULINO-RESISTANCE ET COMPOSITION DE LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE EN PHOSPHOLIPIDES

Dans le groupe de 24 femme obèses qui a été étudié, une analyse de régression multiple a montré que les contenus membranaires en **PE** et en **SM** étaient des prédicteurs indépendants de **l'insulinémie** à jeun et/ou du HOMA dans le groupe en surpoids. On obtient le même résultat pour le groupe témoin.

L'observation importante de ce travail réside dans le fait que les variations de SM et de PE membranaires après perte de poids sont aussi des prédicteurs indépendants des variations de

l'insulinémie à jeun ou du HOMA. Les variations de l'insulinémie ou du HOMA sont significativement corrélées avec les variations en SM et en PE après ajustement sur les variations de la masse grasse.

La **première question** était de savoir si une restriction énergétique pouvait jouer un rôle sur la composition lipidique des membranes cellulaires. Dans des modèles animaux, la restriction alimentaire réduit d'au moins 50 % tous les phospholipides des membranes corticales en bordure en brosse de rats (Eiam-Ong et al, 1999). Ce n'est pas le cas au niveau des membranes de mitochondrie et de microsomes de foie (Laganière et Yu, 1993). La restriction alimentaire augmente également la fluidité de membrane d'érythrocyte de rats en croissance (Levin et al, 1992). A notre connaissance, il n'existe aucune donnée concernant les relations entre la restriction énergétique et la composition membranaire en phospholipides chez l'homme.

Dans notre étude, il est intéressant de constater que la classification des femmes obèses en groupes insulino-résistant et insulino-sensible nous a permis de mieux évaluer les effets de la restriction calorique sur la composition lipidique membranaire. En effet, la perte de poids est identique dans les deux sous-groupes mais c'est uniquement dans le sous **groupe hyperinsulinémique** qui voit baisser son insulinémie à jeun que l'on observe des **variations significatives** au niveau des phospholipides et des acides gras.

Dans le groupe obèse insulino-sensible qui ne modifie pas significativement l'insulinémie à jeun après trois mois de restriction calorique, les variations des phospholipides et des acides gras sont minimales. Par conséquent, il semble que ce n'est pas la perte de poids en elle-même qui puisse être reliée aux variations de la composition de la membrane cellulaire mais plutôt la variation d'insulino-sensibilité.

En effet, dans le groupe des **obèses hyperinsulinémiques**, le régime hypocalorique de trois mois a induit à la fois une **amélioration significative** des marqueurs de l'insulino-résistance et une diminution significative du CL membranaire de l'érythrocyte. La **diminution** du contenu membranaire **en SM** tend à être significative. Toutefois, il est important de noter que les femmes obèses du groupe B pour lesquelles la diminution de l'insulinémie à jeun est $> 10\%$ ont une diminution significative du contenu membranaire en SM ($dSM = -7,1 \pm 3,2\%$,

$P < 0,05$, $n = 11$). L'anisotropie de fluorescence du DPH est également diminuée, montrant une **augmentation de la fluidité membranaire**.

L'insulino-résistance est-elle la cause ou conséquence des perturbations des phospholipides membranaires ? Il est impossible de répondre à cette question et on peut avancer deux catégories d'hypothèses.

La première hypothèse est que l'hyperinsulinémie et/ou l'insulino-résistance pourraient être responsables des variations des paramètres membranaires, particulièrement des contenus membranaires en SM et en PE.

Un état d'insulino-résistance peut affecter la composition membranaire en phospholipides à travers **3 mécanismes**: **1)** perturbation des échanges entre les cellules et les lipoprotéines plasmatiques; **2)** la présence dans le plasma de molécules capables de stimuler l'incorporation de phospholipides au niveau membranaire; **3)** un effet sur la synthèse ou le catabolisme des phospholipides.

Premièrement, le flux du cholestérol libre et des phospholipides entre les lipoprotéines et les cellules est bi-directionnel. L'intensité et la direction des flux dépendent du rapport influx/efflux et sont déterminées par les propriétés des cellules et du récepteur (Rothblat et al, 1999). Tous deux peuvent être altérées par l'insulino-résistance. Des modifications de la composition des lipoprotéines ont été observées chez des patients insulino-résistants (Despres et al, 1998, Laasko et al, 1992, Taskinen, 1995). Les variations en PC et en SM plasmatiques sont rapidement transmises à la membrane de l'hématie *in vivo* (Kulschar et al, 1995). Ainsi, le contenu en phospholipides des membranes de l'hématie chez les femmes insulino-résistantes pourrait refléter les modifications des lipoprotéines (Bagdade et al, 1990, MacLean et al, 2000).

Le second mécanisme concerne le **CTAT III** (*chemokine connective tissue-activating peptide III*). Ce peptide libéré par activation des plaquettes sanguines, stimule l'incorporation de la SM cellulaire (Stoekelhuber et al, 2000). Or, une augmentation de l'agrégation des plaquettes est associée à l'insulino-résistance (Ishizuka et al, 1998) et la présence de ce peptide dans le plasma peut accroître le recrutement de la SM au niveau de la membrane de l'hématie.

Finalemment, l'hyperinsulinémie ou l'insulino-résistance peut affecter le métabolisme des phospholipides membranaires. Comme l'insuline est capable de **stimuler la synthèse des phospholipides** (Uchida, 1996), l'état d'hyperinsulinémie peut expliquer la teneur élevée en phospholipides totaux dans le groupe B insulino-résistant. Sachant que la synthèse des phospholipides a lieu au niveau des réticulocytes (Percy et al, 1973, Ballas et Burka, 1974) et que la durée de vie d'un globule rouge est d'environ 115 jours, il est probable que 75 % du pool est renouvelé après 3 mois de régime hypocalorique. De plus, une biosynthèse de phospholipide a été rapportée dans les hématies matures humaines (Strunicka et Folk, 1988). On ne peut exclure le fait que la diminution de l'insuline plasmatique après perte de poids puisse jouer un rôle dans la composition en phospholipide des membranes d'hématie.

La seconde interprétation repose sur le fait que l'insulino-résistance est une conséquence des modifications de composition membranaire en phospholipides.

La SM et la PE membranaire qui **expliquent majoritairement la variation de l'insulinémie à jeun**, peuvent avoir un rôle dans la transduction du signal de l'insuline. La SM est un phospholipide rigidifiant pouvant affecter la voie de signalisation de l'insuline. L'hydrolyse de la SM par le TNF- α génère une choline et un céramide pouvant servir de second messenger activant des kinases et des phosphatases spécifiques (Long et Pekala, 1996). Un enrichissement en SM inhibe l'activité de la tyrosine kinase des membranes plasmiques de foie de rat (Gavrilova et al, 1993), diminue l'activité de la phosphodiesterase phosphoinositol activée par le diacylglycérol (Dawson et al, 1985), et le transport du glucose dans des vésicules de phospholipides (Sandra et al, 1984). En dépit du fait que les variations de fluidité membranaire dans notre étude sont faibles, elles peuvent avoir un impact physiologique important. Récemment, il a été rapporté que de faibles variations dans les propriétés structurales et dynamiques de la membrane peuvent modifier de façon marquante l'entrée du D-glucose dans la cellule (Fernandez et al., 1984), les caractéristiques de liaison de l'insuline avec son récepteur (Ginsberg et al., 1981), et la « down-regulation » des récepteurs à l'insuline dans les membranes érythrocytaires (Mazella et al., 1995). Enfin, nous avons montré qu'une accumulation de SM dans les adipocytes en culture, diminue l'expression du facteur de transcription du PPAR γ , fortement impliqué dans l'insulino-sensibilité.

Par contre, le rôle de la PE membranaire est moins clair mais ce phospholipide qui a déjà été mis en évidence chez les enfants obèses, peut intervenir dans la régulation de la transduction du signal de l'insuline. Une augmentation de la PE membranaire provoquant une augmentation de l'espacement des têtes des phospholipides dans la bicouche lipidique est étroitement associée à une diminution de l'activité de la protéine kinase C (Slater et al, 1994).

B- INSULINO-RESISTANCE ET COMPOSITION DE LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE EN ACIDE GRAS

Dans le groupe des obèses, une analyse de régression multiple pas à pas révèle que l'**acide arachidonique** C20:4n-6 explique la variance de l'insulinémie à l'état basal, avec comme autre déterminant l'**acide eicosadiénoïque** C20:2n-6 dans un premier modèle et l'**acide lignocérique** C24:0 dans un second modèle.

Après perte de poids, on observe des variations significatives de certains acides gras qui sont le fait de variations dans le groupe B hyperinsulinémique, les variations dans le groupe A étant tout à fait minimales, phénomène identique à celui trouvé pour les variations des phospholipides. Dans le groupe B hyperinsulinémique, on observe des variations significatives particulièrement au niveau des acides gras n-6: une augmentation de deux acides gras: les acides arachidonique C20:4n-6 et docosatétraoïque (C22:4n-6) par rapport à l'état basal mais qui correspond à une normalisation par rapport au groupe témoin. Il en résulte une diminution des acides gras saturés par rapport à la fois à l'état basal et au groupe témoin, une augmentation des acides gras insaturés et polyinsaturés par rapport à l'état basal et au groupe témoin.

En dépit de ces variations significatives au niveau de nombreux acides gras, il ressort d'une analyse de régression pas à pas que seules les variations des **acides arachidonique** et **eicosadiénoïque** C20:2n-6 expliqueraient les variations de l'insulinémie à jeun. Ces résultats confirment l'importance de ces deux acides gras mise en évidence à l'état basal.

B.1- ACIDE ARACHIDONIQUE

Une corrélation négative entre l'insulino-résistance et l'**acide arachidonique (C20:4n-6)** a été trouvée dans le muscle chez des sujets sains et des patients atteints de pathologies coronariennes (Borkman et al., 1993). En revanche, chez des sujets sains âgés de 70 ans, seul l'acide palmitique est relié significativement à l'insulino-sensibilité (Vessby et al., 1994). Ces différences peuvent être liées au fait que la composition en acides gras de la membrane érythrocytaire ne peut que refléter partiellement celle de la cellule musculaire (Baur et al., 1998; Di Marino et al., 2000). En ce qui concerne la membrane érythrocytaire, une relation inverse entre l'insulinémie à jeun et la proportion d'acide arachidonique a été trouvée chez des sujets sains (Clifton et Nestel, 1998). La proportion d'acide arachidonique est également diminuée chez des diabétiques de type 2 présentant une hyperinsulinémie par rapport aux patients sans hyperinsulinémie (Yang et Dang, 1998). Par contre, chez des enfants obèses, la corrélation négative entre l'insulinémie et l'acide arachidonique n'est pas retrouvée dans les membranes érythrocytaires (Agostoni et al., 1994).

Cette diminution de l'acide arachidonique peut être liée à une inhibition des désaturases. Une inhibition de la $\Delta 5$ désaturase est associée à l'insulino-résistance au cours de l'obésité chez les Indiens Pima (Pan et al., 1995), chez des enfants obèses hyperinsulinémiques (Desci et al., 2000) et chez des patients atteints de pathologies coronariennes (Borkman et al., 1993).

B.2- ACIDE EICOSADIENOÏQUE

En ce qui concerne l'**acide eicosadiénoïque (C20:2n-6)**, produit de l'élongation de l'acide linoléique, c'est la première fois à notre connaissance qu'une relation est observée entre cet acide gras minoritaire et l'insulino-résistance. Peu de données existent dans la littérature. Michailov, 1979, ont observé une augmentation de cet acide gras chez le rat hypertendu qui peut être considéré comme un modèle animal de l'insulino-résistance (Grinsell et al., 2000; Collison et al., 2000).

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette relation entre l'acide eicosadiénoïque et l'insulinémie à jeun.

Elle est peut-être la conséquence de l'inhibition des désaturases conduisant à l'acide arachidonique au profit de l'élongase qui donne naissance à l'acide eicosadiénoïque. L'activation de l'élongase peut être également liée à des facteurs nutritionnels, en particulier

les acides gras trans. En effet, Berdeaux et al., (1998) ont montré que l'élongase avait une meilleure affinité pour l'isomère 9trans, 12cis 18:2 que pour les isomères 9cis, 12cis 18:2 et 9cis,12trans 18 :2.

La relation entre l'acide eicosadiénoïque et l'insulino-résistance peut être liée à une interaction préférentielle de cet acide gras avec certains phospholipides. Dans des cellules de hamster, l'acide eicosadiénoïque est majoritairement incorporé au niveau de la phosphatidylcholine de la membrane plasmique (Masui et al., 1997). Or, dans le groupe A insulino-sensible, on enregistre à la fois un faible contenu membranaire en phosphatidylcholine et une faible teneur en acide eicosadiénoïque, cet acide gras n'étant pas détecté chez 5 des 9 patients.

Par ailleurs, l'acide diméthyl eicosadiénoïque, métabolite de l'acide eicosadiénoïque, est un inhibiteur de la PLA2, enzyme responsable de la libération de l'acide arachidonique en position 2 des glycérophospholipides (Chen et al., 1998). Or, il est bien connu que l'acide arachidonique généré par la PLA2 active une SMase membranaire qui hydrolyse la SM en choline et céramide (Jajadev et al., 1994; Johns et Webb, 1998). Si l'on admet que la composition en phospholipides de la membrane érythrocytaire reflète, *in vivo*, celles d'autres types cellulaires, on peut faire l'hypothèse que l'acide eicosadiénoïque pourrait avoir un rôle dans la composition membranaire en phospholipides. En effet, le groupe B hyperinsulinémique est caractérisé par une teneur plus importante en SM membranaire et en acide eicosadiénoïque par rapport au groupe A insulino-sensible

B.3- ACIDE LIGNOCERIQUE

L'acide lignocérique (C24:0) corrélé positivement à l'insulinémie dans le groupe des obèses ($P = 0,05$), explique également la variance de l'insulinémie. Cet acide gras minoritaire est trouvé essentiellement dans la SM où il représente de 15,7 % (Van Dijck, 1979) à 46,4 % (Dougherty et al., 1987) des acides gras de ce sphingolipide dans la membrane d'hématie humaine. Les autres acides gras de la SM sont les acides nervonique (C24:1n-9), palmitique (C16:0), béhénique (C22:0) et stéarique (C18:0). Dans notre étude, la grande majorité du groupe B insulino-résistant est caractérisée par des teneurs élevées en acide lignocérique (C24:0) et nervonique (C24:1n-9) et par des teneurs faibles en acide stéarique et béhénique, à l'inverse du groupe A insulino-sensible. Des différences dans la proportion des acides gras de la SM ont été également observées entre les populations américaines, italiennes et

finlandaises. La membrane érythrocytaire de la population finlandaise contient une SM enrichie en acide stéarique et béhénique et appauvrie en acide lignocérique et nervonique, à l'inverse des membranes érythrocytaires de la population américaine. Ces résultats suggèrent que l'acide lignocérique pourrait jouer un rôle dans l'insulinorésistance, et va dans le même sens que des travaux antérieurs *in vitro*. En effet, l'addition de la SM dans les cultures d'adipocytes 3T3-F442A inhibe l'expression du PPAR γ , l'inhibition étant maximale lorsque la SM contient de l'acide lignocérique (Al-Makdissy et al., 2001).

B.4- APRES LE REGIME HYPOCALORIQUE DE 3 MOIS

Une variation positive du taux d'acide arachidonique et négative du taux d'acide eicosadiénoïque sont des prédicteurs indépendants de l'amélioration de l'insulino-sensibilité. A notre connaissance, il n'existe pas de données concernant une relation entre un enrichissement de la membrane de l'hématie humaine en acide arachidonique et l'augmentation de l'insulino-sensibilité après une perte de poids. Les seules données disponibles concernent le plasma et le tissu adipeux et dans ces travaux, aucun élément n'est fourni sur des modification éventuelles de l'insulino-sensibilité des patients. Une perte de poids chez des obèses est associée à une normalisation du taux d'acide arachidonique dans les phospholipides plasmatiques (Phinney, 1996). Un régime hypocalorique riche en acides gras polyinsaturés chez des adolescents obèses est associé à une baisse de l'acide linoléique et à une augmentation de l'acide arachidonique dans les phospholipides plasmatiques (Zwiawer et Widhalm, 1987). En ce qui concerne le tissu adipeux, une perte de poids modérée sur une courte durée (6 semaines), n'affecte pas ou très peu sa composition en acide gras (Rossner et al., 1989).

On peut émettre plusieurs hypothèses pour expliquer l'augmentation membranaire de l'acide arachidonique C20:4n-6 et la diminution de l'acide eicosadiénoïque C20:2n-6.

L'augmentation de l'acide arachidonique C20:4n-6 membranaire reflèterait une augmentation de l'activité des désaturases et des élongases au niveau du foie .

Une augmentation des acides gras n-6 polyinsaturés au niveau plasmatique a également été observée (Bonfont-Rousselot et al., 1999), résultant probablement d'une augmentation des désaturases et élongases de la voie métabolique des acides gras n-6. Par ailleurs, une augmentation de l'acide arachidonique C20:4n-6 et une baisse de l'acide linoléique C18:2n-6

au niveau du cholestérol estérifié ont été rapportés après un régime hypocalorique de 2 semaines chez des femmes obèses (Schouten et al., 1981).

Enfin, l'augmentation de l'acide arachidonique membranaire reflèterait une modification de l'équilibre de l'incorporation des acides gras dans les phospholipides et/ou le cholestérol estérifié au niveau du foie. Une production de l'acide arachidonique déplacerait l'équilibre vers l'incorporation au niveau des phospholipides (Phinney, 1996).

En ce qui concerne **la diminution de l'acide eicosadiénoïque C20:2n-6**, elle résulte probablement de la balance entre l'élongase responsable de la production de l'acide eicosadiénoïque à partir de l'acide linoléique et les désaturases responsables de la formation de l'acide arachidonique.

En dépit de données plus importantes sur les acides gras que sur les phospholipides, membranaires, **la question** que l'insulino-résistance peut être la cause ou la conséquence des modifications des acides gras membranaires **reste posée**.

Un état d'insulino-résistance peut être à l'origine des modifications en acides gras des membranes cellulaires.

La perte de poids ne provoque pas seulement une diminution des particules riche en cholestérol, mais aussi des modifications de leur composition en acide gras ayant pour résultat une amélioration de l'insulino-sensibilité (Bonnetfont-Rousselot et al., 1999). L'augmentation de l'acide arachidonique observée dans la membrane résulterait de l'amélioration des échanges entre les lipoprotéines plasmatiques et les membranes cellulaires, en particulier celles de l'hématie.

Par ailleurs l'insulino-résistance peut être une conséquence des altérations de la composition membranaire en acides gras.

Une corrélation négative entre la liaison spécifique de l'insuline et le contenu en acide arachidonique des phospholipides de la membrane érythrocytaire a été rapportée sans qu'il y ait de changement significatif dans le nombre de récepteurs par cellule ou l'affinité des récepteurs (Pelikanova et al., 1989). Toutefois, il est vraisemblable que les effets de l'acide arachidonique ne se situent pas au niveau du récepteur de l'insuline. En effet, cet acide gras stimule le transport du glucose dans des adipocytes en culture, cet effet étant dépendant de l'activation du PPAR γ (Nugent et al., 2001). Or, les métabolites de **l'acide arachidonique** ou

l'acide arachidonique lui-même sont des ligands endogènes du **PPAR** γ (Yu et al., 1995; Forman et al., 1997; Xu et al., 1999; Han et al., 2001), facteur de transcription qui joue un rôle sur la sensibilité des cellules à l'insuline (Spiegelmann, 1998). Il est possible qu'un déficit en acide arachidonique puisse entraîner une activation diminuée du PPAR γ , et par conséquent une insulino-sensibilité réduite.

Le déficit en acide arachidonique pourrait être relié à l'activité des "*sterol regulatory element-binding*" protéines (**SREBPs**). Des élongases sont régulées positivement par les SREBPs (Moon et al., 2001). Une régulation positive existe également entre l'expression des formes natives des SREBPs (1a,1c et 2) et l'expression de $\Delta 5$ et $\Delta 6$ désaturases (Matsuzaka et al., 2002). Or, l'expression de SREBP-1c est diminuée chez les obèses normoglycémiques (Kolehmainen et al., 2001) et dans les tissus adipeux lipoatrophiques qui sont insulino-résistants (Bastard et al., 2002). Par conséquent, une diminution de l'expression de SREBP-1 pourrait entraîner une diminution de l'acide arachidonique.

Par ailleurs, l'administration d'un proliférateur de peroxysomes, l'acide clofibrrique chez des rats, augmente la conversion *in vivo* de l'acide linoléique en acide arachidonique par les désaturases et l'élongase, alors que le taux de l'acide eicosadiénoïque est diminué (Kawashima et al., 1990). Or, les dérivés de l'acide clofibrrique sont connus pour améliorer l'insulino-résistance (Guerre-Millo et al., 2000).

IV- CONCLUSION

En résumé, une diminution de l'hyperinsulinémie consécutive à une perte de poids, est associée à une amélioration de la composition lipidique de la membrane dans le groupe des femmes obèses hyperinsulinémiques, indépendamment de la variation de la masse grasse. Ces observations nous suggèrent que les altérations membranaires peuvent faire partie de l'ensemble des altérations métaboliques généralement trouvées chez les patients présentant un excès de tissu adipeux viscéral. Une augmentation du contenu membranaire en SM ou PE, des acides eicosadiénoïque C20:2n-6 et lignocérique C24:0 et une diminution de l'acide arachidonique C20:4n-6 peuvent être considérées comme des marqueurs de l'insulino-résistance. Toutefois, le poids respectif des variations de ces phospholipides et acides gras sur les variations d'insulinémie semble être en faveur des phospholipides. Leur introduction simultanée dans un modèle explicatif des variations d'insulinémie ne fait ressortir que les variations de SM et de PE et les variations de masse grasse. La SM semble présenter une importance particulière. L'augmentation de la SM est corrélée avec le phénotype de l'insulino-résistance (hyperinsulinémie et HDL cholestérol diminués chez des sujets obèses. Par ailleurs, la SM plasmatique est un prédicteur indépendant des pathologies coronariennes après ajustement sur les autres facteurs de risques (Jiang et al., 2000). Il reste à déterminer la relation de cause à effet entre l'insulino-résistance et les altérations de la composition en phospholipides et en acides gras des membranes cellulaires chez des femmes obèses hyperinsulinémiques. L'altération de la composition lipidique de la membrane plasmique pourrait être incluse dans le syndrome métabolique de l'obésité associé à l'insulino-résistance. Les associations complexes entre hyperinsulinémie et/ou insulino-résistance et altération de la composition lipidique membranaire, nécessitent des études complémentaires. L'utilisation de médicaments (thiazolidinédiones, métformine, et orlistat) peut apporter la preuve du rôle de l'insuline dans l'apparition des altérations de composition de la membrane indépendamment de l'obésité.

CHAPITRE 5

Traitement pharmacologique de l'obésité: effet de l'Orlistat sur la perte de poids, l'insulino-sensibilité et la composition lipidique de la membrane érythrocytaire

I- INTRODUCTION

Les programmes de traitement de l'obésité qui associent un régime hypocalorique à d'autres mesures portant sur le comportement alimentaire et l'activité physique entraînent une perte de poids et une amélioration des facteurs de risque et des comorbidités, très variables d'une étude à l'autre. En général, la réduction de poids est modérée et la plupart des patients regagnent du poids au bout de quelques mois ou de quelques années. Il semble donc justifier d'envisager un traitement médicamenteux de l'obésité (Carek et Dickerson, 1999). Ainsi, des molécules ont été développées ou sont en cours de développement pour augmenter la perte de poids et stabiliser le poids ensuite. L'objectif est aussi de réduire l'insulino-résistance qui est généralement présente dans les sujets en surpoids ou obèses et diminuer les risques de maladies cardio-vasculaires.

Une amélioration des facteurs de risque peut être relativement facilement obtenue avec des molécules ayant une action métabolique spécifique. Par exemple les fibrates diminuent les taux de triglycérides à jeun et en post-prandial, souvent élevés chez le sujet obèse androïde. Le traitement avec des inhibiteurs de la synthèse du cholestérol (statines) peut réduire la production hépatique de VLDL et augmenter la clairance des LDL et des « remnants de VLDL » athérogéniques. L'utilisation de dérivés des thiazolidinediones pour augmenter la sensibilité à l'insuline peut être une des options pour réduire le risque d'athérosclérose chez les sujets obèses (Castro Cabezas et al., 2001).

D'autres médicaments ont pour principal objet de diminuer la masse grasse. La Sibutramine est le produit d'une nouvelle classe de molécules agissant comme inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (Hauner, 2001). Elle a pour propriété de renforcer la sensation de satiété et diminue le désir de s'alimenter. Bien elle ait des effets adrénergiques responsables d'une augmentation discrète de la tension et de la fréquence cardiaque, elle a été utilisée pour provoquer une perte de poids chez des sujets obèses insulino-résistants. A la suite du traitement, une amélioration de l'insulino-sensibilité a été constatée (McLaughlin et al., 2001). Enfin, l'Orlistat, est une molécule contre l'obésité qui inhibe l'activité de la lipase gastro-intestinale, réduisant d'environ 1/3 l'absorption des triglycérides alimentaires et également celle du cholestérol (Mittendorfer et al., 2001). Dans des essais randomisés d'une durée de 1 an ou 2 contre placebo, le traitement par Orlistat, associé à un régime modérément hypocalorique, a entraîné une perte de poids significativement plus grande que celle obtenue avec le régime seul. De plus, le traitement par l'Orlistat entraîne une amélioration

significative de plusieurs facteurs de risque cardio-vasculaires, dont le cholestérol total et le cholestérol LDL, l'insulinémie, l'hypertension (Hauptman, 2000). L'action sur le cholestérol-LDL est plus importante que ne le voudrait la perte de poids. Ainsi dans l'étude de Sjostrom et al., (1998), les sujets dont le poids a diminué de plus de 5 % ont obtenu une baisse du cholestérol LDL plus importante sous orlistat que sous placebo. Les meilleurs résultats ont été obtenus chez les patients présentant une dyslipidémie marquée (Muls et al , 2001 ; Naumov et al., 2002).

Etant donné l'effet inhibiteur de l'Orlistat sur l'absorption du cholestérol, on peut se demander s'il n'aurait pas un effet également sur la composition des membranes cellulaires. Nous avons étudié la composition en phospholipides et en acides gras de la membrane érythrocytaire chez des sujets obèses insulino-résistants avant et après un traitement de trois mois avec 120 mg 3 fois par jour d'Orlistat. Ce traitement a été associé à un régime hypocalorique modéré (déficit de 500 kcal/j) comportant 30% des calories sous forme de lipides (10% d'acides gras saturés, 10% de monoinsaturés, 10% de polyinsaturés), 50% de glucides, 20% de protéines. Les apports en cholestérol étaient limités à 300 mg/jour et la consommation d'alcool à 150 g/semaine.

II- RESULTATS

A- LES PHOSPHOLIPIDES

A.1- ETAT BASAL

Les caractéristiques cliniques, métaboliques et membranaires des 17 femmes obèses à l'état basal sont données dans le **tableau 21**. L'IMC varie de 32,5 à 44,8 kg/m², la masse grasse de 39,4 à 62,9 kg, l'insulinémie à jeun de 4,8 à 33 mU/L, et le HOMA de 1,12 à 7,69.

Tableau 21. Paramètres cliniques, métaboliques et membranaires des femmes obèses à l'état basal.

	Obèses n=17
Age (an)	38,6 ± 2,3
Poids (kg)	103,9 ± 3,4
IMC (kg/m ²)	38,1 ± 0,9
Tour de taille (cm)	110(107-115)
Masse grasse (kg)	50,1(44,1-56,4)
Glycémie (mmol/L)	5,16 ± 0,15
Insulinémie à jeun (mU/L)	17,65 ± 1,73
HOMA	4,06 ± 0,42
Triglycérides (mmol/L)	1,61(1,21-2,09)
Cholestérol total (mmol/L)	5,03 ± 0,25
Cholestérol HDL (g/L)	0,49 ± 0,03
Cholestérol LDL (g/L)	1,10(0,90-1,43)
Cholestérol membranaire (CL)	214(204-261)
Phosphatidyléthanolamine (PE)	310 ± 10
Phosphatidylinositol (PI)	38 ± 1
Phosphatidylsérine (PS)	130 ± 6
Phosphatidylcholine (PC)	289 ± 9
Sphingomyéline (SM)	210(196-234)
Phospholipides totaux (PL)	982 ± 17
SM/PE	0,71 ± 0,03
SM/PC	0,75 ± 0,02
SM/CL	0,97 ± 0,02
CL/PL	0,23 ± 0,04

PE, PI, PS, PC, SM et CL: en µg/mg de protéines; les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM ou aux médianes avec le 25 ième et le 75 ième percentile (pour les distributions log normale).

Dans un premier temps, nous avons comparé les caractéristiques de ce groupe d'obèses « Orlistat » avec le groupe d'obèses du chapitre 4 défini comme régime seul. Dans un deuxième temps, nous avons étudié les relations entre les paramètres métaboliques, lipidiques et membranaires à l'intérieur du groupe « Orlistat ».

A.1.1- Différences à l'état basal entre le groupe « Orlistat » et le groupe « régime ».

L'examen des valeurs moyennes des différents paramètres montre que le groupe Orlistat diffère significativement du groupe « régime ».

Les **17 femmes obèses** sélectionnées pour un traitement avec l'Orlistat présentent des valeurs moyennes significativement plus élevées en ce qui concerne l'IMC ($P < 0,0001$), le tour de taille ($P < 0,0001$), la masse grasse ($P < 0,05$), l'insulinémie ($P = 0,0001$) et le HOMA ($P < 0,0005$) que celles enregistrées pour le **groupe obèse « régime »**.

En ce qui concerne les paramètres lipidiques, les TG sont plus élevés ($P < 0,05$). Le cholestérol LDL est plus faible mais les différences ne sont pas significatives.

Pour les paramètres membranaires, les 17 obèses « Orlistat » ont des teneurs en PE, PC, SM et en PL plus élevés ($P < 0,01$, $P < 0,005$, $P < 0,0001$, et $P < 0,0001$, respectivement) et des teneurs plus faibles en PI ($P < 0,05$) et en CL ($P < 0,05$).

A.1.2- Relations entre les paramètres métaboliques, lipidiques et membranaires au sein du groupe « Orlistat ».

L'insulinémie à jeun n'est corrélée à aucun des paramètres anthropométriques mais est positivement corrélée au cholestérol LDL ($r = 0,603$, $P < 0,05$). En outre, elle est positivement corrélée à la SM ($0,473$, $P < 0,05$). Une corrélation avec le rapport SM/PE est proche de la signification ($r = 0,422$, $P = 0,09$).

Tout comme l'insulinémie à jeun, **le HOMA** n'est corrélée à aucun des paramètres anthropométriques mais est positivement corrélé au cholestérol LDL ($r = 0,549$ $P < 0,05$). Le HOMA est également corrélé au rapport SM/PE ($r = 0,475$ $P < 0,05$) et la corrélation avec la SM est proche de la signification ($r = 0,432$ $P = 0,08$).

Etant donné les quantités importantes de SM élevées dans ce groupe d'obèses, il nous a paru important de rechercher les paramètres avec lesquels la SM pouvait être corrélée. Il en est de même pour le CL qui présente une forte affinité pour la SM.

La SM est corrélée positivement au tour de taille ($r = 0,534, P < 0,05$), à la PS ($r = 0,532, P < 0,05$), à la PC ($r = 0,501, P < 0,05$), aux PL ($r = 0,680, P < 0,005$), au cholestérol membranaire ($r = 0,662, P < 0,005$), au rapport CL/PL ($r = 0,483, P < 0,05$), et négativement corrélée à la PI ($r = -0,549, P < 0,05$).

Outre la corrélation avec la SM citée ci-dessus, **le CL membranaire** est corrélé positivement au rapport SM/PE ($r = 0,594, P < 0,05$).

Une **analyse de régression multiple pas à pas (tableau 22)** montre que la SM et les TG sont des prédicteurs indépendants de **l'insulinémie** (r^2 ajusté = 0,312, $P < 0,05$).

Par contre, le rapport SM/PE explique 22,6 % de la variance du **HOMA** (r^2 ajusté = 0,352, $P < 0,05$).

Le **CL**, la **PI** et **l'insulinémie à jeun** expliquent respectivement 43,8 %, 17,7 % et 10,8 % de la **variance de la SM** dans ce groupe d'obèses (r^2 ajusté = 0,659, $P < 0,001$).

En revanche, seule la **SM** explique 43,8% de la **variance du CL** ($r^2 = 0,400, P < 0,005$).

Tableau 22: Analyse de régression pas à pas expliquant l'insulinémie, le HOMA, la SM et le cholestérol membranaire à l'état basal.

Insulinémie:

Variables	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
SM	0,146	0,224	4,329	< 0,05
TG	3,669	0,398	4,624	< 0,05

$r^2 = 0,312$ $P < 0,05$

HOMA

Variables	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
SM/PE	6,559	0,226	4,372	< 0,05

$r^2 = 0,174$ $P < 0,05$

Sphingomyéline (SM)

Variables	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
CL	0,350	0,438	11,688	< 0,005
PI	-1,872	0,615	11,167	< 0,005
Ins	1,255	0,723	11,300	< 0,001

$r^2 = 0,659$ $P < 0,001$

Cholestérol membranaire (CL)

Variables	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
SM	1,250	0,438	11,688	< 0,005

$r^2 = 0,400$ $P < 0,005$

A.2- APRES TRAITEMENT A L'ORLISTAT ASSOCIE A UN REGIME HYPOCALORIQUE PENDANT 3 MOIS.

A.2.1- Evolution des caractéristiques cliniques, métaboliques et membranaires

Après 3 mois de traitement, 15 patientes ont perdu du poids et le poids de 2 patientes est resté stable.

Les caractéristiques cliniques et métaboliques après traitement à l'Orlistat sont données dans le **tableau 23**. Les données de l'état basal ont été remises à titre comparatif.

Tableau 23. Paramètres cliniques et métaboliques des femmes obèses à l'état basal et après 3 mois sous Orlistat.

	Etat basal <i>n=17</i>	Après 3 mois sous Orlistat <i>n=17</i>	<i>P</i> (test de rang de Wilcoxon)
Age (an)	38,6 ± 2,3		
Poids (kg)	103,9 ± 3,4	97,3 ± 3,1	< 0,0005
IMC (kg/m ²)	38,1 ± 0,9	35,6 ± 0,9	< 0,0005
Tour de taille (cm)	110(107-115)	106,7 ± 2,5	< 0,001
Masse grasse (kg)	50,1(44,1-56,4)	46,2(39,9-52,6)	< 0,0005
Glycémie (mmol/L)	5,16 ± 0,15	5,27(4,91-5,65)	NS
Insulinémie à jeun (mU/L)	17,65 ± 1,73	13,40(8,10-19,95)	< 0,05
HOMA	4,06 ± 0,42	3,44 ± 0,36	NS
Triglycérides (mmol/L)	1,61(1,21-2,09)	1,09(1,01-1,71)	< 0,05
Cholestérol total (mmol/L)	5,03 ± 0,25	4,69 ± 0,16	< 0,05
Cholestérol HDL (g/L)	0,49 ± 0,03	0,46 ± 0,02	< 0,05
Cholestérol LDL (g/L)	1,10(0,90-1,43)	1,13 ± 0,08	NS

Les valeurs correspondent à des moyennes ± SEM ou des médianes avec le 25 ième et le 75 ième percentile (pour les distribution log normale).

La moyenne de la perte de poids est de $-3 \pm 1,0$ % ($-6,6 \pm 1,1$ kg), elle correspond à une diminution de l'IMC de 38,1 à 35,6 kg/m².

On enregistre une diminution significative du tour de taille ($-4,5$ %, $P < 0,001$), de la masse grasse ($-7,8$ %, $P < 0,0005$) et de l'insulinémie ($-18,8$ %, $P < 0,05$). Par contre, la baisse du HOMA n'est pas significative.

Parmi les paramètres lipidiques, une diminution significative est observée pour les TG ($-32,3$ %, $P < 0,05$), le CT ($-11,7$ %, $P < 0,05$) et le cholestérol HDL ($-6,1$ %, $P < 0,05$). En revanche, le cholestérol LDL ne varie pas.

Les paramètres de la membrane érythrocytaire après 3 mois de traitement sont données dans le **tableau 24**, les valeurs à l'état basal étant également dans le tableau pour une comparaison plus facile.

On observe une diminution du CL ($-6,1$ %, $P < 0,05$), de la PS ($-13,7$ %, $P < 0,05$), de la PC ($-14,2$ %, $P < 0,01$), de la SM ($-12,4$ %, $P < 0,01$) et des PL ($-10,3$ %, $P < 0,005$).

Tableau 24. Paramètres membranaires des femmes obèses à l'état basal et après 3 mois sous Orlistat.

	Etat basal <i>n=17</i>	Après 3 mois sous Orlistat <i>n=17</i>	<i>P</i> (test de rang de Wilcoxon)
Cholestérol membranaire (CL)	214(204-261)	201 ± 8	< 0,05
Phosphatidyléthanolamine (PE)	310 ± 10	299(285-321)	NS
Phosphatidylinositol (PI)	38 ± 1	37 ± 2	NS
Phosphatidylsérine (PS)	130 ± 6	113(97-120)	< 0,05
Phosphatidylcholine (PC)	289 ± 9	248 ± 8	< 0,01
Sphingomyéline (SM)	210(196-234)	184 ± 6	< 0,01
Phospholipides totaux (PL)	982 ± 17	881 ± 21	< 0,005
SM/PE	0,71 ± 0,03	0,62 ± 0,02	= 0,07
SM/PC	0,75 ± 0,02	0,74 ± 0,02	NS
SM/CL	0,97 ± 0,02	0,94 ± 0,05	NS
CL/PL	0,23 ± 0,04	0,23 ± 0,01	NS

PE, PI, PS, PC, SM et CL: en µg/mg de protéines; les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM ou aux médianes avec le 25 ième et le 75 ième percentile (pour les distributions log normale).

A.2.2- Relations entre les variations des marqueurs de l'insulino-résistance, des paramètres lipidiques et membranaires après traitement.

Les variations de **l'insulinémie** entre l'état basal et après traitement sont positivement corrélées aux variations de l'IMC ($r = 0,529$, $P < 0,05$), du poids ($r = 0,485$, $P = 0,056$), de la SM ($r = 0,710$, $P < 0,005$) et du rapport SM/PE ($r = 0,558$, $P < 0,05$).

Les résultats en ce qui concerne **le HOMA** sont identiques. Les variations du HOMA sont positivement corrélées aux variations de l'IMC ($r = 0,501$, $P < 0,05$), du poids ($r = 0,467$, $P = 0,068$), de la SM ($r = 0,646$, $P < 0,01$) et du rapport SM/PE ($r = 0,582$, $P < 0,05$).

Les variations de **la SM** sont positivement corrélées aux variations de la PS ($r = 0,773$, $P < 0,005$) et de la PC ($r = 0,754$, $P < 0,005$).

Les variations du **CL** sont positivement corrélées aux variations de l'IMC ($r = 0,477$, $P = 0,052$), du poids ($r = 0,531$, $P < 0,05$), du rapport SM/PE ($r = 0,621$, $P < 0,05$), et négativement corrélées aux variations du cholestérol HDL ($r = -0,507$, $P < 0,05$).

Une analyse de régression pas à pas a été effectuée pour déterminer les facteurs indépendants les plus significatifs prédictifs des variations des marqueurs de l'insulino-résistance ainsi que des variations de la SM et du CL membranaires. (Tableau 25).

Les variations **d'insulinémie** après perte de poids seraient expliquées par les variations de la SM (54 %) et de la PS (21,2 %) avec un r^2 ajusté = 0,678, $P < 0,001$.

Les variations de la SM (46,3 %) et de la PS (19,3 %) expliqueraient également les variations du **HOMA** avec un r^2 ajusté = 0,598, $P < 0,005$.

Les facteurs prédictifs de la variation de la **SM** seraient les variations de PC (58,5 %) et d'insulinémie (21,5 %) avec un r^2 ajusté = 0,767, $P < 0,0001$. Par contre, les variations du **CL membranaire** seraient expliquées par les variations du poids (28,7%) et du cholestérol HDL (31,7%) avec un r^2 ajusté de 0,538 ($P < 0,005$).

Tableau 25: Modèle de régression pas à pas expliquant la variation de l'insulinémie (dIns), du HOMA (dHOMA), de la SM (dSM) et du CL membranaires (dCL), exprimés en %, après traitement sous Orlistat.

dIns (%)

Variables	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
DSM (%)	1,205	0,504	13,216	< 0,005
DPS (%)	-0,937	0,711	14,745	< 0,001

$r^2 = 0,663$ $P < 0,001$

dHOMA (%)

Variables	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
dSM (%)	1,245	0,463	11,221	< 0,01
dPS (%)	-0,974	0,656	11,419	< 0,005

$r^2 = 0,598$ $P < 0,005$

dSM (%)

Variables	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
dPC (%)	0,835	0,585	18,336	< 0,001
dIns (%)	0,293	0,800	24,001	< 0,0001

$r^2 = 0,767$ $P < 0,0001$

dCL (%)

Variables	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
dPoids (%)	2,599	0,287	5,240	< 0,05
dHDL (%)	-0,936	0,604	9,138	< 0,005

$r^2 = 0,538$ $P < 0,005$

A.2.3- Effet de l'Orlistat et d'un régime hypocalorique de 3 mois sur l'insulino-sensibilité : mise en évidence de « bons répondeurs » « et mauvais répondeurs ».

En dépit d'une baisse globale de l'insulinémie à jeun après 3 mois de traitement, l'examen des valeurs individuelles montre des variations très hétérogènes: soit une baisse ou une augmentation de l'insulinémie.

Par conséquent, afin de mieux évaluer les relations entre les paramètres métaboliques et membranaires, et les variations des marqueurs de l'insulino-résistance, les 17 sujets obèses ont été séparés en 2 sous groupes selon la variation de l'insulinémie après traitement. Le **groupe « bons répondeurs »** voit son insulinémie diminuée ($n = 11$ sujets), alors que le **groupe « mauvais répondeurs »** voit son insulinémie augmentée ($n = 6$ sujets).

A l'état basal, les « mauvais répondeurs » ne diffèrent significativement des « bons répondeurs » que par des concentrations significativement plus faibles en cholestérol plasmatique ($P < 0,05$), LDL cholestérol ($P < 0,01$), SM ($P < 0,05$) et dans les rapports SM/PE ($P < 0,05$) et SM/PC ($P < 0,05$) (**Tableau 26**).

Le **tableau 26** montre les données concernant les paramètres cliniques, métaboliques et membranaires des « bons répondeurs » et « mauvais répondeurs » après le traitement.

Le **sous groupe « bons répondeurs »** présente une **diminution significative de l'insulinémie** (-38,9 % ; $P < 0,0005$) et du HOMA (-35,7 % ; $P < 0,001$). En revanche, le sous groupe « mauvais répondeurs » présente une augmentation significative de l'insulinémie (+ 28,7 %, $P < 0,01$) et du HOMA (+39,8 %, $P < 0,05$).

Tableau 26. Paramètres cliniques, métaboliques et membranaires des groupes « bons répondeurs » et « mauvais répondeurs », à l'état basal et après 3 mois sous Orlistat.

	<i>ETAT BASAL</i>		<i>Sous Orlistat</i>	
	« bons répondeurs » <i>n=11</i>	« mauvais répondeurs » <i>n=6</i>	« bons répondeurs » <i>n=11</i>	« mauvais répondeurs » <i>n=6</i>
Poids (kg)	102,0 ± 3,9	115,5(90,8-115,4)	95,2 ± 3,8 ⁺⁺	107,5(85,4-109,7) ⁺
IMC (kg/m ²)	37,6 ± 1,2	38,1(36,8-42,9)	35,0 ± 0,1,2 ⁺⁺	37,0(34,6-38,0) ⁺
Tour de taille (cm)	109,0(107-113,5)	110,5(110,0-117,0)	104,4 ± 3,1 ⁺⁺	110(107,6-116) ⁺
Masse grasse (kg)	49,2 ± 2,2	54,3(44,5-60,4)	45,2(36,4-50,5) ⁺⁺	49,9(40,5-53,3) ⁺
Glycémie (mmol/L)	5,38(4,82-5,47)	4,87(4,19-5,25)	5,45 ± 0,21	5,23 ± 0,22
Insulinémie à jeun (mU/L)	19,31 ± 2,29	15,57(13,75-16,50)	11,80(7,9-13,59) ⁺⁺	20,95(16,00-23,00)
HOMA	4,56 ± 0,53	3,14 ± 0,57	2,93 ± 0,37 ⁺⁺	4,39 ± 0,66 ⁺
Triglycérides (mmol/L)	1,61(1,14-2,58)	1,6 ± 0,17	1,08(1,02-2,58) ⁺	1,34(1,01-1,62)
Cholestérol total (mmol/L)	5,94(5,08-6,55)	4,82(4,42-4,91) ^a	4,82 ± 0,18 ⁺	4,37(3,80-5,12)
Cholestérol HDL (g/L)	0,49(0,45-0,53)	0,49(0,36-0,59)	0,46 ± 0,02	0,50(0,33-0,58)
Cholestérol LDL (g/L)	1,30(1,10-1,65)	0,92 ± 0,05 ^b	1,22 ± 0,09	0,90(0,80-1,11)
Cholestérol membranaire (CL)	235(205-264)	203 ± 17	215 ± 10	176 ± 7
Phosphatidyléthanolamine (PE)	302 ± 10	329(296-370)	297(284-318)	292(288-330)
Phosphatidylinositol (PI)	37 ± 2	39(35-46)	37 ± 2	32(29-47)
Phosphatidylsérine (PS)	122(109-155)	127(114-145)	105(95-120) ⁺	115 ± 8
Phosphatidylcholine (PC)	279(268-315)	274(260-314)	243(268-315) ⁺	257 ± 13
Sphingomyéline (SM)	226 ± 8	193(187-204) ^a	180 ± 8 ⁺	193 ± 10
Phospholipides totaux (PL)	983 ± 24	1001(911-1021)	871(806-956) ⁺	908 ± 29 ⁺
SM/PE	0,80(0,65-0,83)	0,60(0,51-0,74) ^a	0,61 ± 0,03 ⁺	0,60(0,58-0,69)
SM/PC	0,76(0,73-0,82)	0,71(0,60-0,77) ^a	0,71(0,69-0,79)	0,79(0,68-0,81) ⁺
SM/CL	0,94 ± 0,04	1,01 ± 0,09	0,90 ± 0,05	1,03(1,01-1,19)
CL/PL	0,24(0,22-0,26)	0,22(0,16-0,24)	0,25 ± 0,01	0,21(0,17-0,21)

PE, PI, PS, PC, SM et CL: en µg/mg de protéines;

les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM ou aux médianes avec le 25^{ème} et le 75^{ème} percentile (pour les distributions log normale).

^a $P < 0,05$, ^b $P < 0,01$, groupe « mauvais répondeurs » comparé au groupe « bons répondeurs » à l'état basal.

⁺ $P < 0,05$; ⁺⁺ $P < 0,005$; l'état basal comparé à l'état après Orlistat.

Il faut noter que la perte de poids est très voisine dans les deux sous groupes : $-6,61 \pm 1,20 \%$ et $-5,61 \pm 1,77 \%$ pour les bons et mauvais répondeurs, respectivement.

En ce qui concerne **les variations des paramètres lipidiques**, on observe une baisse des TG ($-32,9 \%$, $P < 0,05$), du CT ($-17,3 \%$, $P < 0,05$), du cholestérol HDL ($-10,2 \%$, $P = 0,05$), mais aucune variation significative du cholestérol LDL chez les « bons répondeurs ».

En revanche, on n'observe aucune variation significative des paramètres lipidiques dans le groupe « mauvais répondeurs ».

Pour les paramètres membranaires, dans le groupe « bons répondeurs », on observe une diminution de la PC ($-16,1 \%$, $P < 0,05$), de la SM ($-20,4 \%$, $P < 0,05$), des PL ($-12,3 \%$, $P < 0,05$) et du rapport SM/PE ($-23,7 \%$, $P < 0,05$).

Dans le groupe « mauvais répondeurs », seul le rapport SM/PC est augmenté ($+12,34 \%$, $P < 0,0005$).

B- LES ACIDES GRAS

Le **tableau 27** rassemble les données concernant la composition en acide gras de la membrane érythrocytaire de tous les obèses, des groupes « **bons et mauvais répondeurs** » à l'état basal.

B.1- ANALYSE DE L'ECHANTILLON DES 17 OBESES

B.1.1- Etat basal

L'insulinémie à jeun est corrélée négativement au rapport C20:2n-6/C18:2n-6 ($r = -0,531$ $P < 0,05$).

Le HOMA est corrélé négativement à l'acide eicosadiénoïque (C20:2n-6), ($r = -0,633$ $P < 0,01$) et au rapport C20:2n-6/C18:2n-6 ($r = -0,578$ $P < 0,05$).

La SM est corrélée négativement à l'acide stéarique (C18:0) ($r = -0,560$ $P < 0,05$).

Tableau 27: Composition en acides gras totaux de la membrane érythrocytaire de la population totale des obèses, des groupes « bons et mauvais répondeurs » à l'état basal.

	Population totale d'obèse <i>n</i> =17	Groupe « bon répondeurs » <i>n</i> =11	Groupe « mauvais répondeurs » <i>n</i> =6
Acide palmitique C16:0	26,21 ± 0,71	26,20 ± 0,11	26,21 ± 1,25
Acide palmitoléique C16:1n-7	2,72(2,03-3,63)	2,72(2,02-3,54)	2,74(2,05-3,73)
Acide stéarique C18:0	22,56 ± 0,95	20,07(18,93-24,93)	23,65(21,85-25,75)
Acide oléique C18:1n-9	10,29 ± 0,56	9,97(9,34-12,04)	9,93(6,42-11,56)
Acide linoléique C18:2n-6	6,68 ± 0,24	6,58 ± 0,36	6,75(6,45-7,27)
Acide γ-linolénique C18:3n-6	0,30(0,11-0,98)	0,50(0,11-1,48)	0,18(0,13-0,30)
Acide α-linolénique C18:3n-3	0,17(0,01-0,28)	0,19(0,01-0,45)	0,12(0,03-0,17)
Acide arachidique C20:0	1,24(0,69-2,74)	1,50(0,68-2,43)	1,10(0,69-4,20)
Acide eicosénoïque C20:1n-9	0,43(0,35-0,74)	0,37(0,29-0,70)	0,88(0,39-1,33)
Acide eicosadiénoïque C20:2n-6	0,18(-0,16-0,26)	0,18 ± 0,02	0,22(0,17-0,34)
Acide homo-γ-linolénique C20:3n-6	0,11(0,03-0,20)	0,11 ± 0,02	0,12(0,04-0,21)
Acide eicosatriénoïque C20:3n-3	1,22(1,00-1,38)	1,09(0,99-1,35)	1,26 ± 0,17
Acide arachidonique C20:4n-6	9,67 ± 0,32	9,45(8,51-11,06)	9,63(8,57-10,24)
Acide eicosapentaénoïque C20:5n-3	0,48(0,37-0,63)	0,46(0,38-0,61)	0,58(0,27-0,62)
Acide béhénique C22:0	1,55(1,31-2,01)	1,80(1,36-2,04)	1,39(1,30-1,55)
Acide érucique C22:1n-9	0,26 ± 0,05	0,14(0,10-0,37)	0,33(0,17-0,50)
Acide docosatétraénoïque C22:4n-6	2,29(1,76-2,68)	1,99(1,76-2,64)	2,31(1,76-2,68)
Acide docosapentaénoïque C22:5n-3	0,97 ± 0,09	1,06 ± 0,10	0,76(0,44-1,21))
Acide lignocérique C24:0	2,72(1,45-3,96)	3,24 ± 0,37	1,40(1,05-2,50)
Acide docosahéxaénoïque C22:6n-3	4,68 ± 0,52	3,53(2,80-7,04)	5,08(2,84-6,27)
Acide nervonique C24:1n-9	3,10 ± 0,24	3,17(2,29-3,64)	2,8(2,23-3,79)
SFA (somme des saturés)	55,20 ± 1,01	54,54 ± 1,06	54,45(51,84-61,73)
MUFA(somme des monosaturés)	17,28 ± 0,70	17,45(17,12-18,52)	17,45(12,41-19,62)
PUFA (somme des polysaturés)	27,70 ± 0,79	27,93 ± 1,09	26,34(25,11-30,71)
PUFA/SFA	0,508 ± 0,022	0,517 ± 0,018	0,472(0,419-0,592)
Somme des acides gras (n-9)	14,25 ± 0,65	14,62(13,80-15,45)	15,29(9,48-15,64)
Somme des acides gras (n-6)	19,71 ± 0,54	19,71 ± 0,77	19,68(18,36-21,37)
Somme des acides gras (n-3)	7,99 ± 0,49	7,37(6,15-10,25)	7,19(6,66-9,18)
Rapport n-6/n-3	2,55(2,25-2,78)	2,56(1,95-2,80)	2,50(2,34-2,77)
Δ9 desat1 (C16:1-7/C16:0)	0,11(0,08-0,13)	0,11(0,08-0,13)	0,11 ± 0,02
Δ9 desat2 (C18:1-9/C18:0)	0,50(0,45-0,54)	0,50(0,49-0,58)	0,44(0,21-0,53)
Δ6 desat (C18:3n-6/C18:2n-6)	0,04(0,02-0,15)	0,08(0,02-0,22)	0,03(0,02-0,04)
Δ5desat (C20:4n-6/C20:3n-6)	92,4(49,6-361)	92,42(63,94-609,23)	132,45(49,97-225,75)
E(n-6): C20:3n-6/C18:3n-6	0,26(0,11-1,09)	0,22(0,06-1,00)	0,45(0,25-2,10))
E(n-6): C22:4n-6/C20:4n-6	0,22(0,20-0,25)	0,22(0,18-0,25)	0,22(0,21-0,32)
E(n-6): C20:2n-6/C18:2n-6	0,03(0,02-0,04)	0,03 ± 0,003	0,03(0,02-0,05)
E(n-3): C22:5n-3/C20:5n-3	1,81(1,37-2,16)	1,83(1,52-2,82)	1,70(0,82-1,95)

Les valeurs correspondent aux moyennes ± erreur standard (valeurs exprimées en pourcentage) ou médianes avec le 25^{ième} et le 75^{ième} percentile (pour les distributions suivant une log normale).

Une **analyse de régression multiple pas à pas** a été entreprise pour identifier les déterminants spécifiques indépendants de l'insulinémie à jeun, du HOMA et de la SM (**tableau 28**).

Il n'existe aucun modèle pouvant expliquer la variance de l'insulinémie à jeun ou du HOMA à l'état basal.

En revanche, les acides stéarique, palmitoléique et oléique expliqueraient 28,4, 17,4 et 17,1 % respectivement de la variance de la SM à l'état basal (r^2 ajusté = 0,544 $P < 0,005$)

Tableau 28: Analyse de régression pas à pas expliquant la SM à l'état basal.

Variables	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
Log C18:0	-189,036	0,284	5,947	< 0,05
Log C16:1n-7	-77,587	0,458	5,922	< 0,05
Log C18:1n-9	-104,355	0,629	7,350	< 0,005

$r^2 = 0,544$ $P < 0,005$

B.1.2- Après trois mois sous Orlistat

Dans le groupe des 17 obèses, les acides palmitoléique C16:1n-7, linoléique C18:2n-6 et arachidique C20:0 sont significativement diminués ($P < 0,05$, $P < 0,05$, $P < 0,05$, respectivement) et l'acide arachidonique C20:4n-6 significativement augmenté ($P < 0,005$) (**tableau 29**). On observe également une augmentation du rapport C22:5n-3/C20:5n-3 ($P < 0,05$) et une baisse du rapport C16:1n-7/C16:0, (delta 9 désaturase), ($P < 0,05$).

L'analyse de corrélation dans la population des obèses montre que la **variation de l'insulinémie** à jeun entre l'état basal et après perte de poids, est corrélée positivement à la variation de l'acide docosapentaénoïque (C22:5n-3), ($r = 0,533$ $P < 0,05$). La **variation du HOMA** est corrélée négativement à celle de l'acide docosahexaénoïque (C22:6n-3), ($r = -0,437$ $P = 0,079$).

On n'a pas mis en évidence de modèle de régression multiple pas à pas pouvant expliquer la variation de l'insulinémie ou du HOMA après perte de poids.

Tableau 29: Composition en acides gras totaux de la membrane érythrocytaire des femmes obèses à l'état basal et après 3 mois sous Orlistat.

	Population totale d'obèse n=17	Après 3 mois sous Orlistat n=17	P
Acide palmitique C16:0	26,21 ± 0,71	25,73(24,77-28,24)	NS
Acide palmitoléique C16:1n-7	2,72(2,03-3,63)	2,55(1,82-2,80)	< 0,05
Acide stéarique C18:0	22,56 ± 0,95	22,31 ± 0,79	NS
Acide oléique C18:1n-9	10,29 ± 0,56	10,30 ± 0,45	NS
Acide linoléique C18:2n-6	6,68 ± 0,24	5,73(5,22-6,59)	< 0,05
Acide γ-linolénique C18:3n-6	0,30(0,11-0,98)	0,51(0,14-1,47)	NS
Acide α-linolénique C18:3n-3	0,17(0,01-0,28)	0,23(0,13-0,48)	NS
Acide arachidique C20:0	1,24(0,69-2,74)	0,74(0,65-1,23)	< 0,05
Acide eicosénoïque C20:1n-9	0,43(0,35-0,74)	0,45(0,37-0,76)	NS
Acide eicosadiénoïque C20:2n-6	0,18(-0,16-0,26)	0,22(0,14-0,37)	NS
Acide homo-γ-linolénique C20:3n-6	0,11(0,03-0,20)	0,16(0,03-0,21)	NS
Acide eicosatriénoïque C20:3n-3	1,22(1,00-1,38)	1,20 ± 0,08	NS
Acide arachidonique C20:4n-6	9,67 ± 0,32	10,95(10,53-11,34)	< 0,005
Acide docosapentaénoïque C20:5n-3	0,48(0,37-0,63)	0,42(0,27-0,53)	NS
Acide béhénique C22:0	1,55(1,31-2,01)	1,50 ± 0,08	NS
Acide érucique C22:1n-9	0,26 ± 0,05	0,17(0,13-0,41)	NS
Acide docosatétranoïque C22:4n-6	2,29(1,76-2,68)	2,15(2,03-2,84)	NS
Acide eicosapentanoïque C22:5n-3	0,97 ± 0,09	0,76(0,51-1,27)	NS
Acide lignocérique C24:0	2,72(1,45-3,96)	1,30(1,14-3,97)	NS
Acide docosahéxaénoïque C22:6n-3	4,68 ± 0,52	4,72(3,87-6,00)	NS
Acide nervonique C24:1n-9	3,10 ± 0,24	3,19 ± 0,18	NS
SFA (somme des saturés)	55,20 ± 1,01	53,96 ± 0,85	NS
MUFA(somme des monosaturés)	17,28 ± 0,70	17,10 ± 0,63	NS
PUFA (somme des polysaturés)	27,70 ± 0,79	28,68(27,25-26,64)	NS
PUFA/SFA	0,508 ± 0,022	0,533(0,503-0,550)	NS
Somme des acides gras (n-9)	14,25 ± 0,65	14,76 ± 0,61	NS
Somme des acides gras (n-6)	19,71 ± 0,54	20,86(19,29-21,68)	NS
Somme des acides gras (n-3)	7,99 ± 0,49	7,90(7,17-8,64)	NS
Rapport n-6/n-3	2,55(2,25-2,78)	2,625 ± 0,106	NS
Δ9 desat1 (C16:1-7/C16:0)	0,11(0,08-0,13)	0,09 ± 0,01	<0,05
Δ9 desat2 (C18:1-9/C18:0)	0,50(0,45-0,54)	0,48 ± 0,03	NS
Δ6 desat (C18:3n-6/C18:2n-6)	0,04(0,02-0,15)	0,08(0,02-0,25)	NS
Δ5desat (C20:4n-6/C20:3n-6)	92,4(49,6-361)	70,94(53,55-457)	NS
E(n-6): C20:3n-6/C18:3n-6	0,26(0,11-1,09)	0,39(0,08-1,04)	NS
E(n-6): C22:4n-6/C20:4n-6	0,22(0,20-0,25)	0,21(0,18-0,250)	NS
E(n-6): C20:2n-6/C18:2n-6	0,03(0,02-0,04)	0,04(0,02-0,06)	NS
E(n-3): C22:5n-3/C20:5n-3	1,81(1,37-2,16)	2,09(1,44-2,74)	<0,05

Les valeurs correspondent aux moyennes ± erreur standard (valeurs exprimées en pourcentage) ou médianes avec le 25^{ième} et le 75^{ième} percentile (pour les distributions suivant une log normale).

La **variation de la SM** entre l'état basal et après perte de poids est corrélée positivement aux variations des acides linoléique (C18:2n-6), ($r = 0,699$ $P < 0,005$), docosapentaénoïque (C22:5n-3), ($r = 0,731$ $P < 0,005$) et lignocérique (C24:0), ($r = 0,543$ $P < 0,05$), et négativement aux variations de l'acide stéarique (C18:0), ($r = -0,698$ $P < 0,005$). Dans une analyse de régression pas à pas, seules les variations des acides docosapentaénoïque et lignocérique expliquent 53,4 et 11,8 % respectivement de la variation de la SM (r^2 ajusté = 0,598 $P < 0,005$) (**tableau 30**).

Tableau 30: Modèle de régression pas à pas expliquant la variation de la SM après traitement sous Orlistat.

Variabes	Coefficient β	r^2 partiel	F	P partiel
dC22:5n-3 (%)	0,264	0,534	16,053	< 0,005
dC24:0 (%)	0,128	0,652	12,161	< 0,005

n=16 $r^2 = 0,598$ $P < 0,005$

B.2- ANALYSE DES GROUPES « BONS REPONDEURS » ET « MAUVAIS REPONDEURS »

A l'état basal, le groupe « bons répondeurs » diffère significativement du groupe « mauvais répondeurs » par une valeur plus élevée en acide lignocérique C24:0 ($P < 0,05$).

Les variations des acides gras ont également été étudiées dans les deux sous-groupes après traitement (**tableaux 31 et 32**).

Dans le groupe « **bon répondeurs** », on observe une diminution des acides palmitoléique C16:1n-7 et linoléique C18:2n-6 ($P < 0,05$, $P < 0,05$), et une augmentation de l'acide arachidonique C20:4n-6 ($P < 0,05$). On note également une diminution du rapport C16:1n-7/C16:0 ($P < 0,05$) et une augmentation du rapport C20:2n-6/C18:2n-6 ($P < 0,05$).

Dans le groupe « mauvais répondeurs », les acides α -linoléique C18:3n-3 et arachidonique C20:4n-6 sont augmentés ($P < 0,05$, $P < 0,05$), et l'acide eicosapentaénoïque C20:5n-3 diminué ($P < 0,05$). On observe également une augmentation significative du rapport C22:5n-3/C20:5n-3 ($P < 0,05$).

Tableau 31: Composition en acides gras totaux de la membrane érythrocytaire du groupe « bons répondeurs », à l'état basal et après 3 mois sous Orlistat.

	« bons répondeurs » n=11	Après 3 mois sous Orlistat. n=11	P
Acide palmitique C16:0	26,20 ± 0,11	25,90 ± 0,80	NS
Acide palmitoléique C16:1n-7	2,72(2,02-3,54)	2,02(1,88-2,73)	< 0,05
Acide stéarique C18:0	20,07(18,93-24,93)	21,64 ± 0,78	NS
Acide oléique C18:1n-9	9,97(9,34-12,04)	11,20(9,03-11,84)	NS
Acide linoléique C18:2n-6	6,58 ± 0,36	5,71 ± 0,28	< 0,05
Acide γ-linolénique C18:3n-6	0,50(0,11-1,48)	0,99(0,15-1,66)	NS
Acide α-linolénique C18:3n-3	0,19(0,01-0,45)	0,20(0,09-0,31)	NS
Acide arachidique C20:0	1,50(0,68-2,43)	0,76(0,67-1,42)	NS
Acide eicosénoïque C20:1n-9	0,37(0,29-0,70)	0,55(0,34-0,93)	NS
Acide eicosadiénoïque C20:2n-6	0,18 ± 0,02	0,25(0,16-0,57)	NS
Acide homo-γ-linolénique C20:3n-6	0,11 ± 0,02	0,16(0,13-0,21)	NS
Acide eicosatriénoïque C20:3n-3	1,09(0,99-1,35)	1,17 ± 0,10	NS
Acide arachidonique C20:4n-6	9,45(8,51-11,06)	10,95(10-11,33)	< 0,05
Acide eicosapentaénoïque C20:5n-3	0,46(0,38-0,61)	0,44(0,32-0,54)	NS
Acide béhénique C22:0	1,80(1,36-2,04)	1,54 ± 0,09	NS
Acide érucique C22:1n-9	0,14(0,10-0,37)	0,17(0,13-0,35)	NS
Acide docosatétraénoïque C22:4n-6	1,99(1,76-2,64)	2,06(1,92-2,96)	NS
Acide docosapentaénoïque C22:5n-3	1,06 ± 0,10	0,93(0,54-1,44)	NS
Acide lignocérique C24:0	3,24 ± 0,37	2,85(1,22-4,54)	NS
Acide docosahéxaénoïque C22:6n-3	3,53(2,80-7,04)	4,49(4,00-6,42)	NS
Acide nervonique C24:1n-9	3,17(2,29-3,64)	3,17 ± 0,25	NS
SFA (somme des saturés)	54,54 ± 1,06	53,38 ± 0,91	NS
MUFA(somme des monosaturés)	17,45(17,12-18,52)	17,18(16-18,67)	NS
PUFA (somme des polysaturés)	27,93 ± 1,09	29,14(28-29,75)	NS
PUFA/SFA	0,52 ± 0,02	0,53(0,52-0,56)	NS
Somme des acides gras (n-9)	14,62(13,80-15,45)	15,30 ± 0,71	NS
Somme des acides gras (n-6)	19,71 ± 0,77	20,91 ± 0,43	NS
Somme des acides gras (n-3)	7,37(6,15-10,25)	7,82(7,20-8,55)	NS
Rapport n-6/n-3	2,56(1,95-2,80)	2,63 ± 0,14	NS
Δ9 desat1 (C16:1-7/C16:0)	0,11(0,08-0,13)	0,09 ± 0,01	< 0,05
Δ9 desat2 (C18:1-9/C18:0)	0,50(0,49-0,58)	0,50 ± 0,04	NS
Δ6 desat (C18:3n-6/C18:2n-6)	0,09(0,02-0,22)	0,13(0,03-0,32)	NS
Δ5desat (C20:4n-6/C20:3n-6)	92,42(63,94-609,23)	66,25(51-84,92)	NS
E(n-6): C20:3n-6/C18:3n-6	0,22(0,06-1,00)	0,39(0,08-0,98)	NS
E(n-6): C22:4n-6/C20:4n-6	0,22(0,18-0,25)	0,18(0,17-0,26)	NS
E(n-6): C20:2n-6/C18:2n-6	0,03 ± 0,003	0,04(0,04-0,11)	< 0,05
E(n-3): C22:5n-3/C20:5n-3	1,83(1,52-2,82)	2,19(1,41-3,03)	NS

Les valeurs correspondent aux moyennes ± erreur standard (valeurs exprimées en pourcentage) ou médianes avec le 25^{ième} et le 75^{ième} percentile (pour les distributions suivant une log normale).

Tableau 32: Composition en acides gras totaux de la membrane érythrocytaire du groupe « mauvais répondeurs », à l'état basal et après 3 mois sous Orlistat.

	« mauvais répondeurs » n=6	Après 3 mois sous Orlistat n=6	P
Acide palmitique C16:0	26,21 ± 1,25	26,94 ± 0,96	NS
Acide palmitoléique C16:1n-7	2,74(2,05-3,73)	2,76(1,66-3,00)	NS
Acide stéarique C18:0	23,65(21,85-25,75)	23,56 ± 1,72	NS
Acide oléique C18:1n-9	9,93(6,42-11,56)	9,69(7,67-12,39)	NS
Acide linoléique C18:2n-6	6,75(6,45-7,27)	5,97(5,73-6,75)	
Acide γ-linolénique C18:3n-6	0,18(0,13-0,30)	0,26(0,12-0,98)	NS
Acide α-linolénique C18:3n-3	0,12(0,03-0,17)	0,54(0,14-0,94)	<0,05
Acide arachidique C20:0	1,10(0,69-4,20)	0,70(0,65-1,10)	
Acide eicosénoïque C20:1n-9	0,88(0,39-1,33)	0,44(0,39-0,64)	NS
Acide eicosadiénoïque C20:2n-6	0,22(0,17-0,34)	0,18 ± 0,03	
Acide homo-γ-linolénique C20:3n-6	0,12(0,04-0,21)	0,10(0,01-0,16)	NS
Acide eicosatriénoïque C20:3n-3	1,26 ± 0,17	1,27(0,95-1,52)	NS
Acide arachidonique C20:4n-6	9,63(8,57-10,24)	10,90(10,05-11,35)	< 0,05
Acide eicosapentaénoïque C20:5n-3	0,58(0,27-0,62)	0,29(0,24-0,52)	<0,05
Acide béhénique C22:0	1,39(1,30-1,55)	1,39 (1,13-1,86)	NS
Acide érucique C22:1n-9	0,33(0,17-0,50)	0,18(0,15-0,42)	NS
Acide docosatétraénoïque C22:4n-6	2,31(1,76-2,68)	2,25(2,15-2,82)	NS
Acide docosapentaénoïque C22:5n-3	0,76(0,44-1,21))	0,69(0,51-1,09)	NS
Acide lignocérique C24:0	1,40(1,05-2,50)	1,17(0,92-4,16)	NS
Acide docosahéxaénoïque C22:6n-3	5,08(2,84-6,27)	4,88 ± 0,54	NS
Acide nervonique C24:1n-9	2,8(2,23-3,79)	3,22 ± 0,23	NS
SFA (somme des saturés)	54,45(51,84-61,73)	55,02 ± 1,78	NS
MUFA(somme des monosaturés)	17,45(12,41-19,62)	16,86(14,29-18,91)	NS
PUFA (somme des polysaturés)	26,34(25,11-30,71)	27,85(26,98-28,96)	NS
PUFA/SFA	0,47(0,42-0,59)	0,51(0,46-0,54)	NS
Somme des acides gras (n-9)	15,29(9,48-15,64)	14,53(10,85-16,03)	NS
Somme des acides gras (n-6)	19,68(18,36-21,37)	19,83(19,09-21,9)	NS
Somme des acides gras (n-3)	7,19(6,66-9,18)	8,00 ± 0,45	NS
Rapport n-6/n-3	2,50(2,34-2,77)	2,49(2,35-2,69)	NS
Δ9 desat1 (C16:1-7/C16:0)	0,11 ± 0,02	0,10(0,07-0,11)	
Δ9 desat2 (C18:1-9/C18:0)	0,44(0,21-0,53)	0,42(0,30-0,63)	NS
Δ6 desat (C18:3n-6/C18:2n-6)	0,03(0,02-0,04)	0,04(0,02-0,17)	NS
Δ5desat (C20:4n-6/C20:3n-6)	132,45(49,97-225,75)	172,72(58,50-1005)	NS
E(n-6): C20:3n-6/C18:3n-6	0,46(0,25-2,10))	0,35(0,01-1,33)	NS
E(n-6): C22:4n-6/C20:4n-6	0,22(0,20-0,32)	0,21(0,20-0,25)	NS
E(n-6): C20:2n-6/C18:2n-6	0,03(0,02-0,05)	0,02(0,02-0,04)	
E(n-3): C22:5n-3/C20:5n-3	1,70(0,82-1,95)	2,07(1,89-2,58)	0,05

Les valeurs correspondent aux moyennes ± erreur standard (valeurs exprimées en pourcentage) ou médianes avec le 25^{ième} et le 75^{ième} percentile (pour les distributions suivant une log normale).

Dans le groupe « **bon répondeurs** », on observe une diminution des acides palmitoléique C16:1n-7 et linoléique C18:2n-6 ($P < 0,05$, $P < 0,05$), et une augmentation de l'acide arachidonique C20:4n-6 ($P < 0,05$). On note également une diminution du rapport C16:1n-7/C16:0 ($P < 0,05$) et une augmentation du rapport C20:2n-6/C18:2n-6 ($P < 0,05$).

Dans le groupe « **mauvais répondeurs** », les acides α -linoléique C18:3n-3 et arachidonique C20:4n-6 sont augmentés ($P < 0,05$, $P < 0,05$), et l'acide eicosapentaénoïque C20:5n-3 diminué ($P < 0,05$). On observe également une augmentation significative du rapport C22:5n-3/C20:5n-3 ($P < 0,05$).

III- DISCUSSION

A- ACIDES GRAS

En ce qui concerne l'effet de l'Orlistat sur les acides gras, les variations observées sont peu importantes et ne sont pas des facteurs explicatifs des variations de l'insulinémie et du HOMA. On remarque uniquement qu'après traitement, **une augmentation** significative de **l'acide arachidonique** qui est observée dans le groupe total des obèses et les deux sous-groupes. Cette augmentation est similaire à celle observée précédemment chez les obèses après un régime hypocalorique seul. Par ailleurs, la baisse significative de l'acide linoléique est en accord avec les données rapportées sur la composition en acides gras des différentes fractions du sérum après traitement à l'Orlistat de sujets obèses (Vidgren et al., 1999). Toutefois, il faut noter qu'elle est observée dans le groupe des 17 obèses, chez les « bons répondeurs » et pas chez les « mauvais répondeurs ».

Enfin, on remarque que le traitement à l'Orlistat semble affecter essentiellement les acides gras de la série n-6 chez les « bons répondeurs » alors que ce sont les acides gras n-3 qui sont affectés chez les « mauvais répondeurs ». Toutefois, les répercussions sur le rapport n-3/n-6 sont insignifiantes. Par conséquent, on peut avancer l'hypothèse qu'au cours de cette période de traitement de trois mois, il n'y a **pas d'effet spécifique de l'Orlistat sur la composition en acides gras** de la membrane érythrocytaire.

B- PHOSPHOLIPIDES

B.1- ETAT BASAL

A l'état basal, les deux marqueurs de l'insulino-résistance : insulinémie à jeun et HOMA du groupe d'obèses étudié dans le cadre d'un traitement à l'Orlistat sont significativement plus élevés que ceux du groupe « régime » étudié dans le chapitre 4, indiquant que les 17 obèses sont plus insulino-résistants.

L'observation que le contenu en SM de la membrane érythrocytaire est aussi significativement plus élevé confirme de nouveau qu'il existe bien une **relation positive** entre **l'insulino-résistance** et le contenu membranaire en **SM**.

Un rapport CL/PL très diminué constitue une autre anomalie significative de la membrane érythrocytaire de ces 17 obèses. Ce rapport faible peut sembler paradoxal étant donné l'affinité très forte entre le CL et la SM (Slotte et al., 1999).

Toutefois, ce résultat peut être expliqué par les niveaux relativement faibles de LDL cholestérol enregistrés chez les 17 obèses. En effet, il a été montré précédemment que le rapport CL/PL de la membrane érythrocytaire était corrélé positivement au LDL cholestérol et négativement au HDL cholestérol (Martinez et al., 1996; Piazze Garnica et al., 1997; Martinez et al., 1998).

Les taux de triglycérides élevés constituent un facteur supplémentaire en faveur d'un rapport ~~chol/PL~~ diminué. Dans une étude sur l'activité Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase de la membrane d'hématie chez des hommes d'âge moyen, il a été rapporté qu'une diminution du rapport CL/PL de la membrane d'hématie était associée à une augmentation des TG et de l'IMC (Ishizaki et al., 1994). Par ailleurs, le contre transport Na/Li dans la membrane érythrocytaire est diminué à la suite d'un traitement par régime ou pharmacologique d'une hypertriglycéridémie. Il a été suggéré que l'effet des TG sur ce système de transport résulterait de modifications dans l'environnement lipidique de la membrane (Pagano et al., 1997).

Des triglycérides élevés constituent un des éléments du syndrome métabolique, les autres composants étant une hypertension, une insulino-résistance et l'obésité. Ceci est confirmé dans notre étude par l'analyse de régression pas à pas puisque avec la SM, les TG constituent le second déterminant de la variance de l'insulinémie à jeun.

En ce qui concerne **la SM**, elle reste le premier facteur prédictif de la variance de l'insulinémie à jeun, la PE étant un autre déterminant puisque le rapport SM/PE expliquerait la variance du HOMA, la PE ayant tendance à diminuer lorsque la SM augmente. Ces résultats apportent des arguments supplémentaires à l'hypothèse membranaire de l'insulino-résistance. Il a été suggéré que des changements inverses de la SM et de la PE pouvaient être liés à une activité élevée de la Phospholipase A2 (Ponizovsky et al., 2001). Or cet enzyme, marqueur humoral de l'inflammation, augmente avec l'obésité chez les Indiens Pimas (Weyer et al., 2002).

Etant donné le rôle vraisemblable de la SM dans l'insulino-résistance confirmé par ces résultats et le fait que l'Orlistat inhibe l'absorption intestinale du cholestérol avec des répercussions éventuelles sur la composition des membranes cellulaires, il nous a paru nécessaire de rechercher les facteurs qui pourraient expliquer **la variance de la SM et du CL membranaires.**

A l'état basal, le CL et la PI membranaires, ainsi que l'insulinémie expliquent 66% de la variance de **la SM** alors que seule la SM explique 43,8 % de la variance du **CL membranaire.**

Les **relations entre SM et cholestérol** au sein de la membrane érythrocytaire ne sont pas surprenantes. Il existe une forte affinité de la SM pour le cholestérol et ils sont co-localisés dans des microdomaines membranaires. L'interaction préférentielle du cholestérol avec la SM est le résultat d'interactions de forces de Van der Waals entre les chaînes N-acyl des acides gras saturés et la moitié de la base sphingoïde du sphingolipide et le cycle plan du cholestérol (McIntosh et al., 1992; Kan et al., 1991), de liaison hydrogène entre l'azote de l'amide du sphingolipide et du groupe 3- β hydroxyl du cholestérol (Bittman et al., 1994; Sankaram et Thompson, 1990). Par ailleurs, la co-localisation au niveau de la membrane induit une régulation du cholestérol membranaire dépendante de celle de la SM (Slotte, 1999; Ridgway, 2000).

En ce qui concerne la PI qui expliquerait négativement la variance de la SM, il est possible que la relation trouvée soit tout à fait indirecte. En effet des travaux antérieurs ont montré une altération du métabolisme des phosphoinositides dans l'insulino-résistance. Les hépatocytes de rats Zucker (fa/fa) insulino-résistants ont des niveaux plus faibles de glycosyl-phosphatidylinositol que les rats insulino-sensibles, ce phénomène étant associé à une altération du signal de l'insuline dépendant de la PI (Sanchez-Gutierrez et al., 1994). Dans des membranes d'adipocytes humains, notre équipe a observé précédemment chez des obèses non diabétiques et diabétiques que le contenu en PI était plus faible chez les sujets ayant l'insulinémie à jeun la plus élevée (Zeghari et al., 2000 (a)). Par ailleurs, dans les obèses « régime » du chapitre 4, la variation de la SM est corrélée négativement à la PI après perte de poids.

B.2- APRES TROIS MOIS SOUS ORLISTAT

Quinze obèses sur 17 perdent du poids, la perte de poids moyenne étant supérieure à 6,3%.

Les données publiées antérieurement concernent pour la plupart des traitements plus longs (de six mois à deux ans). Toutefois, nos résultats semblent en accord avec des données rapportant une perte de poids de 6,8% après un traitement de 6 mois (Muls et al., 2001).

L'Orlistat est connu pour entraîner une diminution du cholestérol LDL (Muls et al., 2001 ; Gokcel et al, 2002 ; Naumov et al, 2002, Kelley et al, 2002). Dans notre cas, nous n'avons observé aucune variation du cholestérol LDL. On peut envisager plusieurs hypothèses pour expliquer ce résultat.

Il est possible qu'une période correspondant à un traitement de trois mois soit trop courte pour observer des variations significatives du cholestérol LDL. Le traitement avec l'Orlistat varie entre 1 et 2 ans (Karhunen et al., 2000; Rosenfalck et al., 2002; Ballinger et Peikin, 2002,) et les effets bénéfiques sur les facteurs de risques cardiovasculaire incluant le CT, le cholestérol LDL, la pression sanguine et la glycémie ne sont significatifs qu'après une durée de traitement minimale de 6 mois (Audikovszky et al., 2001, Gokcel et al, 2002).

Par ailleurs, des **variations significatives des paramètres lipidiques** après un traitement avec Orlistat ne sont observées que chez des sujets obèses caractérisés par le syndrome X (taux de TG > 2,2 mM/L et taux de cholestérol HDL < 1,0 mM/L), (Reaven et al., 2001). Or, sur les 17 obèses de cette étude, 3 seulement répondent à ce critère et le taux moyen de cholestérol LDL basal est relativement faible.

L'amélioration des marqueurs de l'insulino-résistance, significative pour l'insulinémie à jeun et limite pour le HOMA est inférieure aux données rapportées par Kelley et al. (2002). Dans ce cas encore, la période d'observation est vraisemblablement trop courte. Toutefois, le fait que sur les 17 obèses de l'étude, l'insulinémie baisse chez 11 d'entre eux et augmente chez 6 obèses, permet d'envisager d'autres hypothèses qui seront exposées à la fin de cette discussion.

Pour les paramètres membranaires, à notre connaissance, il n'existe aucune donnée dans la littérature sur l'influence d'un traitement avec l'Orlistat (associé au régime hypocalorique), sur la composition en phospholipides des membranes.

Dans ce groupe d'obèses dont les perturbations membranaires étaient plus importantes à l'état basal que dans le groupe « régime seul » du chapitre précédent, la diminution de la PC, SM et PS correspond à une tendance à la normalisation des paramètres membranaires.

Les résultats mettent de nouveau en évidence les relations étroites entre la SM et les marqueurs de l'insulino-résistance. Seules les variations de la SM expliqueraient les variations de l'insulinémie à jeun et du HOMA.

Le fait que l'insulinémie à jeun et la PC expliqueraient les variations de la SM n'est pas contradictoire. La SM et la PC sont localisés pratiquement exclusivement dans la couche lipidique externe de la membrane érythrocytaire. Des interactions existent entre ces deux lipides qui dépendent de la longueur de la chaîne acyle ou de son degré d'insaturation. La miscibilité entre les deux phospholipides est augmentée lorsque les chaînes acyles sont de longueurs identiques ou en présence d'une double liaison (Lentz et al., 1981, Barenholz, 1984). Or, les chaînes acyles majoritaires dans la sphingomyéline de l'érythrocyte humain comportent 16 carbones (palmitique), qui existe également en proportion importante dans la PC et 24 carbones avec une double liaison (nervonique) (Barenholz, 1984). Par conséquent, on peut supposer que les variations de ces deux phospholipides soient plus ou moins liées.

En ce qui concerne les variations du CL membranaire, celles de la SM, en dépit des interactions fortes entre le sphingolipide et le cholestérol, n'expliqueraient pas les variations de cholestérol. Seules les variations du poids et du cholestérol HDL seraient des facteurs explicatifs de la variation du CL membranaire. Les relations inverses entre le CL membranaire et le cholestérol HDL sont bien connues. Les enfants hypercholestérolémiques ont un rapport CL/PL élevé au niveau de la membrane d'hématie, et ces altérations lipidiques membranaires sont corrélées négativement au cholestérol HDL (Martinez et al., 1998).

Un régime riche en graisses induit une augmentation du CL et des phospholipides membranaires, une augmentation des CT et du cholestérol LDL, et une diminution du cholestérol HDL (Shanmugasundaram et al., 1986).

Toutefois, le rôle du poids et du cholestérol HDL dans la variation du CL membranaire peut être un effet spécifique de l'Orlistat. En effet, le Orlistat diminue l'absorption intestinale du cholestérol alimentaire (Mittendorfer et al., 2001). Il est vraisemblable que la composition des lipoprotéines puisse être modifiée avec une augmentation en particulier de la proportion des phospholipides (PL) dans les HDL. Or, il a été rapporté que les HDL PL sont les déterminants majeurs de l'efflux de cholestérol (Fournier et al., 2001).

En se basant sur l'évolution des marqueurs de l'insulino-résistance, notre étude a permis de mettre en évidence des sujets « bons répondeurs » et « mauvais répondeurs ». On constate qu'à l'état basal, le groupe « bons répondeurs » a une insuliniémie à jeun, un contenu membranaire en SM et un rapport SM/PC plus élevés que le groupe « mauvais répondeurs », suggérant que le syndrome métabolique serait plus important chez les « bons répondeurs ». Après Orlistat, pour les « bons répondeurs », l'insuliniémie et le HOMA baissent ainsi que le contenu en SM et le rapport SM/PC alors que pour les sujets « mauvais répondeurs » l'insuliniémie, le HOMA et le rapport SM/PC augmentent et le contenu en SM ne varie pas. Ce résultat est à rapprocher des résultats de Reaven et al., (2001), qui ont montré que l'Orlistat diminue les facteurs de risques cardio-vasculaires chez des sujets avec le syndrome X alors que les effets sont beaucoup moins marqués chez les sujets ne présentant pas de syndrome X.

C- ANALYSE DE LA REPONSE A LA PERTE DE POIDS DANS LES GROUPES « REGIME » (CHAPITRE 4) ET ORLISTAT

Nos différentes études ont clairement établi que les sujets les **plus hyperinsulinémiques** ont les concentrations membranaires de **SM les plus élevées**. La réponse à la perte de poids constitue un « phénotype dynamique » qui permet de mieux comprendre les relations entre l'obésité, l'hyperinsulinémie ou l'insulino-résistance dont ce dernier paramètre est le marqueur, et les phospholipides membranaires.

Il nous a semblé intéressant d'analyser conjointement les résultats de l'étude régime seul et de l'étude médicamenteuse en fonction de la perte de poids (au moins 5 % du poids initial ou moins de 5 %). Il n'est pas licite d'envisager à ce stade une quelconque analyse statistique. Les effectifs sont trop faibles et surtout les groupes ne sont pas comparables, par définition, puisque sélectionnés sur des critères différents. Cependant, les constatations suivantes apparaissent clairement :

- les sujets de l'étude Orlistat, très androïdes, sont aussi très hyperinsulinémiques. Leur taux de SM membranaire est élevé par rapport à celui observé dans le groupe « régime seul ».
- La diminution de la SM membranaire est la plus importante (18,6 %) chez les patients hyperinsulinémiques qui perdent plus de 5 % de leur poids initial. Au contraire la SM

ne baisse que de 1,15 % chez les sujets moins hyperinsulinémiques du groupe « régime seul » qui ont pourtant perdu également environ 8 % de leur poids initial. On peut penser que l'Orlistat n'est pas en cause, car il n'est pas connu pour avoir des effets directs sur la sensibilité à l'insuline. La poursuite de ces deux études permettra de mieux clarifier ce point.

- Les mêmes constatations peuvent être faites vis à vis des anomalies lipidiques du syndrome métabolique : ce sont les sujets a priori les plus insulino-résistants qui ont la baisse la plus importante de la triglycéridémie et la baisse la moins forte du cholestérol HDL.
- En revanche le cholestérol LDL diminue plus chez les sujets a priori moins insulino-résistants du groupe régime seul (chapitre 4) qui ont perdu plus de 5 % de leur poids initial. Ce n'est pas étonnant car l'excès de cholestérol LDL ne fait pas partie des anomalies caractéristiques du syndrome métabolique. L'effet propre de l'Orlistat ne peut être analysé ici. Rappelons néanmoins que selon l'analyse de Reaven et al., (2001), la perte de poids qu'il entraîne est associée à une amélioration franche de la dyslipidémie du syndrome métabolique.

Au total l'excès de SM membranaire semble bien associé aux autres anomalies métaboliques du syndrome X, dans les études transversales comme dans les études longitudinales d'intervention.

IV- CONCLUSION.

Nos résultats ont mis en évidence une amélioration marquée de la composition en phospholipides des membranes d'hématies après un traitement de trois mois avec l'Orlistat.

Toutefois, il est difficile de conclure sur un petit nombre de sujets quant à un effet spécifique de l'Orlistat sur la perte de poids, l'insulino-sensibilité et les paramètres membranaires.

Pour élucider son mécanisme d'action, il faudrait envisager :

- un nombre plus important de patients étudiés simultanément avec des obèses traités seulement avec un régime hypocalorique, les deux groupes étant appariés au niveau des paramètres anthropométriques et des marqueurs de l'insulino-résistance,

- une période d'observation supérieure à trois mois.

- une sélection de patients ayant en particulier des taux de triglycérides et de cholestérol LDL plus élevés.

- Il a été montré *in vitro* dans le modèle de cellule intestinale humaine (Caco-2) que les ligands de l'hétérodimère : récepteur hépatique X/récepteur rétinoïde X (LXR/RXR) augmentaient l'expression du gène de « l'ATP-binding cassette » transporteur (ABCA-1) (Murthy et al., 2002). Les auteurs ont fait l'hypothèse que ABCA-1 jouerait un rôle important dans la production d'HDL intestinales et l'absorption du cholestérol. L'Orlistat inhibant l'absorption du cholestérol, il serait important de rechercher s'il a une action sur l'expression du gène ABCA-1.

- Il a été suggéré que la capacité à perdre du poids à la suite d'un régime hypocalorique ne varie pas chez les femmes obèses comme une fonction de l'insulino-résistance ou l'hyperinsulinémie (McLaughlin et al., 1999). Nos résultats nous conduisent à émettre l'hypothèse que la capacité à améliorer l'insulino-sensibilité chez des femmes obèses à la suite d'un régime hypocalorique ou d'une association médicament-régime (Orlistat) n'est pas une fonction de la perte de poids. Par conséquent, il serait indispensable de déterminer avec précision les caractéristiques des sujets obèses « bons répondeurs » et « mauvais répondeurs » à l'un ou l'autre des traitements.

CHAPITRE 6

Composition des lipoprotéines au cours de la lipémie post prandiale – Relations avec les marqueurs de l'insulino-résistance et la composition lipidique de l'hématie et de l'adipocyte

(Etude préliminaire)

I- INTRODUCTION

Les mécanismes impliqués dans les anomalies de composition en phospholipides des membranes cellulaires mises en évidence chez des femmes obèses insulino-résistantes ne sont pas élucidés pour l'instant.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces altérations:

- un processus mettant en jeu des modifications de la synthèse ou du catabolisme des phospholipides,
- des altérations du processus dynamique régulant les échanges de phospholipides entre les lipoprotéines et les membranes cellulaires, un processus de simple diffusion étant le seul en cause au niveau des membranes d'hématie. En revanche, il peut se faire dans d'autres types cellulaires par l'intermédiaire de récepteurs: CLA-1 équivalent chez l'homme de SR-BI, ABCA-1 (Calvo et al., 1998 ; Gillotte-Taylor et al., 2002) ou à la suite d'une incorporation des lipoprotéines dans des cellules comme les adipocytes (Fong et al., 1984 ; Despres et al., 1987).

Des données antérieures sont en faveur de l'hypothèse de la modification des échanges de phospholipides entre les lipoprotéines et les cellules. En effet, des anomalies du métabolisme des lipoprotéines ont été décrites dans l'insulino-résistance associée à l'obésité (Howard, 1999; Ginsberg et Huang, 2000). Quelques travaux mettent en évidence des anomalies au niveau des phospholipides des lipoprotéines. Une diminution de PE, PI+PS, et SM a été retrouvée dans les VLDL + LDL ainsi que dans les sous fractions HDL2 et HDL3 chez des patients hypertendus qui présentent fréquemment une baisse de la sensibilité à l'insuline (Bagdade et al., 1995). Une baisse significative des PL totaux dans les HDL a été retrouvée chez des patients obèses non diabétiques mais insulino-résistants (Tilly-Kiesi et al., 1996). Chez des patients diabétiques de type II, il existe une augmentation de la SM et de la PC dans les HDL2 (Bagdade et al., 1990). Les phospholipides des HDL (HDL PL) pourraient jouer un rôle particulièrement important car l'efflux de cholestérol est lié au taux de HDL PL et de plus en relation avec les sous classes de phospholipides dans les HDL, particulièrement la PC, SM et le rapport SM/PE (Fournier et al., 1997). Enfin, le taux de HDL PL semble négativement lié au taux de triglycérides plasmatiques (Kahri et al., 1995), l'hypertriglycéridémie étant fréquemment associée à l'insulino-résistance dans le syndrome X.

Dans la plupart des cas, la composition des lipoprotéines est déterminée à jeun et reflète le métabolisme lipidique «au repos». Or, même les sujets sains sont dans un état d'hypertriglycéridémie postprandiale la plupart du temps en raison de la fréquence des repas et chez les sujets hyperlipidémiques, la situation est quasiment permanente (De Man et al., 1996). Des anomalies du métabolisme postprandial des lipoprotéines riches en triglycérides (LRT) ont été décrites dans l'obésité, même sans hypertriglycéridémie à jeun (Mekki et al., 1999). Par conséquent, les anomalies des phospholipides des lipoprotéines pourraient être accentuées en situation post prandiale, car au cours de cette période, les échanges lipidiques plasmatiques sont majorés et le degré d'insulino-résistance intervient également sur les paramètres de l'épuration lipidique post prandiale. Or, il existe peu de données sur les altérations post prandiales de composition des phospholipides des lipoprotéines (Lewis et al., 1990; Groener et al., 1998). Enfin, à notre connaissance, il n'existe pas de données présentant l'existence de relations entre la composition des membranes cellulaires et celles des fractions lipoprotéiques.

L'objectif de cette étude a été de déterminer dans un échantillon de femmes obèses présentant des degrés variables d'insulino-résistance:

- (1) les profils de composition en phospholipides de la membrane d'hématie et de celle de l'adipocyte et des acides gras de la membrane d'hématie,
- (2) l'évolution de la composition lipidique du plasma et des fractions lipoprotéiques en période post-prandiale,
- (3) le niveau des relations entre la composition lipidique du plasma, des fractions lipoprotéiques en période post prandiale et :
 - le degré d'insulino-résistance des patientes,
 - la composition en phospholipides et acides gras de la membrane d'hématie,
 - la composition en phospholipides de la membrane d'adipocyte,
- (4) le niveau des relations entre la composition en phospholipides des HDL et celle de la membrane d'hématie et de l'adipocyte.

Les résultats sont tout à fait préliminaires. En raison de la lourdeur des investigations cliniques (clamp euglycémique hyperinsulinémique), ils ne concernent pour l'instant que 8 patientes.

II- RESULTATS

A- CARACTERISTIQUES CLINIQUES, LIPIDIQUES, ET METABOLIQUES

Les caractéristiques cliniques, lipidiques et métaboliques des sujets sont résumées dans le tableau 33.

Tableau 33 : Caractéristiques cliniques et plasmatiques des obèses

Paramètres	Obèses (8 sujets)
Age (ans)	36 ± 4 (*)
IMC (kg/m ²)	32,6 ± 1,4
Tour de taille (cm)	104,9 ± 4,8
Tour de hanches (cm)	109,0 ± 3,1
RTH	0,96 ± 0,03
Glycémie à jeun (mM)	4,96 ± 0,24
Insulinémie à jeun (mU/l)	10,71 ± 1,43
HOMA	2,31 (1,64-2,72)
M (mg/kg/min)	5,43 (4,80-7,02)
Triglycérides (mmol/l)	1,51 ± 0,20
Cholestérol total (mmol/l)	5,31 (5,24-5,77)
Cholestérol HDL (g/l)	0,47 ± 0,05
Cholestérol LDL (g/l)	1,48 ± 0,12

(*) Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM ou médiane avec le 25^{ième} et le 75^{ième} percentile (pour les distributions log normales).

Il s'agit de sujets d'âge moyen (36 ± 4 ans), obèses (IMC = 32,6 ± 1,4 kg/ m²), plutôt androïdes (RTH = 0,96 ± 0,03), et insulino-résistants (M Clamp = 5,43 mg/kg/min).

La moyenne du M clamp d'une population non obèse est de 8,03 ± 0,68 mg/kg/min (DeDronzo et al., 1979).

B- PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES DE L'HEMATIE, DE L'ADIPOCYTE ET ACIDES GRAS DE L'HEMATIE

Les classes majeures de phospholipides, ainsi que le CL de la membrane des hématies et des adipocytes des sujets, et les acides gras de la membrane de l'hématie sont résumés dans les tableaux 34 et 35.

Tableau 34: Composition en phospholipides et en CL de la membrane de l'hématie et de l'adipocyte.

Phospholipides membranaires	Hématie	Adipocyte	P
Phosphatidyléthanolamine (PE)	267 ± 17	390 ± 27	< 0,01
Phosphatidylinositol (PI)	35 ± 1	107 ± 5	< 0,005
Phosphatidylsérine (PS)	101(100-127)	178 ± 11	< 0,005
Phosphatidylcholine (PC)	250(213-274)	484 ± 26	< 0,001
Sphingomyéline (SM)	116(110-128)	120 ± 7	NS
Phospholipides totaux (PL)	786 ± 30	1278 ± 66	< 0,001
Cholestérol membranaire (CL)	234(201-281)	135(92-150)	< 0,005
CL/ PL	0,29(0,25-0,37)	0,10 ± 0,01	< 0,001
PE/PC	0,99(0,84-1,27)	0,81 ± 0,04	NS
SM/PE	0,46 ± 0,03	0,32 (0,30-0,35)	< 0,005
SM/PI	3,45(3,09-3,63)	1,18(1,07-1,27)	< 0,005
SM/PC	0,47(0,45-0,48)	0,25 ± 0,02	< 0,001
SM/CL	0,51 ± 0,05	0,94(0,78-1,47)	< 0,005

PE, PI, PS, PC, SM et CL sont exprimés en µg/mg de protéines (moyenne ± SEM ou médiane avec le 25^{ième} et le 75^{ième} percentile (pour les distributions log normales).

La PC et la PE sont les phospholipides majoritaires des membranes d'hématies et d'adipocytes. La membrane d'adipocyte contient plus de PE, PI, PS et de PC et moins de CL membranaire par rapport à la membrane d'hématie. En revanche, on retrouve les même quantités de SM dans les deux types cellulaires.

La composition en acides gras de la membrane d'hématie est reportée dans le tableau 35.

Tableau 35: Composition en acide gras de la membrane érythrocytaire.

Acides gras membranaires	Moyenne \pm SEM
Acide palmitique C16:0	29,99 \pm 1,50
Acide palmitoléique C16:1n-7	2,25 (1,56-2,67)
Acide stéarique C18:0	21,06 (20,14-23,33)
Acide oléique C18:1n-9	9,74 \pm 0,49
Acide linoléique C18:2n-6	6,70 \pm 0,48
Acide γ -linoléique C18:3n-6	0,52 (0,43-0,67)
Acide α -linoléique C18:3n-3	0,14 (0,07-0,20)
Acide arachidique C20:0	0,69 (0,51-0,83)
Acide eicosénoïque C20:1n-9	0,23 \pm 0,03
Acide eicosadiénoïque C20:2n-6	0,62 \pm 0,16
Acide dihomoylinoléique C20:3n-6	0,36 \pm 0,09
Acide eicosatriénoïque C20 :3n-3	1,34 (0,98-1,68)
Acide arachidonique C20:4n-6	10,57 \pm 0,45
Acide eicosapentaénoïque C20:5n-3	0,54 \pm 0,05
Acide béhénique C22:0	2,08 \pm 0,22
Acide érucique C22 :1n-9	0,39 \pm 0,04
Acide docosatétrénoïque C22:4n-6	1,86 \pm 0,06
Acide docosapentaénoïque C22 :5n-3	0,47 (0,38-0,63)
Acide lignocérique C24 :0	2,80 \pm 0,47
Acide docosahexaénoïque C22 :6n-3	5,19 \pm 0,44
Acide nervonique C24 :1n-9	0,30 (0,14-0,98)
SFA	49,90 (47,11-53,68)
MUFA	13,68 \pm 0,45
PUFA	28,65 \pm 0,67
PUFA/SFA	0,568 \pm 0,031
Somme des n-9	11,49 (10,51-11,67)
Somme des n-3	7,96 \pm 0,44
Somme des n-6	20,68 \pm 0,82
Rapport n-6/n-3	2,68 \pm 0,23

Les valeurs sont exprimés correspondent aux moyennes \pm SEM ou médiane avec le 25^{ième} et le 75^{ième} percentile (pour les distributions log normales).

Par comparaison au groupe d'obèses de l'étude Orlistat (chapitre 5), ce groupe est caractérisé par un rapport PUFA/SFA plus élevé (un taux de SFA plus faible), des proportions en acides gras n-6 plus élevées (les acides γ -linoléique, eicosadiénoïque, arachidonique sont augmentés), et par de

plus faibles proportions en acides gras n-9 (le taux d'acide nervonique est plus faible). Le rapport n-6/n-3 est donc plus élevé dans ce groupe.

C- COMPOSITION DES LIPIDES PLASMATIQUES ET DES LIPOPROTEINES AU COURS DE LA LIPEMIE POST PRANDIALE

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 36.

C.1- LIPIDES PLASMATIQUES

L'ANOVA montre une différence significative dans la modification du taux de TG totaux en fonction du temps : (ANOVA : $F= 4,16$; $P<0,05$): avec un taux de 1,23 g/l (T0); 1,91 g/l (T4); 0,89 g/l (T10). La différence est significative entre T0 et T4 ($P < 0,05$) et T4 et T10 ($P< 0,01$).

L'ANOVA ne met pas en évidence de modifications significatives du taux du CT et des PL totaux en fonction du temps.

C.2- LIPOPROTEINES RICHES EN TRIGLYCERIDES (LRT)

L'ANOVA met en évidence des modifications significatives du taux des TG dans les LRT en fonction du temps (ANOVA: $F= 9,83$; $P<0,005$). Les valeurs moyennes sont: $0,56 \pm 0,07$ g/l (T0); 1,05 g/l (T4); 0,26 g/l (T10). La différence est significative entre T0 et T4 ($P < 0,05$) et T4 et T10 ($P< 0,0005$).

Il n'y a pas de modifications significatives du taux de CT et des PL totaux en fonction du temps.

C.3- LDL

L'ANOVA ne montre pas de différences significatives concernant les taux de TG, PL et CT dans les LDL.

C.4- HDL

L'ANOVA ne montre pas de différences significatives concernant les taux de TG, CT et PL dans les HDL.

Il existe également cependant une tendance à l'augmentation du taux des PL et du taux de PC; les valeurs des PL dans les HDL aux différents temps de la lipémie sont: $0,69 \pm 0,07$ g/l (T0); $0,71 \pm 0,07$ g/l (T4) ; $0,76 \pm 0,08$ g/l (T10), et ceux de la PC : $0,72 \pm 0,10$ g/l (T0); $0,79 \pm 0,14$ g/l (T4); $0,85 \pm 0,16$ g/l (T10).

Tableau 36: Composition des lipoprotéines à jeun (T0) et en période post prandiale (T4 et T10)

	T0 h	T4 h	T10 h	ANOVA
TG plasmatique	1,23 (0,89-1,54)	1,91 (1,40-2,16) ^a	0,89 (0,60-1,08) ^{**}	< 0,05
CT plasmatique	1,92 (1,80-2,17)	2,07 (1,74-2,18)	2,01 (1,89-2,16)	
PL plasmatique	$2,13 \pm 0,15$	$2,26 \pm 0,16$	2,13 (2,02-2,42)	
LRT TG	$0,56 \pm 0,07$	1,05 (0,75-1,12) ^a	0,26 (0,16-0,47) ^{***}	< 0,005
LRT CT	$0,25 \pm 0,06$	$0,30 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,06$	
LRT PL	$0,19 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,05$	0,10 (0,04-0,28)	
LDL TG	$0,17 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,01$	
LDL CT	$1,51 \pm 0,17$	$1,48 \pm 0,15$	1,34 (1,27-1,83)	
LDL PL	$0,68 \pm 0,07$	$0,71 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,05$	
HDL TG	$0,12 \pm 0,01$	0,13 (0,12-0,15)	$0,10 \pm 0,01$	
HDL CT	$0,52 \pm 0,05$	$0,49 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,05$	
HDL PL	$0,69 \pm 0,07$	$0,71 \pm 0,07$	$0,76 \pm 0,08$	
HDL PC	$0,72 \pm 0,10$	$0,79 \pm 0,14$	$0,85 \pm 0,16$	
HDL SM	$0,12 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$	

Les valeurs (exprimées en g/l), correspondent aux moyennes \pm SEM ou médiane avec le 25^{ième} et le 75^{ième} percentile (pour les distributions log normales).

^a $P < 0,05$; comparé au temps T0 h.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0005$; le temps T4 comparé au temps T10 h.

D- RELATIONS ENTRE LES DIFFERENTS PARAMETRES

D.1- PARAMETRES CLINIQUES, LIPIDIQUES ET INSULINO-RESISTANCE

L'analyse de régression linéaire met en évidence des relations significatives entre la valeur M du clamp et le poids ($r = -0,858$ $P < 0,01$), l'IMC ($r = -0,881$ $P < 0,005$), le tour de taille ($r = -0,799$ $P < 0,05$), le cholestérol HDL ($r = 0,791$ $P < 0,05$) et le cholestérol LDL ($r = -0,723$ $P < 0,05$).

En revanche, les paramètres cliniques et plasmatiques ne sont pas corrélés avec les valeurs du HOMA et de l'insulinémie à jeun.

D.2- PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES ET INSULINO-RESISTANCE

Au niveau de l'hématie, l'insulinémie à jeun est corrélée à deux phospholipides: PC ($r = 0,871$ $p < 0,005$) et SM ($r = 0,844$ $p < 0,01$). Le HOMA est également corrélé à la PC ($r = 0,797$ $p < 0,05$) et à la SM ($r = 0,678$ $p < 0,05$).

M n'est corrélé à aucun des paramètres membranaires du globule rouge.

Au niveau de l'adipocyte, l'insulinémie à jeun est corrélée à la SM ($r = 0,745$ $p < 0,05$), ainsi que le HOMA ($r = 0,692$ $p < 0,05$).

M n'est corrélé à aucun des paramètres membranaires de l'adipocyte.

D.3- ACIDES GRAS MEMBRANAIRES DE L'HEMATIE ET INSULINO-RESISTANCE

L'insulinémie à jeun est positivement corrélée à l'acide docosapentaénoïque C22:5n-3 ($r = 0,722$ $P < 0,05$).

Le HOMA est corrélé négativement à l'acide arachidonique C20:4n-6 ($r = -0,724$ $P < 0,05$), au rapport PUFA/ SFA ($r = -0,894$ $P < 0,005$), et positivement aux acides gras saturés SFA ($r = 0,828$ $P < 0,05$).

M est positivement corrélé à l'acide arachidonique C20:4n-6 ($r = 0,755$ $P < 0,05$).

D.4- PARAMETRES DE LA LIPEMIE POST-PRANDIALE ET INSULINO-RESISTANCE

Aucune relation n'a été trouvée entre les paramètres de l'insulino-résistance (M du clamp, l'insulinémie à jeun et le HOMA) et les variations de composition des LRT et LDL en période postprandiale au trois temps.

En ce qui concerne les HDL, il n'existe aucune corrélation avec l'insulinémie à jeun et le HOMA. Les seules corrélations significatives ont été trouvées avec le M du clamp et sont rassemblées dans le tableau 37.

Tableau 37: Coefficients de corrélation entre l'indice d'insulino-résistance M du clamp et la composition des HDL au cours de la lipémie post prandiale.

		M du clamp (mg/ Kg/ min)	
HDL TG	T4	0,839	P < 0,01
HDL CT	T4	0,807	P < 0,05
AUC HDL CT		0,747	P < 0,05
HDL PL	T0	0,710	P < 0,05
	T4	0,846	P < 0,01
	T10	0,765	P < 0,05
AUC HDL PL		0,827	P < 0,05

Au temps T0, seul le taux de phospholipides des HDL est corrélé avec M du clamp ($r = 0,710$ $p < 0,05$).

Au temps T4, les taux des triglycérides, du cholestérol total, et des phospholipides des HDL sont corrélés avec le degré d'insulinorésistance mesuré par clamp euglycémique hyperinsulinémique (respectivement, $r = 0,839$ $P < 0,01$; $r = 0,807$ $P < 0,05$; $r = 0,846$ $P < 0,01$).

Au temps T10, seuls les phospholipides des HDL sont corrélés avec le degré d'insulinorésistance mesuré par clamp ($r = 0,765$ $P < 0,05$).

Le M du clamp est également corrélé positivement à l'AUC HDL CT ($r = 0,747$ $P < 0,05$), et à aire sous la courbe (AUC) des HDL PL ($r = 0,827$ $P < 0,05$).

La figure 26 montre la relation entre le M du clamp et l'AUC HDL PL.

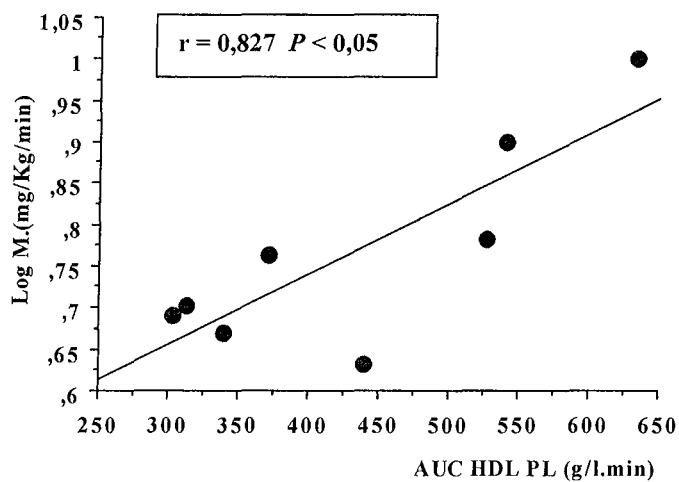


Figure 26: Régression linéaire du M du clamp (mg/Kg/min) en fonction de l'AUC HDL PL (g/l.min).

D.5- PARAMETRES DE LA LIPEMIE POST PRANDIALE ET PARAMETRES MEMBRANAIRES DE L'HEMATIE

D.5.1- Phospholipides

Il existe uniquement une corrélation négative entre les HDL PL et le rapport SM/PE de la membrane érythrocytaire à jeun et aux deux temps de la lipémie post prandiale (tableau 38).

L'AUC HDL PL est également négativement corrélée au rapport SM/PE (tableau 38 et figure 27).

Tableau 38: Coefficients de corrélation entre le rapport SM/PE et les variations postprandiales des HDL PL.

		SM/PE	
HDL PL	T0	-0,751	P < 0,05
	T4	-0,782	P < 0,05
	T10	-0,725	P < 0,05
AUC HDL PL		-0,842	P < 0,05

La figure 27 montre la relation entre le rapport SM/PE de la membrane de l'hématie et l'AUC HDL PL.

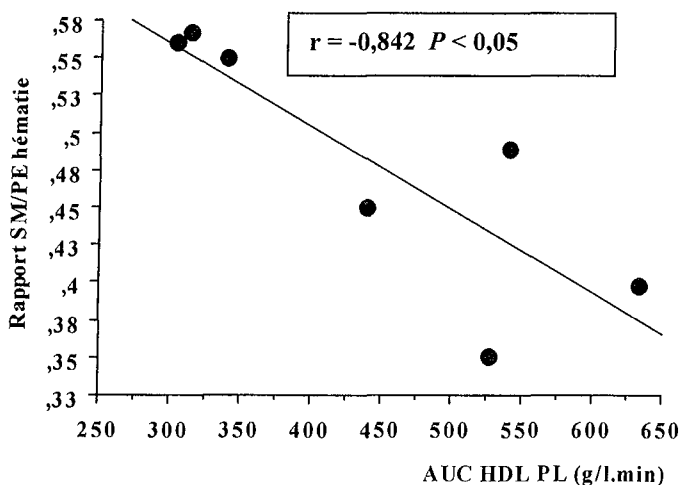


Figure 27: Régression linéaire du rapport SM/PE de l'hématie en fonction de l'AUC HDL PL (g/l.min).

D.5.2- Acides gras

Seul, l'acide arachidonique C20:4n-6 est corrélé négativement au cholestérol total et aux phospholipides des LDL au temps T0 et en post prandial à T10. Cet acide gras est corrélé positivement à la PC et à la SM dans les HDL (tableau 39).

L'acide arachidonique C20:4n-6 est également corrélé positivement à l'AUC HDL PC (tableau 39).

Tableau 39: Coefficients de corrélation entre l'acide arachidonique et les variations des LDL et HDL.

		Acide arachidonique C20:4n-6	
LDL CT	T0	-0,800	P < 0,05
	T10	-0,887	P < 0,05
LDL PL	T0	-0,736	P < 0,05
	T10	-0,904	P < 0,01
HDL PC	T0	0,852	P < 0,05
	T4	0,928	P < 0,05
AUC HDL PC		0,884	P < 0,05
HDL SM	T4	0,925	P < 0,05
	T10	0,949	P < 0,05

D.6- PARAMETRES DE LA LIPEMIE POST PRANDIALE ET PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES DE L'ADIPOCYTE.

Les corrélations entre les phospholipides membranaires de l'adipocyte et les variations de composition des lipoprotéines à jeun et en postprandial sont plus nombreuses par rapport à celles observées avec les phospholipides de l'hématie. Il ressort de l'analyse de régression linéaire que le rapport SM/PE est corrélé aux HDL comme dans le cas de la membrane érythrocytaire.

Par ailleurs, des corrélations existent également entre la SM, la PC et les lipoprotéines.

D.6.1- Rapport SM/PE

Le rapport SM/PE de l'adipocyte est corrélé négativement avec les HDL CT en post prandial et l'AUC HDL CT (tableau 40). Il faut noter que dans le cas de la membrane érythrocytaire, le rapport SM/PE est corrélé négativement avec les HDL PL à jeun et en post prandial.

Tableau 40: Coefficients de corrélation entre le rapport SM/PE et les HDL CT.

		SM/PE	
HDL CT	T4	-0,753	P < 0,05
	T10	-0,764	P < 0,05
AUC HDL CT		-0,759	P < 0,05

D.6.2- Sphingomyéline (SM)

Le contenu en SM de la membrane adipocytaire est corrélé positivement aux triglycérides (TG) et cholestérol total (CT) plasmatiques, et à l'AUC des TG et CT plasmatiques à jeun et en post prandial. Il est également corrélé positivement aux LDL CT et PL, et à l'AUC des LDL CT et PL à jeun et en post prandial (tableau 41 et figure 28).

Tableau 41: Coefficients de corrélation entre la SM et les variations de composition des lipides plasmatiques et des LDL au cours de la lipémie postprandiale.

		SM ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines)	
TG plasmatique	T0	0,692	P < 0,05
	T4	0,714	P < 0,05
	T10	0,721	P < 0,05
AUC TG plasmatique		0,717	P < 0,05
CT plasmatique	T0	0,797	P < 0,05
	T10	0,790	P < 0,05
AUC CT plasmatique		0,757	P < 0,05
LDL CT	T0	0,779	P < 0,05
	T4	0,755	P < 0,05
	T10	0,726	P < 0,05
AUC LDL CT		0,805	P < 0,05
LDL PL	T0	0,781	P < 0,05
	T10	0,798	P < 0,05
AUC LDL PL		0,866	P < 0,05

La figure 28 montre la relation entre la concentration en SM dans l'adipocyte et l'AUC LDL PL

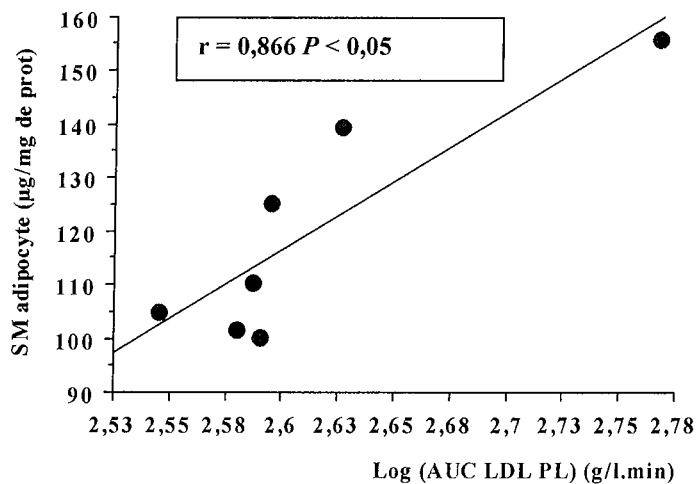


Figure 28: Régression linéaire de la SM ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines) en fonction de l'AUC LDL PL (g/l.min).

D.6.3- Phosphatidylcholine (PC)

A l'inverse de la SM, la PC est corrélée négativement aux lipoprotéines: aux TG et PL des LRT à jeun et au temps T4, et aux TG des LDL au temps T10 (Tableau 42). La PC est également corrélée négativement à l'AUC LRT TG et à l'AUC LRT PL (Tableau 42 et figures 29 et 30).

Tableau 42: Coefficients de corrélation entre la PC et les variations de composition des LRT et des LDL au cours de la lipémie postprandiale.

		PC ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines)	
LRT TG	T0	-0,756	P < 0,05
	T4	-0,834	P < 0,05
AUC LRT TG		-0,787	P < 0,05
LRT PL	T0	-0,755	P < 0,05
	T4	-0,839	P < 0,05
AUC LRT PL		-0,814	P < 0,05
LDL TG	T10	-0,796	P < 0,05

Les figures 29 et 30 illustrent les relations entre la PC de la membrane adipocytaire et les AUC des LRT TG et LRT PL.

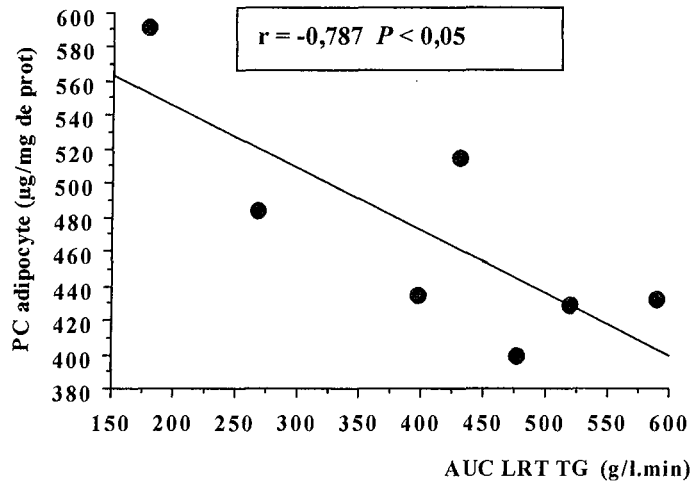


Figure 29: Régression linéaire de la PC adipocytaire (µg/mg de protéines) en fonction de l'AUC LRT-TG (g/l.min).

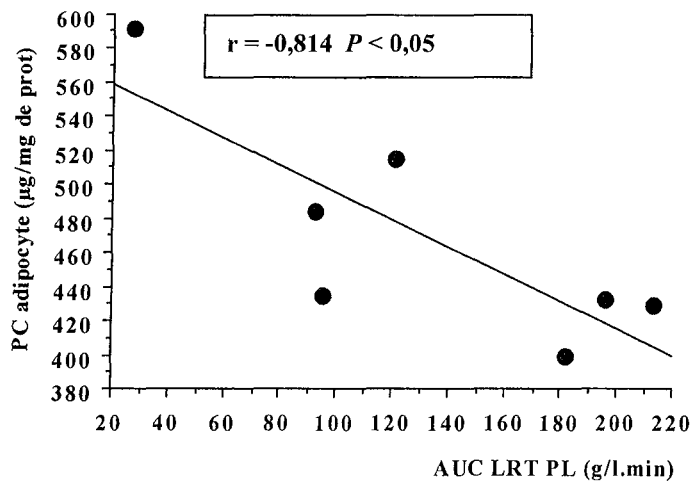


Figure 30: Régression linéaire de la PC adipocytaire (µg/mg de protéines) en fonction de l'AUC LRT-PL (g/l.min).

Etant donné que la PC est le phospholipide majoritaire dans la membrane de l'adipocyte, il est logique de trouver des corrélations pratiquement identiques mais positives entre le rapport CL/PL de la membrane adipocytaire et la composition des LRT et des LDL.

Les figures 31 et 32 illustrent les relations entre le rapport CL/PL membranaire et les AUC des LRT TG et LRT PL.

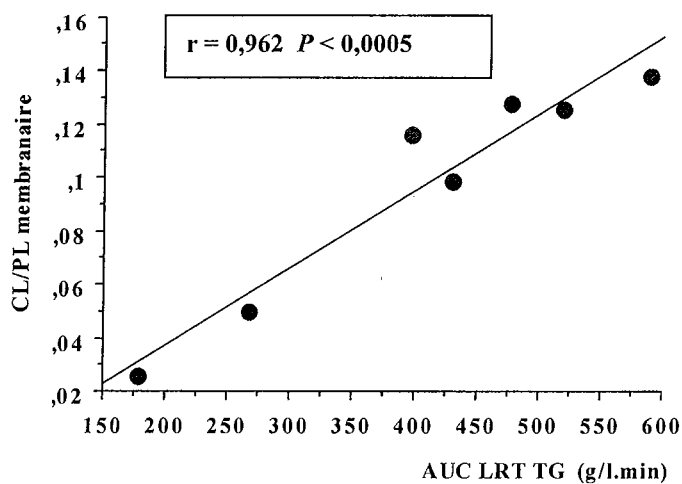


Figure 31: Régression linéaire du rapport CL/PL membranaire en fonction de l'AUC LRT PL (g/l.min).

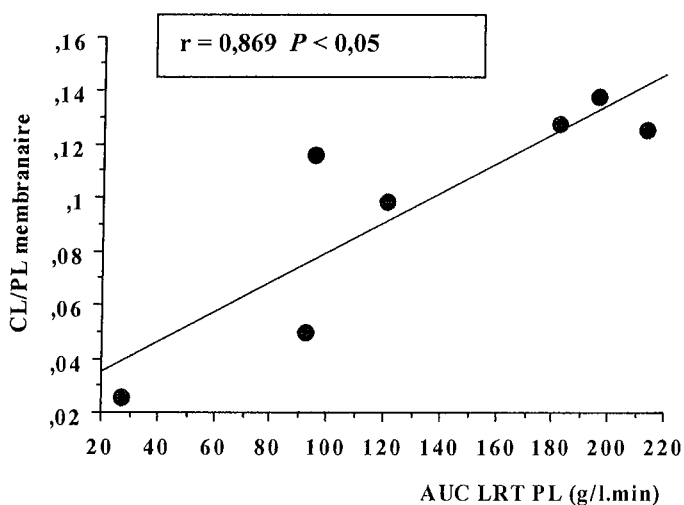


Figure 32: Régression linéaire du rapport cholestérol/ PL tot en fonction de l'AUC LRT TG (g/l.min).

D.7- COMPOSITION EN PC ET EN SM DES HDL A JEUN ET EN POST PRANDIALE ET PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES.

Aucune corrélation significative n'a été trouvée avec les phospholipides membranaires de l'hématie.

Par contre, le contenu en PC et SM des HDL, ainsi que l'AUC HDL PC, sont corrélés positivement à la PC adipocytaire et négativement au rapport CL/PL de l'adipocyte (tableau 43).

Il faut noter que les corrélations avec la PC des HDL sont observées à la fois à jeun et en post prandial alors que les corrélations avec la SM des HDL sont notées uniquement à jeun.

Tableau 43: Coefficients de corrélation entre la PC de la membrane adipocytaire et les variations de composition en PC et en SM des HDL.

		PC ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines)	
HDL PC	T0	0,857	P < 0,05
	T4	0,835	P < 0,05
	T10	0,831	P < 0,05
AUC HDL PC		0,853	P < 0,05
HDL SM	T0	0,955	P < 0,005

La figure 33 illustre la relation entre l'AUC HDL PC et la PC de la membrane adipocytaire.

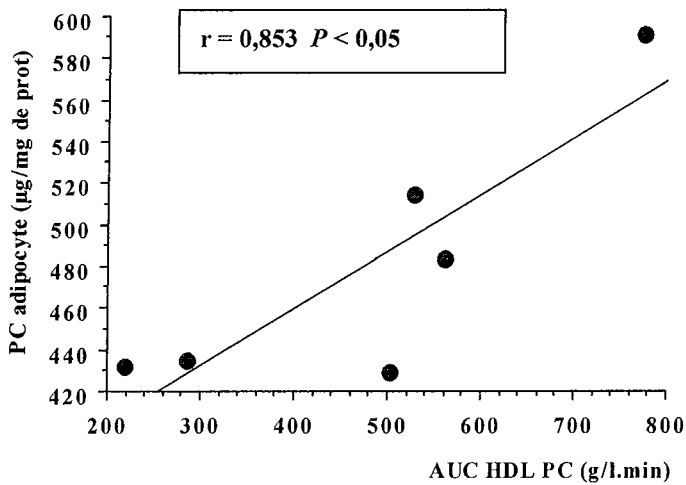


Figure 33: Régression linéaire de la PC de la membrane adipocytaire ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines) en fonction de l'AUC HDL PC ($\text{g}/\text{l}\cdot\text{min}$).

D.8- ANALYSE GLOBALE DES RELATIONS ENTRE LES PARAMETRES DE LA LIPEMIE POSTPRANDIALE ET LES PARAMETRES MEMBRANAIRES

En dépit de la complexité des résultats, le schéma de la figure 34 qui rassemble les relations entre les différents paramètres, permet plusieurs observations.

Chaque phospholipide semble en relation avec un type de lipoprotéine.

- La PC est corrélée avec la composition en TG et PL des LRT et la composition en PC et en SM des HDL.
- La SM est corrélée avec la composition en CT et PL des LDL.
- Le rapport SM/PE est corrélé avec la composition en CT et PL des HDL.
- En revanche, l'acide arachidonique C20:4n-6 de la membrane erythrocytaire est corrélé aux CT et PL des LDL et à la PC et SM des HDL.

- L'insulino-sensibilité (M du clamp) est corrélée positivement à l'acide arachidonique C20:4n-6 et à la composition des HDL.

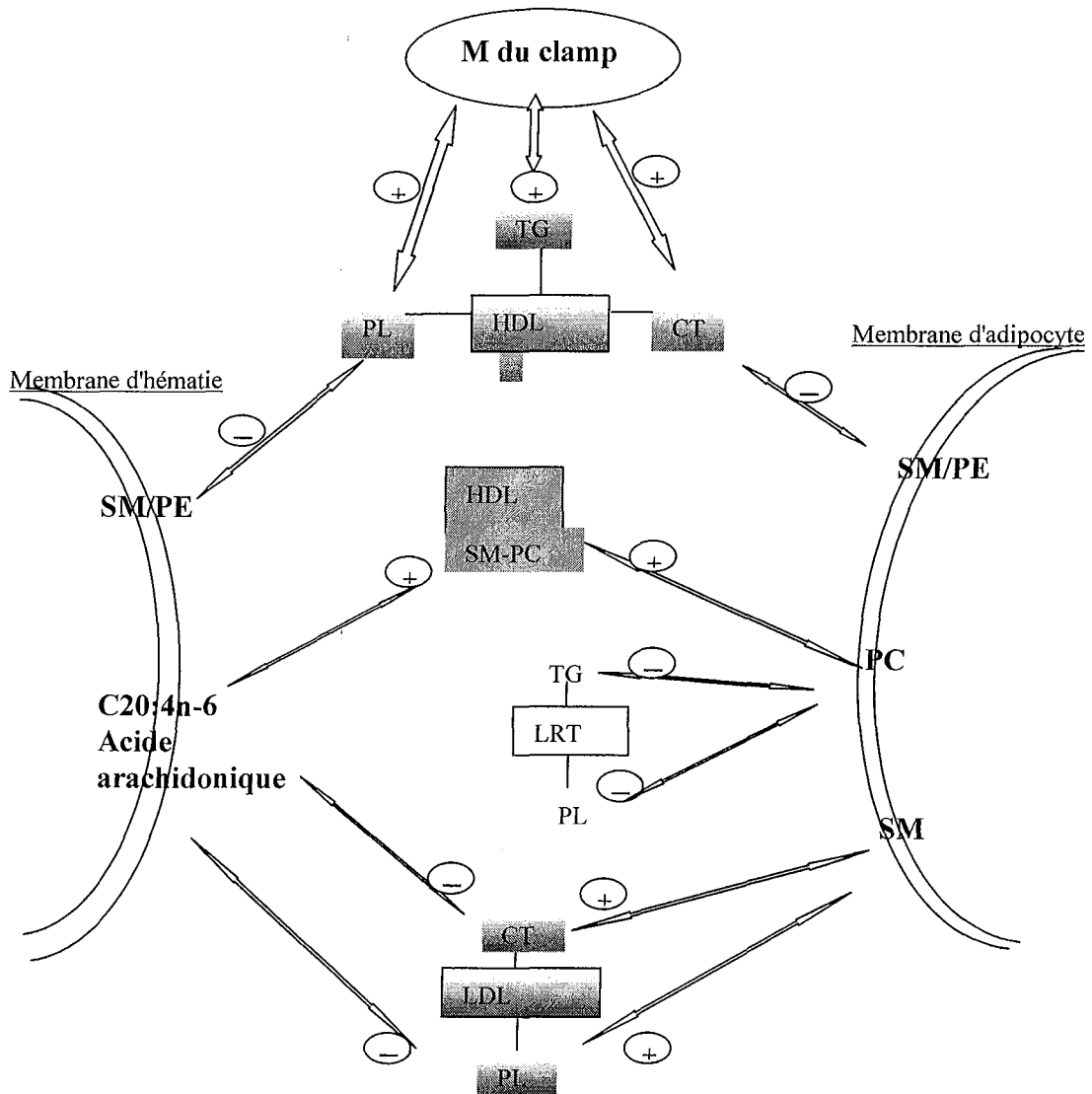


Figure 34: Les relations entre les paramètres de la lipémie postprandiale et membranaire.

III- DISCUSSION

Cette étude est préliminaire. Par conséquent, l'interprétation des résultats qui suit doit être considérée comme provisoire d'autant plus que les éléments d'un groupe témoin qui manquent actuellement semblent indispensables.

Evolution de la composition des lipoprotéines en TG, CT et PL au cours de la lipémie post prandiale.

Globalement, dans le groupe de sujet obèses étudié, les modifications des TG, CT et PL semblent quantitativement moins importantes que dans la littérature. Des variations plus importantes ont été rapportées dans le cas de sujets sains (Taskinen et Kuusi, 1986, Cohn et al., 1988), de sujets non obèses hypertriglycéridémiques (Hughes et al., 1995) et de sujets obèses (Lewis et al., 1990, Couillard et al., 1998).

Il est possible que ces résultats quantitativement différents soient dus à des charges lipidiques différentes. Il a été rapporté des réponses significativement différentes des lipoprotéines en post prandial après des charges lipidiques de composition différentes (Taskinen et Kuusi, 1986; Dubois et al., 1994; Dubois et al., 1998).

Relations entre la composition des lipoprotéines et l'insulino-résistance, les paramètres membranaires de l'hématie et de l'adipocyte.

- **Relation avec l'insulino-résistance**

Le clamp euglycémique hyperinsulinémique constitue la méthode de référence pour évaluer la sensibilité à l'insuline. Dans un large effectif, l'index du clamp est en général corrélé avec les autres index en particulier le HOMA, bien que ces index n'explorent pas les mêmes domaines de sensibilité à l'insuline, le HOMA étant un reflet de l'insulino-résistance hépatique et le clamp reflétant l'effet périphérique, principalement musculaire, de l'insuline.

L'effectif très réduit de cette étude explique vraisemblablement l'absence de corrélation entre le clamp d'une part et l'insulinémie à jeun ou le HOMA d'autre part. Toutefois, il est

surprenant que l'index du clamp soit corrélés uniquement avec les paramètres lipidiques plasmatiques alors que l'insulinémie à jeun et le HOMA sont corrélés uniquement avec les paramètres membranaires. Il est indispensable d'analyser un échantillon plus important pour confirmer ou non ces différences.

L'observation marquante est la corrélation positive entre le M du clamp et la concentration de PL dans les HDL. Les sujets les plus insulino-résistants (valeur de M glucose faible) ont des taux abaissés de HDL PL par rapport aux sujets insulino-sensibles à la fois à jeun et en post prandial. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une relation est trouvée entre un marqueur de l'insulino-résistance et les HDL PL. Cette relation semble plus forte que celle observée avec le HDL cholestérol. Par conséquent, on peut faire l'hypothèse que la concentration en PL des HDL pourrait être un marqueur plus sensible de l'insulino-résistance chez la femme obèse androïde que les paramètres classiques du syndrome métabolique ou syndrome X. Les mécanismes à l'origine de cette diminution des PL des HDL avec l'insulino-résistance nécessite des investigations complémentaires. Des modifications de l'activité de la protéine de transfert des phospholipides (PLTP), facteur majeur du transfert des phospholipides des VLDL vers les HDL pourraient être évoquées. Le transfert de PC éther des VLDL vers les HDL est complètement aboli chez des souris homozygotes PLTP -/- qui présentent une diminution marquée des HDL PL (Jiang et al., 1999). Toutefois, l'activité de la PLTP est augmentée chez les sujets obèses (Kaser et al., 2001) et corrélée à l'insulino-résistance (Riemens, 1998).

Cette importance des phospholipides semble confirmée par l'existence d'une corrélation négative entre les LDL PL et le M du clamp au temps T10 alors que le LDL CT n'est pas corrélé au marqueur de l'insulino-résistance ni à jeun ni en post-prandial.

- **Relations avec les phospholipides de l'hématie**

Au niveau de l'hématie, seul **le rapport SM/PE** est corrélé négativement aux HDL PL à jeun et en période post prandiale. Plus la composition en PL des HDL est faible, plus le rapport SM/PE de la membrane érythrocytaire est élevé. Le rapport SM/PE semble présenter une importance particulière. Dans l'étude précédente (Orlistat), la variance du HOMA dans le groupe d'obèses était expliquée positivement par le rapport SM/PE de la membrane

érythrocytaire. Par conséquent, une concentration en HDL-PL faible et un rapport SM/PE élevé dans l'hématie semblent être associés et reliés tous deux à l'insulino-résistance.

Si la composition membranaire en SM et PE est le reflet de celle des HDL, elle n'est pas connue pour l'instant. Chez des diabétique non insulino-dépendants, il existe une augmentation de la SM dans les HDL2 (Bagdade et al., 1990). Par ailleurs, dans le cas de concentrations en cholestérol HDL > 1,75 mM, les HDL sont enrichies en PE et appauvries en SM (Fournier et al., 1997). Ces deux observations sont en faveur de relations étroites entre la SM et la PE au niveau des HDL et de la membrane érythrocytaire et qui pourraient jouer un rôle dans les efflux de cholestérol. En effet, l'efflux de cholestérol qui a un rôle de protection vis à vis du risque cardiovasculaire est lié au taux de HDL PL et en relation avec les sous classes de phospholipides dans les HDL (Fournier, 1997), particulièrement avec le HDL PC, HDL SM et le rapport HDL PE/SM.

- **Relations avec les phospholipides de la membrane adipocytaire**

Dans l'adipocyte, le rapport SM/PE est corrélé négativement au HDL CT en période post prandiale, argument supplémentaire en faveur de l'importance du rapport SM/PE dans la composition en phospholipides des membranes cellulaires et les relations avec l'insulino-résistance puisque le cholestérol HDL est diminué chez les sujets insulino-résistants.

La SM de la membrane adipocytaire est corrélée positivement aux TG et CT plasmatiques et aux CT et PL des LDL à jeun et en période post prandiale.

Dans cette étude très préliminaire comme dans d'autres données antérieures (Zeghari et al., 2000 (a)), deux marqueurs de l'insulino-résistance : l'insulinémie et le HOMA sont associés positivement à la SM membranaire au niveau de l'adipocyte. L'hypertriglycémie étant associée avec l'insulino-résistance dans le syndrome X, la corrélation avec les TG plasmatiques était attendue. Il en est vraisemblablement de même pour la corrélation positive entre la SM et le LDL CT qui est la conséquence des relations positives entre la SM d'une part et le LDL CT avec les marqueurs de l'insulino-résistance.

Parmi les PL des LDL, la proportion de SM (environ 25 % des phospholipides chez les diabétiques de type II) est plus importante que dans les VLDL et HDL (Bagdade et al., 1990). La corrélation positive de la SM membranaire avec les LDL PL peut être le reflet des interactions de l'adipocyte avec les LDL. En effet, il existe un récepteur spécifique des LDL, le récepteur à Apo BE présent dans l'adipocyte (Fong et al., 1984; Fong et al., 1985), le ligand principal étant l'Apo B. Les LDL pénètrent dans la cellule par un mécanisme d'endocytose du complexe ligand-récepteur, ce phénomène constituant un moyen d'enrichir la cellule en SM. Par ailleurs, les phospholipides des lipoprotéines peuvent être transférés aux cellules par une voie indépendante de l'endocytose liée à un récepteur du type SR-BI (scavenger récepteur murin). En utilisant des LDL comme donneurs de phospholipides et des cellules exprimant le SR-BI, il a été montré que le transfert de la SM dans les cellules était plus important que celui des autres phospholipides (Urban et al., 2000). L'expression de ce gène est induite lors de la différenciation des adipocytes 3T3-L1 (Acton et al., 1994). L'équivalent chez l'homme de SR-BI est le gène CLA-1 et une glycoprotéine, CD36, structurellement liée à SR-BI et CLA-1 est exprimée dans le tissu adipeux et constitue un récepteur de haute affinité pour les lipoprotéines (Calvo et al., 1998). Par conséquent, on peut penser qu'un mécanisme de transfert des phospholipides du type SR-BI existe dans l'adipocyte humain et qu'il pourrait jouer un rôle dans les échanges en particulier de SM entre les LDL et les adipocytes.

La PC de la membrane adipocytaire est corrélée négativement aux TG et PL des LRT à jeun et en post prandial, aux TG des LDL en post prandial, suggérant que les échanges de PC entre les lipoprotéines et les adipocytes peuvent également jouer un rôle important dans l'insulino-résistance.

La corrélation négative entre la PC adipocytaire et les LRT-PL en particulier est difficile à interpréter. Le métabolisme des HDL et le remodelage est gouverné à la fois par la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP) et la protéine de transfert des phospholipides (PLTP), le transfert des phospholipides des TRL vers les HDL étant facilité spécifiquement la PLTP. Mais d'autres facteurs, en particulier « l'ATP binding cassette transporter » ABCA-1 qui est exprimée dans les lignées murines d'adipocytes (Le Lay et al., 2001, Al-Makdissy et al., soumis) et le tissu adipeux humain (Kielar et al., 2001) peut jouer un rôle sur le métabolisme des HDL. Les échanges de phospholipides entre lipoprotéines et cellules peuvent se faire selon le schéma suivant. Au cours d'une première étape, l'activité de l'ABCA-1 entraîne un

efflux cellulaire de PC et de cholestérol libre qui se combinent avec l'apoA-1 pour générer des HDL naissantes (Gillotte-Taylor et al., 2002). Dans l'étape 2, les HDL naissantes acquièrent des PL et du Cholestérol libre additionnels par transfert des TRL qui transforme les HDL3 en petites et grandes particules HDL (Jiang et al., 1999; Lagrost et al., 1997). L'expression de ABCA-1 est régulée positivement par les agonistes du PPAR γ (Chinetti et al., 2001) et l'expression de PPAR γ est diminuée chez les obèses insulino-résistants (Zeghari et al., 2000 (b)). Par conséquent, on peut avancer l'hypothèse que l'efflux de PC de l'adipocyte via ABCA-1 est diminué chez les obèses, pouvant expliquer la corrélation négative entre PC et TRL PL.

En revanche, la corrélation positive de la PC adipocytaire avec la PC des HDL, peut traduire l'interaction des HDL avec l'adipocyte, les échanges pouvant se faire *via* l'incorporation des HDL ou l'interaction probable avec CLA-1, l'équivalent humain de SR-BI. La PC apparaît comme un phospholipide qui pourrait jouer un rôle important dans l'insulino-résistance. Il a été rapporté que des sujets avec des concentrations élevées de cholestérol HDL présentent également dans les HDL des concentrations plus élevées de PC et plus faibles de lyso PC que les sujets avec un cholestérol HDL bas alors que les concentrations de SM et PE sont inchangées (Ozerova et al., 2001).

- **Relation avec les acides gras de l'hématie**

La proportion d'acide arachidonique de la membrane érythrocytaire est corrélée négativement aux CT et PL des LDL (à jeun et en post prandial au temps T10) et positivement au HDL-PC à jeun et en post prandial au temps T4. Nous avons établi précédemment (chapitre 4) qu'il existait une corrélation négative entre les marqueurs de l'insulino-résistance et l'acide arachidonique. Par conséquent, la corrélation négative avec les CT et PL des LDL peut être simplement expliqué comme étant le reflet de l'augmentation du LDL cholestérol au cours de l'insulino-résistance. Cependant, les variations de l'acide arachidonique C20:4n-6 peuvent dépendre de celles du rapport SM/PE. En effet, l'acide arachidonique est un acide gras constituant de la PC (5 à 7 %) mais surtout de la PE (24 à 25,5 %), (Rogiers et al., 1980; Dougherty et al., 1987). Le rapport SM/PE érythrocytaire étant augmenté dans l'insulino-résistance, il est logique que le taux d'acide arachidonique soit diminué.

Ainsi, aux éléments qui sont fortement associés à l'insulino-résistance : SM, SM/PE, HDL PL (et probablement LDL PL), vient s'ajouter un élément supplémentaire: l'acide arachidonique C20:4n-6.

IV- CONCLUSIONS

Au cours de cette étude préliminaire, nous avons pu mettre en évidence des relations entre les marqueurs de l'insulino-résistance, les paramètres membranaires (phospholipides et acides gras de l'hématie et phospholipides de l'adipocyte), et la composition des lipoprotéines à jeun et en post prandial.

La petite taille de l'échantillon doit rendre prudente l'analyse statistique. Il est probable que d'autres relations pourront être mises en évidence avec un nombre plus important de sujet, et en incluant un groupe témoin.

Un des objectifs de l'étude était de comparer le niveau des relations entre la composition des lipoprotéines à jeun et en post prandial et les marqueurs de l'insulino-résistance ou les paramètres membranaires. Il semble que le nombre de relations significatives soient plus élevé en post prandial ce qui souligne tout l'intérêt de futures études en post prandial.

Cette étude préliminaire montre:

- l'importance des HDL PL

Les HDL PL sont significativement liées à un marqueur d'insulino-résistance (M du clamp), en relation avec les paramètres membranaires de l'hématie (rapport SM/PE et acide arachidonique), et de l'adipocyte (la PC).

- l'importance également des LDL PL, qui sont en relation avec les paramètres membranaires de l'hématie (acide arachidonique), et de l'adipocyte, particulièrement avec la SM. Deux autres phospholipides adipocytaires (PE, PC) pourraient être impliqués dans les variations de composition des HDL PL, à la suite d'échanges entre les HDL et l'adipocyte.

Ces données originales devront être confirmées sur un échantillon plus important de sujets, obèses ou non en association avec l'étude de l'expression de gènes dans le tissu adipeux comme SR-BI et ABCA1.

Conclusion générale et perspectives

Notre étude apporte des arguments supplémentaires à l'hypothèse membranaire de l'insulino-résistance. Jusqu'à présent, les informations disponibles étaient centrées essentiellement sur les acides gras. Nous apportons la preuve que des anomalies dans la répartition des classes de phospholipides sont indiscutablement associées à l'insulino-résistance. La concentration de SM membranaire est un des prédictors indépendants les plus significatifs de la variance des marqueurs de l'insulino-résistance. La relation positive entre la concentration membranaire en SM et l'insulino-résistance est observée à la fois chez des sujets non obèses et des sujets obèses adultes et des enfants obèses.

Chez les obèses, deux autres phospholipides, la PI et la PE semblent également associés à l'insulino-résistance. Il sera nécessaire de préciser leur importance dans des études ultérieures.

Chez les enfants obèses qui sont très insulino-résistants, l'excès de SM membranaire n'est pas associée avec les altérations lipidiques plasmatiques observées chez les adultes et habituellement trouvées dans l'insulino-résistance : hypertriglycéridémie et diminution du cholestérol HDL. L'augmentation de la SM semble donc une anomalie précoce chez les enfants obèses. Toutefois, l'échantillon est petit et il est indispensable de vérifier cette observation sur un échantillon plus important. Une étude de la composition en acides gras est également nécessaire afin de vérifier chez les enfants obèses l'existence éventuelle d'anomalies au niveau de l'acide arachidonique.

Les résultats des deux études d'intervention chez les sujets obèses ouvrent des perspectives de recherche passionnantes. Une perte de poids qui induit habituellement une amélioration de l'insulino-sensibilité a été initiée avec un régime hypocalorique ou un traitement pharmacologique (Orlistat). Dans les deux études, en dépit d'une perte de poids pratiquement similaire, deux groupes de sujets apparaissent. L'insulino-sensibilité est améliorée et la concentration en SM tend à se normaliser chez les sujets qui à l'état basal étaient les plus insulino-résistants. Au contraire, chez les sujets dont l'insulino-résistance est modérée, les marqueurs de l'insulino-résistance et les paramètres membranaires en particulier la concentration en SM ne varient pas. Il sera indispensable d'élucider les mécanismes de cette réponse différentielle à la perte de poids en termes d'insulino-sensibilité et d'excès de SM chez les sujets obèses.

La SM représente un phospholipide de première importance dans la signalisation cellulaire en raison d'un cycle de la SM *via* l'action d'une sphingomyélinase et la production de métabolites : céramide et sphingosine qui sont des seconds messagers. De plus la SM a une forte affinité pour le cholestérol. Les deux lipides sont co-localisés dans des microdomaines spécialisés de la membrane cellulaire : les rafts et cavéoles. Les cavéoles contiennent les cavéolines, protéines qui ont un rôle dans le transport du cholestérol et de nombreuses protéines concernées par la transduction du signal, en particulier le récepteur de l'insuline.

Par conséquent, les études sur la membrane d'hématie doivent être complétées par des études sur des cellules sensibles à l'insuline. L'adipocyte est la cible cellulaire que nous privilégions. A l'heure actuelle, le tissu adipeux est considéré par beaucoup de chercheurs comme étant l'organe où l'insulino-résistance apparaît en premier, les altérations de l'insulino-sensibilité dans le foie et le muscle étant secondaires. Par ailleurs, les études antérieures de notre laboratoire ont montré que les anomalies en SM étaient retrouvées dans le tissu adipeux de sujets obèses. Enfin, des études *in vitro* menées par d'autres membres de l'équipe sur des modèles cellulaires d'adipocytes murins ont montré qu'un excès de SM régulaient des gènes impliqués dans le métabolisme glucidique et lipidique. Les études ultérieures sur le tissu adipeux passe en premier lieu par une recherche de nature méthodologique afin de pouvoir déterminer la composition en phospholipides de la membrane adipocytaire à partir de prélèvements réduits de tissu adipeux (de l'ordre du gramme). Si cet obstacle méthodologique est résolu, il sera alors possible de vérifier chez l'homme si l'excès de SM membranaire associé à l'insulino-résistance est également associé à des modifications de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. En particulier, il sera indispensable d'étudier l'expression de gènes régulant les influx et efflux de cholestérol et phospholipides comme le gène de l'ATP « *binding cassette* » ABCA1 et le récepteur « *scavenger* » SR-BI qui sont tous deux exprimés dans l'adipocyte. Ceci permettra d'aborder l'étude des mécanismes conduisant à l'excès de sphingomyéline membranaire en particulier l'hypothèse des altérations des échanges lipoprotéines-cellules.

Références bibliographiques

Acton S.L., Scherer P.E., Lodish H.F., Krieger M.

Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor.
J Biol Chem, 1994, 269, 21003-9.

Adams M., Montague C.T., Prins J.B., Holder J.C., Smith S.A., Sanders L., Digby J.E., Sewter C.P., Lazar M.A., Chatterjee V.K., O'Rahilly S.

Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation.
J Clin Invest, 1997, 100, 3149-53.

Alessi M.C., Peiretti F., Morange P., Henry M., Nalbone G., Juhan-Vague I.

Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease.
Diabetes, 1997, 46, 860-7.

Al-Makdissy N., Bianchi A., Younsi M., Picard E., Valet P., Martinet N., Dauca M., Donner M.

Down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression by sphingomyelins.
FEBS Lett, 2001, 493, 75-9.

Aggarwal B.B. and Natarajan K.

Tumor necrosis factors: developments during the last decade.
Eur Cytokine Netw, 1996, 7, 93-124.

Agostoni C., Riva E., Bellu R., Vincenzo S.S., Grazia B.M., Giovannini M.

Relationships between the fatty acid status and insulinemic indexes in obese children.
Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1994, 51, 317-21.

Amri E.Z., Ailhaud G., Grimaldi P.A.

Fatty acids as signal transducing molecules: involvement in the differentiation of preadipose to adipose cells.
J Lipid Res, 1994, 35, 930-7.

Amri E.Z., Bonino F., Ailhaud G., Abumrad N.A., Grimaldi P.A.

Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors.
J Biol Chem, 1995, 270, 2367-71.

Arner P.

Impact of exercise on adipose tissue metabolism in humans.
Int J Obes Relat Metab Disord, 1995, Suppl 4, S18-21.

Attie A.D., Kastelein J.P., Hayden M.R.

Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis.
J Lipid Res, 2001, 42, 1717-26.

Audikovszky M., Pados G., Seres I., Harangi M., Fulop P., Katona E., Winkler G., Paragh G.

Changes in lipid profile and paraoxonase activity in obese patients as a result of orlistat treatment.

Orv Hetil, 2001, 142, 2779-83.

Austin M.A., Hokanson J.E., Brunzell J.D.

Characterization of low-density lipoprotein subclasses: methodologic approaches and clinical relevance.

Curr Opin Lipidol, 1994, 5, 395-403.

Babitt J., Trigatti B., Rigotti A., Smart E.J., Anderson R.G., Xu S., Krieger M.

Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae.

J Biol Chem, 1997, 272, 13242-9.

Bagdade J.D., Buchanan W.E., Kuusi T., Taskinen M.R.

Persistent abnormalities in lipoprotein composition in noninsulin-dependent diabetes after intensive insulin therapy.

Arteriosclerosis, 1990, 10, 232-9.

Bagdade J.D., Buchanan W.F., Pollare T., Lithell H.

Abnormal lipoprotein phospholipid composition in patients with essential hypertension.

Atherosclerosis, 1995, 117, 209-15.

Baile C.A., Della-Fera M.A., Martin R.J.

Regulation of metabolism and body fat mass by leptin.

Annu Rev Nutr. 2000;20:105-27.

Ballas S.K. and Burka E.R.

Pathways of de novo phospholipid synthesis in reticulocytes.

Biochim Biophys Acta, 1974, 337, 239-47.

Ballinger A. and Peikin S.R.

Orlistat: its current status as an anti-obesity drug.

Eur J Pharmacol, 2002, 440, 109-17.

Bar R.S, Dolash S., Spector A.A., Kaduce T.L., Figard P.H.

Effects of membrane lipid unsaturation on the interactions of insulin and multiplication stimulating activity with endothelial cells.

Biochim Biophys Acta, 1984 Aug 17, 804(4), 466-73.

Barenholdz Y.

Sphingomyelin-lecithin balance in membrane: composition, structure, and fonction relationships.

In: *Physiology of membrane fluidity*, volume I, Shinitzky M, ed, Boca Raton: CRC Press, 1984, 131-173.

Baron V. and Van Obberghen E.

Signalisation par le récepteur de l'insuline.
Flammarion m/s, Journées de Diabétologie, 1995.

Bastard J.P., Caron M., Vidal H., et al.

Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipotrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance.
Lancet, 2002, 359, 1026-31.

Baulande S., Lasnier F., Lucas M., Pairault J.

Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage.
J Biol Chem, 2001, 276, 33336-44.

Baur L.A., O'Connor J., Pan D.A., Kriketos A.D., Storlien L.H.

The fatty acid composition of skeletal muscle membrane phospholipid: its relationship with the type of feeding and plasma glucose levels in young children.
Metabolism, 1998, 47, 106-12.

Baur L.A., O'Connor J., Pan D.A., Wu B.J., O'Connor M.J., Storlien L.H.

Relationships between the fatty acid composition of muscle and erythrocyte membrane phospholipid in young children and the effect of type of infant feeding.
Lipids, 2002, 35, 77-82.

Benoist F., Lau P., McDonnell M., Doelle H., Milne R., McPherson R

Cholesteryl ester transfer protein mediates selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by human adipose tissue.
J Biol Chem, 1997, 272, 23572-7.

Berdeaux O., Blond J.P., Bretillon L., Chardigny J.M., Mairot T., Vatele J.M., Poullain D., Sebedio J.L.

In vitro desaturation or elongation of monotrans isomers of linoleic acid by rat liver microsomes.
Mol Cell Biochem, 1998, 185, 17-25.

Berg A.H., Combs T.P., Du X., Brownlee M., Scherer P.E.

The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action.
Nat Med, 2001, 7, 947-53.

Bergman R.N., Steil G.M., Bradley D.C., Watanabe R.M.

Modeling of insulin action in vivo.
Annu Rev Physiol, 1992, 54, 861-83.

Bergman R.N.

Non-esterified fatty acids and the liver: why is insulin secreted into the portal vein?
Diabetologia, 2000, 43, 946-52.

Bergman R.N., Van Citters G.W., Mittelman S.D., Dea M.K., Hamilton-Wessler M., Kim S.P., Ellmerer M.

Central role of the adipocyte in the metabolic syndrome.
J Investig Med, 2001, 49, 119-26.

Berlin E., Bhathena S.J., Judd J.T., Nair P.P., Jones D.Y., Taylor P.R.

Dietary fat and hormonal effects on erythrocytes membrane fluidity and lipid composition in adult women.
Metabolism, 1989, 38 n°8, 790-796.

Bertin E., Arner P., Bolinder J., Hagstrom-Toft E.

Action of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide on lipolysis in human subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle in vivo.
J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86, 1229-34.

Betteridge D.J.

Lipids and atherogenesis in diabetes mellitus.
Atherosclerosis, 1996 Jul, 124 Suppl, S43-7.

Birch L.L.

Development of food acceptance patterns in the first years of life.
Proc Nutr Soc, 1998, 57, 617-24.

Birgel M., Gottschling-Zeller H., Rohrig K., Hauner H.

Role of cytokines in the regulation of plasminogen activator inhibitor- 1 expression and secretion in newly differentiated subcutaneous human adipocytes.
Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20, 1682-7.

Bittman R., Kasireddy C.R., Mattjus P., Slotte J.P.

Interaction of cholesterol with sphingomyelin in monolayers and vesicles.
Biochemistry, 1994, 33, 11776-81.

Bjornholm M., Kawano Y., Lehtihet M., Zierath J.R.

Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3- kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation.
Diabetes, 1997, 46, 524-7.

Bjorntorp P.

Obesity at the cellular level.
Nord Med, 1991, 106, 191-4.

Bladergroen B.A., Beynen A.C., Geelen M.J.

Dietary pectin lowers sphingomyelin concentration in VLDL and raises hepatic sphingomyelinase activity in rats.
J Nutr, 1999, 129, 628-33.

Boden G.

Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM.
Diabetes, 1997, 46, 3-10.

Boden G.

Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus.
Proc Assoc Am Physicians, 1999, 111, 241-8.

Boldori L. and Marelli A.

Monitoring the trend of overweight children in Cremona (anni 1990-1998).
Minerva Pediatr, 2000, 52, 21-7.

Bollag G.E., Roth R.A., Beaudoin J., Mochly-Rosen D., Koshland D.E. Jr.

Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity.
Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1986, 83, 5822-4.

Bonen A., Luiken J.J., Liu S., Dyck D.J., Kiens B., Kristiansen S., Turcotte L.P., Van Der Vusse G.J., Glatz J.F.

Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles.
Am J Physiol, 1998, 275, E471-8.

Bonen A.

Chronic leptin administration decreases fatty acid uptake and fatty acid transporters in rat skeletal muscle.
J Biol Chem, 2002, 277, 8854-60.

Bonnefont-Rousselot D., Lepage S., Therond P., Bastard J.P., Hainque B., Turpin G., Legrand A., Delattre J., Bruckert E.

Modifications of alpha-tocopherol and fatty acid concentrations in blood and adipose tissue of obese patients during a weight loss programme.
Nutr Metab Cardiovasc Dis, 1999, 9, 25-32

Borkman M., Storlien L.H., Pan D.A., Jenkins A.B., Chisholm D.J., Campbell L.V.

The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids.
N Engl J Med, 1993, 328, 238-44.

Bouchard C. and Perusse L.

Genetic aspects of obesity.
Ann N Y Acad Sci, 1993, 699, 26-35.

Bouchard C. and Perusse L.

Current status of the human obesity gene map.
Obes Res, 1996, 4, 81-90.

Braiman L., Alt A., Kuroki T., Ohba M., Bak A., Tennenbaum T., Sampson S.R.

Activation of protein kinase C zeta induces serine phosphorylation of VAMP2 in the GLUT4 compartment and increases glucose transport in skeletal muscle.
Mol Cell Biol, 2001, 21, 7852-61.

Breckenridge W.C. and Palmer F.B.

Fatty acid composition of human plasma lipoprotein phosphatidylinositols.
Biochim Biophys Acta, 1982, 712, 707-11.

Brindley D.N., Wang C.N., Mei J., Xu J., Hanna A.N.

Tumor necrosis factor-alpha and ceramides in insulin resistance.
Lipids. 1999, 34 Suppl, S85-8.

Brown M.S., Goldstein J.L.

Lowering plasma cholesterol by raising LDL receptors.
N Engl J Med, 1981 Aug, 27, 305(9), 515-7.

Brown M.S., Goldstein J.L.

Lipoprotein receptors: therapeutic implications.
J Hypertens Suppl, 1990 Mar, 8(1),S33-5, discussion S35-6.

Brown D.A.

Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat.
Curr Biol, 2001, 11, R446-9.

Bruckert E., Dejager S., Chapman M.J.

Ciprofibrate therapy normalises the atherogenic low-density lipoprotein subspecies profile in combined hyperlipidemia.
Atherosclerosis, 1993 Apr, 100(1), 91-102.

Bruneau C, Hubert P, Waksman A, Beck JP, Staedel-Flaig C.

Modifications of cellular lipids induce insulin resistance in cultured hepatoma cells.
Biochim Biophys Acta, 1987 May, 18, 928(3), 297-304.

Buemann B., Vohl M.C., Chagnon M., Chagnon Y.C., Gagnon J., Perusse L., Dionne F., Despres J.P., Tremblay A., Nadeau A., Bouchard C.

Abdominal visceral fat is associated with a BclI restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus.
Obes Res, 1997, 5, 186-92.

Bujalska I.J., Kumar S., Stewart P.M.

Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"?
Lancet, 1997, 349(9060), 1210-3.

Burrows R., Gattas V., Leiva L., Barrera G., Burgueno M.

Biological, familial and metabolic characteristics of infantile and juvenile obesity.
Rev Med Chil, 2001,129, 1155-62, .

Butikofer P., Lin Z.W., Chiu D.T., Lubin B., Kuypers F.A.

Transbilayer distribution and mobility of phosphatidylinositol in human red blood cells.
J Biol Chem. 1990 Sep 25;265(27):16035-8.

Calvo D., Gomez-Coronado D., Suarez Y., Lasuncion M.A., Vega M.A.

Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. J Lipid Res, 1998, 39, 777-88.

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, .

Carek P.J. and Dickerson L.M.

Current concepts in the pharmacological management of obesity.

Drugs, 1999, 57, 883-904.

Carey D.G.

Abdominal obesity.

Curr Opin Lipidol, 1998, 9, 35-40.

Carlsson B., Lindell K., Gabrielsson B., Karlsson C., Bjarnason R., Westphal O., Karlsson U., Sjostrom L., Carlsson L.M.

Obese (ob) gene defects are rare in human obesity.

Obes Res, 1997, 5, 30-5.

Castro Cabezas M., Halkes C.J., Erkelens D.W.

Obesity and free fatty acids: double trouble.

Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2001, 11, 134-42.

Ceddia R.B., Koistinen H.A., Zierath J.R., Sweeney G.

Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance.

FASEB J, 2002 Aug, 16(10), 1163-76.

Chang P.Y., Benecke H., Le Marchand-Brustel Y., Lawitts J., Moller D.E.

Expression of a dominant-negative mutant human insulin receptor in the muscle of transgenic mice.

J Biol Chem, 1994, 269, 16034-40.

Chapelot D., Fumeron F., Fricker J.

Dietary fat, energy density and BMI: a case of a missing flower?

Int J Obes Relat Metab Disord, 1998, 22, 1032-4.

Chardin P.

Domaines SH2 et SH3: un nouveau paradigme pour la transmission du signal.

Flammarion m/s, 1994, 10, 709-712.

Chawla A., Boisvert W.A., Lee C.H., et al.

A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis.

Mol Cell. 2001, 7, 161-71.

Chen M., Xiao C.Y., Hashizume H., Abiko Y.

Phospholipase A2 is not responsible for lysophosphatidylcholine-induced damage in cardiomyocytes.

Am J Physiol, 1998, 275, H1782-7.

Chinetti G., Gbaguidi F.G., Griglio S., Mallat Z., Antonucci M., Poulain P., Chapman J., Fruchart J.C., Tedgui A., Najib-Fruchart J., Staels B.

CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors.

Circulation, 2000, 101, 2411-7.

Chinetti G., Lestavel S., Bocher V., Remaley A.T., Neve B., Torra I.P., Teissier E., Minnich A., Jaye M., Duverger N., Brewer H.B., Fruchart J.C., Clavey V., Staels B.

PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway.

Nat Med, 2001, 7, 53-8.

Chou C.K., Dull T.J., Russell D.S., Gherzi R., Lebwohl D., Ullrich A., Rosen O.M.

Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin.

J Biol Chem, 1987, 262, 1842-7.

Christophe A. and Vermeulen A.

Effects of weight loss on the fatty acid composition of serum lipids in obese women.

Ann Nutr Metab, 1992, 36, 336-42.

Clifton P.M. and Nestel P.J.

Relationship between plasma insulin and erythrocyte fatty acid composition.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1998, 59, 191-4.

Clore J.N., Li J., Gill R., Gupta S., Spencer R., Azzam A., Zuelzer W., Rizzo W.B., Blackard W.G.

Skeletal muscle phosphatidylcholine fatty acids and insulin sensitivity in normal humans.

Am J Physiol, 1998, 275, E665-70.

Clore J.N., Harris P.A., Li J., Azzam A., Gill R., Zuelzer W., Rizzo W.B., Blackard W.G.

Changes in phosphatidylcholine fatty acid composition are associated with altered skeletal muscle insulin responsiveness in normal man.

Metabolism, 2000, 49, 232-8.

Cohen P., Alessi D.R., Cross D.A.

PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction?

FEBS Lett, 1997, 410, 3-10.

Cohn J.S., McNamara J.R., Cohn S.D., Ordovas J.M., Schaefer E.J.

Postprandial plasma lipoprotein changes in human subjects of different ages.

J Lipid Res, 1988, 29, 469-79.

Collins S. and Surwit R.S.

The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis.

Recent Prog Horm Res, 2001, 56, 309-28.

Collison M., Glazier A.M., Graham D., Morton J.J., Dominiczak M.H., Aitman T.J., Connell J.M., Gould G.W., Dominiczak A.F.

Cd36 and molecular mechanisms of insulin resistance in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat.

Diabetes, 2000, 49, 2222-6.

Combettes-Souverain M. and Issad T.

Molecular basis of insulin action.

Diabetes Metab, 1998, 24, 477-89.

Combs T.P., Berg A.H., Obici S., Scherer P.E., Rossetti L.

Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30.

J Clin Invest, 2001, 108, 1875-81.

Corvilain B.

Lipoprotein metabolism.

Rev Med Brux, 1997, 18, 3-9.

Couillard C., Bergeron N., Prud'homme D., Bergeron J., Tremblay A., Bouchard C., Mauriege P., Despres J.P.

Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men.

Diabetes, 1998, 47, 953-60.

Couillard C., Gagnon J., Bergeron J., Leon A.S., Rao D.C., Skinner J.S., Wilmore J.H., Despres J.P., Bouchard C.

Contribution of body fatness and adipose tissue distribution to the age variation in plasma steroid hormone concentrations in men: the HERITAGE Family Study.

J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85, 1026-31.

Couillard C., Mauriege P., Imbeault P., Prud'homme D., Nadeau A., Tremblay A., Bouchard C., Despres J.P.

Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia.

Int J Obes Relat Metab Disord. 2000 Jun;24(6):782-8.

Cross D.A., Alessi D.R., Cohen P., Andjelkovich M., Hemmings B.A.

Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.

Nature, 1995, 378, 785-9.

Cullis P.R. and De Kruffy B.

³¹P NMR studies of unsonicated aqueous dispersions of neutral and acidic phospholipids. Effects of phase transitions, p2H and divalent cations on the motion in the phosphate region of the polar headgroup.

Biochim Biophys Acta, 1976, 436, 523-40.

Curatola G., Ferretti G., Bertoli E., Dotti M., Bartolotta E., Giorgi P.

Changes of membrane fluidity in erythrocytes of obese children: a spin label study.

Pediatr Res, 1987, 22, 141-4.

Dabelea D. and Pettitt D.J.

Intrauterine diabetic environment confers risks for type 2 diabetes mellitus and obesity in the offspring, in addition to genetic susceptibility.
J Pediatr Endocrinol Metab, 2001, 14, 1085-91.

Danielli J.F., and Davson H.

A contribution to the theory of per-meability of films.
J Cell Com Physiol, 1935, 5, 495-508.

Dawson R.M., Hemington N., Irvine R.F.

The inhibition of diacylglycerol-stimulated intracellular phospholipases by phospholipids with a phosphocholine-containing polar group. A possible physiological role for sphingomyelin.
Biochem J, 1985, 230, 61-8.

Deckelbaum R.J. and Williams C.L.

Childhood obesity: the health issue.
Obes Res 2001, 9 Suppl 4, 239S-243S.

Decsi T., Csabi G., Torok K., Erhardt E., Minda H., Burus I., Molnar S., Molnar D.

Polyunsaturated fatty acids in plasma lipids of obese children with and without metabolic cardiovascular syndrome.
Lipids, 2000, 35, 1179-84.

(a) De Fea K. and Roth R.A.

Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612.
Biochemistry, 1997, 36, 12939-47.

(b) De Fea K. and Roth R.A.

Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase.
J Biol Chem, 1997, 272, 31400-6.

DeFronzo R.A., Tobin J.D., Andres R.

Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance.
Am J Physiol, 1979, 237, E214-23.

DeFronzo R.A.

Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM
Diabetes, 1988, 37, 667-87.

DeFronzo R.A.

Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis.
Neth J Med, 1997, 50, 191-7.

De Man F.H., Cabezas M.C., Van Barlingen H.H., Erkelens D.W., de Bruin T.W.
Triglyceride-rich lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes mellitus: post-prandial metabolism and relation to premature atherosclerosis.
Eur J Clin Invest, 1996, 26, 89-108.

Deng X., Cagen L.M., Wilcox H.G., Park E.A., Raghow R., Elam M.B.
Regulation of the rat SREBP-1c promoter in primary rat hepatocytes.
Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290, 256-62.

Deriaz O., Dionne F., Perusse L., Tremblay A., Vohl MC., Cote G., Bouchard C.
DNA variation in the genes of the Na,K-adenosine triphosphatase and its relation with resting metabolic rate, respiratory quotient, and body fat.
J Clin Invest, 1994, 93, 838-43.

Despres J.P., Fong B.S., Julien P., Jimenez J., Angel A.
Regional variation in HDL metabolism in human fat cells: effect of cell size.
Am J Physiol, 1987, 252, E654-9.

Despres J.P., Ferland M., Moorjani S., Nadeau A., Tremblay A., Lupien P.J., Theriault G., Bouchard C.
Role of hepatic-triglyceride lipase activity in the association between intra-abdominal fat and plasma HDL cholesterol in obese women.
Arteriosclerosis, 1989, 9, 485-92.

Despres J.P.
The insulin resistance-dyslipidemic syndrome of visceral obesity: effect on patients' risk.
Obes Res, 1998, 6 Suppl 1, 8S-17S.

Despres J.P.
Health consequences of visceral obesity.
Ann Med, 2001, 33, 534-41.

Deprez J., Vertommen D., Alessi D.R., Hue L., Rider M.H.
Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades.
J Biol Chem, 1997, 272, 17269-75.

Devynck M.A.
Do cell membrane dynamics participate in insulin resistance?
Lancet. 1995 Feb 11;345(8946):336-7.

Di Marino L., Maffettone A., Cipriano P., Sacco M., Di Palma R., Amato B., Quarto G., Riccardi G., Rivellese A.A.
Is the erythrocyte membrane fatty acid composition a valid index of skeletal muscle membrane fatty acid composition?
Metabolism, 2000, 49, 1164-6.

Di Paolo S., Lattanzi V., Guastamacchia E., Vincenti C., Balice A.M., Montanaro N., Nardelli G.M., Giorgino R

Extreme insulin resistance due to anti-insulin receptor antibodies: a direct demonstration of autoantibody secretion by peripheral lymphocytes.

Diabetes Res Clin Pract, 1990, 9, 65-73.

Dobrzyn A., and Gorski J.

Ceramides and sphingomyelins in skeletal muscles of the rat: content and composition. Effect of prolonged exercise.

Am J Physiol, 2002, 282, E277-85.

Dorrance A.M., Graham D., Webb R.C., Fraser R., Dominiczak A.

Increased membrane sphingomyelin and arachidonic acid in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

Am J Hypertens, 2001, 14, 1149-53.

Dougherty R.M., Galli C., Ferro-Luzzi A., Iacono J.M

Lipid and phospholipid fatty acid composition of plasma., red blood cells, and platelets and how they are affected by dietary lipids: a study of normal subjects from Italy, Finland, and the USA.

Am J Clin Nutr, 1987, 45, 443-55.

Dubern B., Clement K., Pelloux V., Froguel P., Girardet J.P., Guy-Grand B., Tounian P.

Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children.

J Pediatr, 2001, 139, 204-9.

Dubois C., Armand M., Azais-Braesco V., Portugal H., Pauli A.M., Bernard P.M., Latge C., Lafont H., Borel P., Lairon D

Effects of moderate amounts of emulsified dietary fat on postprandial lipemia and lipoproteins in normolipidemic adults.

Am J Clin Nutr, 1994, 60, 374-82.

Dubois C., Beaumier G., Juhel C., Armand M., Portugal H., Pauli A.M., Borel P., Latge C., Lairon D.

Effects of graded amounts (0-50 g) of dietary fat on postprandial lipemia and lipoproteins in normolipidemic adults

Am J Clin Nutr, 1998, 67, 31-8.

Dusserre E., Moulin P., Vidal H.

Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues.

Biochim Biophys Acta, 2000,1500, 88-96.

Dyck D.J., Steinberg G., Bonen A.

Insulin increases FA uptake and esterification but reduces lipid utilization in isolated contracting muscle.

Am J Physiol, 2001, 281, E600-7.

Ebina Y., Ellis L., Jarnagin K., Edery M., Graf L., Clauser E., Ou J.H., Masiarz F., Kan Y.W., Goldfine I.D., et al.

The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone- activated transmembrane signalling.

Cell, 1985, 40, 747-58.

Eiam-Ong S. and Sabatini S.

Food restriction beneficially affects renal transport and cortical membrane lipid content in rats.

J Nutr, 1999, 129, 1682-7.

El Ati J., Beji C., Danguir J.

Increased fat oxidation during Ramadan fasting in healthy women: an adaptative mechanism for body-weight maintenance.

Am J Clin Nutr, 1995, 62, 302-7.

Eldar F.H. and Krebs, E.G.

Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action.

Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1997, 94, 9660-9664.

Ellis L., Morgan D.O., Clauser E., Roth R.A., Rutter W.J.

A membrane-anchored cytoplasmic domain of the human insulin receptor mediates a constitutively elevated insulin-independent uptake of 2- deoxyglucose.

Mol Endocrinol, 1987, 1, 15-24.

Emorine L., Blin N., Strosberg A.D.

The human beta 3-adrenoceptor: the search for a physiological function.

Trends Pharmacol Sci, 1994, 15, 3-7.

Erkelens D.W.

Diabetic dyslipidaemia.

Eur Heart J, 1998, 19 Suppl H, H27-40.

Eriksson P., Van Harmelen V., Hoffstedt J., Lundquist P., Vidal H., Stemme V., Hamsten A., Arner P., Reynisdottir S.

Regional variation in plasminogen activator inhibitor-1 expression in adipose tissue from obese individuals.

Thromb Haemost, 2000, 83, 545-8.

Fajas L., Fruchart J.C., Auwerx J.

PPARgamma3 Mrna a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter.

FEBS Lett, 1998, 438, 55-60.

Fajas L., Schoonjans K., Gelman L., Kim J.B., Najib J., Martin G., Fruchart J.C., Briggs M., Spiegelman B.M., Auwerx J.

Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism.

Mol Cell Biol, 1999, 19, 5495-503.

Falkner B. and Michel S.

Obesity and other risk factors in children.

Ethn Dis, 1999, 9, 284-9.

Fan J.Y., Carpentier J.L., van Obberghen E., Grunfeld C., Gorden P., Orci L.

Morphological changes of the 3T3-L1 fibroblast plasma membrane upon differentiation to the adipocyte form.

J Cell Sci, 1983, 61, 219-30.

Farese R.V Jr., Yost T.J., Eckel R.H.

Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans.

Metabolism, 1991, 40, 214-6.

Ferre P., Foretz M., Azzout-Marniche D., Becard D., Fougelle F.

Sterol-regulatory-element-binding protein 1c mediates insulin action on hepatic gene expression.

Biochem Soc Trans, 2001, 29, 547-52.

Ferretti G., Dotti M., Bartolotta E., Giorgi P.L., Curatola G., Bertoli E.

Changes of erythrocyte membrane fluidity associated with childhood obesity: a molecular study using fluorescence spectroscopy.

Biochem Med Metab Biol, 1988, 40, 101-8.

Ferretti G., Curatola G., Bertoli E., Catassi C., Giorgi P.L.

Erythrocyte membrane fluidity and changes in plasma lipid composition: a possible relationship in childhood obesity.

Biochem Med Metab Biol, 1991, 46, 1-9.

Field C.J., Ryan E.A., Thomson A.B., Clandinin M.T.

Diet fat composition alters membrane phospholipid composition, insulin binding, and glucose metabolism in adipocytes from control and diabetic animals.

J Biol Chem, 1990, 265, 11143-50.

Fielding B.A. and Frayn K.N.

Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids.

Br J Nutr, 1998, 80, 495-502.

Fielding C.J. and Fielding P.E.

Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol.

Adv Drug Deliv Rev, 2001, 49, 251-64.

Finer N.

Low-calorie diets and sustained weight loss.
Obes Res, 2001, 9 Suppl 4, 290S-294S.

Folch J., Lees M., Stanley G.H.

A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues.
J Biol Chem, 1957, 226, 497-509.

Fong B.S., Rodrigues P.O., Angel A.

Characterization of low density lipoprotein binding to human adipocytes and adipocyte membranes.
J Biol Chem, 1984, 259, 10168-74.

Fong B.S., Rodrigues P.O., Salter A.M., Yip B.P., Despres J.P., Angel A., Gregg R.E.

Characterization of high density lipoprotein binding to human adipocyte plasma membranes.
J Clin Invest, 1985, 75, 1804-12.

Forbes S., Bui S., Robinson B.R., Hochgeschwender U., Brennan M.B.

Integrated control of appetite and fat metabolism by the leptin- proopiomelanocortin pathway.
Proc Natl Acad Sci U.S.A., 2001, 98, 4233-7.

Forman B.M., Chen J., Evans R.M.

Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta.
Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1997, 94, 4312-7.

Fournier N., Paul J.L., Atger V., Cogny A., Soni T., de la Llera-Moya M., Rothblat G., Moatti N.

HDL phospholipid content and composition as a major factor determining cholesterol efflux capacity from Fu5AH cells to human serum.
Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17, 2685-91.

Fournier N., Atger V., Cogny A., Védie B., Giral P., Simon A., Moatti N., Paul J.L.

Analysis of the relationship between triglyceridemia and HDL- phospholipid concentrations: consequences on the efflux capacity of serum in the Fu5AH system.
Atherosclerosis, 2001, 157, 315-23.

Frerichs R.R., Webber L.S., Srinivasan S.R., Berenson G.S.

Relation of serum lipids and lipoproteins to obesity and sexual maturity in white and black children.
Am J Epidemiol, 1978, 108, 486-96.

Fried S.K. and Zechner R.

Cachectin/tumor necrosis factor decreases human adipose tissue lipoprotein lipase mRNA levels, synthesis, and activity.
J Lipid Res, 1989, 30, 1917-23.

Fried S.K. and Russell C.D.

Diverse roles of adipose tissue in the regulation of systemic metabolism and energy balance. In: Handbook of Obesity (1st ed.), edited by Bray GA et al. New York: Dekker, 1998, p. 397-413.

Fried S.K., Russell C.D., Grauso N.L., Brolin R.E.

Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. J Clin Invest, 1993, 92, 2191-8.

Fried S.K., Bunkin D.A., Greenberg A.S.

Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83, 847-50.

Friedman J.M.

Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. Nutr Rev, 1998, 56, s38-46, discussion s54-75.

Fruebis J., Tsao T.S., Javorschi S., Ebbets-Reed D., Erickson M.R., Yen F.T., Bihain B.E., Lodish H.F.

Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proc Natl Acad Sci U.S.A., 2001, 98, 2005-10.

Fruhbeck G. and Salvador J.

Relation between leptin and the regulation of glucose metabolism. Diabetologia, 2000, 43, 3-12.

Fruhbeck G., Gomez-Ambrosi J., Muruzabal F.J., Burrell M.A.

The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. Am J Physiol, 2001, 280, E827-47.

Garvey W.T. and Birnbaum M.J.

Cellular insulin action and insulin resistance. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1993, 7, 785-873.

Garvey W.T., Maianu L., Zhu J.H., Brechtel-Hook G., Wallace P., Baron A.D.

Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. J Clin Invest, 1998, 101, 2377-86.

Gatt S. and Bierman E.L.

Sphingomyelin suppresses the binding and utilization of low density lipoproteins by skin fibroblasts. J Biol Chem, 1980, 255, 3371-6.

Gavrilova N.J., Setchenska M.S., Markovska T.T., Momchilova-Pankova A.B., Koumanov K.S.

Effect of membrane phospholipid composition and fluidity on rat liver plasma membrane tyrosine kinase activity.

Int J Biochem, 1993, 25, 1309-12.

Germinario R., Sniderman A.D., Manuel S., Lefebvre S.P., Baldo A., Cianflone K.
Coordinate regulation of triacylglycerol synthesis and glucose transport by acylation-stimulating protein.

Metabolism, 1993, 42, 574-80.

Giese K., Fantl W.J., Vitt C., Stephans J.C., Cousens L., Wachowicz M., Williams L.T.

Reduction of food intake and weight gain by the ob protein requires a specific secondary structure and is reversible.

Mol Med, 1996, 2, 50-8.

Gillotte-Taylor K., Nickel M., Johnson W.J., Francone O.L., Holvoet P., Lund-Katz S., Rothblat G.H., Phillips M.C.

Effects of enrichment of fibroblasts with unesterified cholesterol on the efflux of cellular lipids to apolipoprotein A-I.

J Biol Chem, 2002, 277, 11811-20.

Ginsberg B.H., Brown T.J., Simon I., Spector A.A.

Effect of the membrane lipid environment on the properties of insulin receptors.

Diabetes, 1981, 30, 773-80.

Ginsberg B.H., Jabour J., Spector A.A.

Effect of alterations in membrane lipid unsaturation on the properties of the insulin receptor of Ehrlich ascites cells.

Biochim Biophys Acta, 1982, 690, 157-64.

Ginsberg H.N.

Lipoprotein physiology.

Endocrinol Metab Clin North Am, 1998, 27, 503-19.

Ginsberg H.N. and Huang L.S.

The insulin resistance syndrome: impact on lipoprotein metabolism and atherothrombosis.

J Cardiovasc Risk, 2000, 7, 325-31.

Girard J.

Role of free fatty acids in the insulin resistance of non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Metab*, 1995, 21, 79-88.

Girard J.

Fatty acids and beta cells.

Diabetes Metab, 2000, 26 Suppl 3, 6-9.

Glomset J.A.

The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction.

J Lipid Res, 1968, 9, 155-67.

Gokcel A., Gumurdulu Y., Karakose H., Melek Ertorer E., Tanaci N., BascilTutuncu N., Guvener N.

Evaluation of the safety and efficacy of sibutramine, orlistat and metformin in the treatment of obesity.

Diabetes Obes Metab, 2002, 4, 49-55.

Gorski J., Dobrzyn A., Zendzian-Piotrowska M.

The sphingomyelin-signaling pathway in skeletal muscles and its role in regulation of glucose uptake.

Ann N Y Acad Sci, 2002, 967, 236-48.

Gravholt C.H., Moller N., Jensen M.D., Christiansen J.S., Schmitz O.

Physiological levels of glucagon do not influence lipolysis in abdominal adipose tissue as assessed by microdialysis.

J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86, 2085-9.

Greiwe J.S., Holloszy J.O., Semenkovich C.F.

Exercise induces lipoprotein lipase and GLUT-4 protein in muscle independent of adrenergic-receptor signaling.

J Appl Physiol, 2000, 89, 176-81.

Grigsby R.J. and Dobrowsky R.T.

Inhibition of ceramide production reverses TNF-induced insulin resistance.

Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287, 1121-4.

Grimaldi P.A.

Roles of lipid-activated receptors in the adipogenic action of fatty acids.

Lipids, 1999, Suppl 34, S205-8.

Grimaldi P.A.

The roles of PPARs in adipocyte differentiation.

Prog Lipid Res, 2001, 40, 269-81.

Grinsell J.W., Lardinois C.K., Swislocki A., Gonzalez R., Sare J.S., Michaels J.R., Starich G.H.

Pioglitazone attenuates basal and postprandial insulin concentrations and blood pressure in the spontaneously hypertensive rat.

Am J Hypertens, 2000,13, 370-5.

Groener J.E., Scheek L.M., van Ramshorst E., Krauss X.H., van Tol A.

Delayed increase in high density lipoprotein-phospholipids after ingestion of a fat load in normolipidemic patients with coronary artery disease.

Atherosclerosis, 1998, 137, 311-9.

Guerre-Millo M., Gervois P., Raspe E., Madsen L., Poulain P., Derudas B., Herbert J.M., Winegar D.A., Willson T.M., Fruchart J.C., Berge R.K., Staels B.

Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity.

J Biol Chem, 2000, 275, 16638-42.

Gustavsson J., Parpal S., Karlsson M., Ramsing C., Thorn H., Borg M., Lindroth M., Peterson K.H., Magnusson K.E., Stralfors P.

Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane.
FASEB J, 1999, 13, 1961-71.

Hajdуч E., Litherland G.J., Hundal H.S.

Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport?
FEBS Lett, 492, 199-203, 2001.

Hales C.N. and Barker D.J.

Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis.
Diabetologia, 1992, 35, 595-601.

Hall R.K., Yamasaki T., Kucera T., Waltner-Law M., O'Brien R., Granner D.K.

Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins.
J Biol Chem, 2000, 275, 30169-75.

Halvorsen Y.D., Bond A., Sen A., Franklin D.M., Lea-Currie Y.R., Sujkowski D., Ellis P.N., Wilkison W.O., Gimble J.M.

Thiazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular, and molecular analysis.
Metabolism, 2001, 50, 407-13.

Han C.W., Choi J.H., Kim J.M., Kim W.Y., Lee K.Y., Oh G.T.

Glucocorticoid-mediated repression of inflammatory cytokine production in fibroblast-like rheumatoid synoviocytes is independent of nuclear factor-kappaB activation induced by tumour necrosis factor alpha.
Rheumatology (Oxford), 2001, 40, 267-73.

Hauner H., Petruschke T., Russ M., Rohrig K., Eckel J.

Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture.
Diabetologia, 1995, 38, 764-71.

Hauner H.

Current pharmacological approaches to the treatment of obesity.
Int J Obes Relat Metab Disord, 2001, 25 Suppl 1, S102-6.

Hauptman J.

Orlistat: selective inhibition of caloric absorption can affect long-term body weight.
Endocrine, 2000, 13, 201-6.

Havel J.R. and Kane J.P.

Structure and metabolism of plasma lipoproteins.

In: The metabolic and molecular basis of inherited disease. Scriver CR et al (eds). 7th edition.
McGraw-Hill, USA 1995 pp1841-1851.

Havel P.J.

Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin.
Curr Opin Lipidol, 2002, 13, 51-9.

Hawkins M., Angelov I., Liu R., Barzilai N., Rossetti L.

The tissue concentration of UDP-N-acetylglucosamine modulates the stimulatory effect of insulin on skeletal muscle glucose uptake.
J Biol Chem, 1997, 272, 4889-95.

Hayden M.R., Clee S.M., Brooks-Wilson A., Genest J. Jr., Attie A., Kastelein J.J.

Cholesterol efflux regulatory protein, Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency.
Curr Opin Lipidol, 2000, 11, 117-22.

Hernandez-Ono A., Monter-Carreola G., Zamora-Gonzalez J., Cardoso-Saldana G., Posadas-Sanchez R., Torres-Tamayo M., Posadas-Romero C.

Association of visceral fat with coronary risk factors in a population-based sample of postmenopausal women.
Int J Obes Relat Metab Disord, 2002, 26, 33-9.

Hotamisligil G.S. and Spiegelman B.M.

Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link.
Diabetes, 1994, 43, 1271-8.

Hotamisligil G.S., Johnson R.S., Distel R.J., Ellis R., Papaioannou V.E., Spiegelman B.M.

Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein.
Science, 1996, 274, 1377-9.

Howard B.V.

Insulin resistance and lipid metabolism.
Am J Cardio, 1999, 84, 28J-32J.

Hsueh W.A., Law R.E.

PPARgamma and atherosclerosis: effects on cell growth and movement.
Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21, 1891-5.

Hube F. and Hauner H.

The role of TNF-alpha in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance?
Horm Metab Res, 1999, 31, 626-31.

Hube F., Lee Y.M., Rohrig K., Hauner H.

The phosphodiesterase inhibitor IBMX suppresses TNF-alpha expression in human adipocyte precursor cells: a possible explanation for its adipogenic effect.
Horm Metab Res, 1999, 31, 359-62.

Hube F. and Hauner H.

The two tumor necrosis factor receptors mediate opposite effects on differentiation and glucose metabolism in human adipocytes in primary culture.
Endocrinology, 2000, 141, 2582-8.

Hudgins L.C. and Hirsch J.

Changes in abdominal and gluteal adipose-tissue fatty acid compositions in obese subjects after weight gain and weight loss.
Am J Clin Nutr, 1991, 53, 1372-7.

Hughes T.A., Elam M.B., Applegate W.B., Bond M.G., Hughes S.M., Wang X., Tolley E.A., Bittle J.B., Stentz F.B., Kang E.S.

Postprandial lipoprotein responses in hypertriglyceridemic subjects with and without cardiovascular disease.
Metabolism, 1995, 44, 1082-98.

Iida K.T., Shimano H., Kawakami Y., Sone H., Toyoshima H., Suzuki S., Asano T., Okuda Y., Yamada N.

Insulin up-regulates tumor necrosis factor- α production in macrophages through an extracellular-regulated kinase-dependent pathway
J Biol Chem, 2001, 276, 32531-7.

Inoue J., Kumagai H., Terada T., Maeda M., Shimizu M., Sato R.

Proteolytic activation of SREBPs during adipocyte differentiation.
Biochem Biophys Res Commun, 2001, 283, 1157-61.

Ishizaki M., Teraoka K., Tsuritani I., Honda R., Ishida M., Yamada Y.

Erythrocyte Na⁺/K⁺-ATPase and membrane and serum lipid profiles, as related to alcohol, body mass index and blood pressure.
Clin Exp Hypertens, 1994, 16, 741-59.

Ishizuka T., Itaya S., Wada H., Ishizawa M., Kimura M., Kajita K., Kanoh Y., Miura A., Muto N. and Yasuda K.

Differential effect of the antidiabetic thiazolidinediones troglitazone and pioglitazone on human platelet aggregation mechanism.
Diabetes, 1998, 47, 1494-500.

Ito J., Nagayasu Y., Yokoyama S.

Cholesterol-sphingomyelin interaction in membrane and apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux.
J Lipid Res, 2000, 41, 894-904.

Jackson T.K., Salhanick A.I., Elovson J., Deichman M.L., Amatruda J.M.

Insulin regulates apolipoprotein B turnover and phosphorylation in rat hepatocytes.
J Clin Invest, 1990, 86, 1746-51.

James W.P.

A public health approach to the problem of obesity.
Int J Obes Relat Metab Disord, 1995, 19 Suppl 3, S37-45.

James D.J., Cairns F., Salt I.P., Murphy G.J., Dominiczak A.F., Connell J.M., Gould G.W.

Skeletal muscle of stroke-prone spontaneously hypertensive rats exhibits reduced insulin-stimulated glucose transport and elevated levels of caveolin and flotillin.

Diabetes, 2001, 50, 2148-56.

Janssen I., Fortier A., Hudson R., Ross R.

Effects of an energy-restrictive diet with or without exercise on abdominal fat, intermuscular fat, and metabolic risk factors in obese women.

Diabetes Care, 2002, 25, 431-8.

Jayadev S., Linardic C.M., Hannun Y.A.

Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor alpha.

J Biol Chem, 1994, 269, 5757-63.

Jemaa R., Tuzet S., Portos C., Betoulle D., Apfelbaum M., Fumeron F.

Lipoprotein lipase gene polymorphisms: associations with hypertriglyceridemia and body mass index in obese people.

Int J Obes Relat Metab Disord, 1995, 19, 270-4.

Ji Y., Jian B., Wang N., Sun Y., Moya M.L., Phillips M.C., Rothblat G.H., Swaney J.B., Tall A.R.

Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux.

J Biol Chem, 1997, 272, 20982-5.

Jiang X.C., Bruce C., Mar J., Lin M., Ji Y., Francone O.L., Tall A.R.

Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels.

J Clin Invest, 1999, 103, 907-14.

Jiang X.C., Paultre F., Pearson T.A., et al.

Plasma sphingomyelin level as risk factor for coronary artery disease.

Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20, 2614-8.

Johns D.G. and Webb R.C.

TNF-alpha-induced endothelium-independent vasodilation: a role for phospholipase A2-dependent ceramide signaling.

Am J Physiol, 1998, 275, H1592-8.

Jones B.H., Standridge M.K., Taylor J.W., Moustaid N.

Angiotensinogen gene expression in adipose tissue: analysis of obese models and hormonal and nutritional control.

Am J Physiol, 1997, 273, R236-42.

Joost H.G. and Thorens B

The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review).

Mol Membr Biol, 2001, 18, 247-56.

Jucker B.M., Rennings A.J., Cline G.W., Shulman G.I.

¹³C and ³¹P NMR studies on the effects of increased plasma free fatty acids on intramuscular glucose metabolism in the awake rat.
J Biol Chem, 1997, 272, 10464-73.

Kadowaki T

Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models.
J Clin Invest, 2000, 106, 459-65.

Kahn B.B. and Flier J.S.

Obesity and insulin resistance.
J Clin Invest, 2000, 106, 473-81.

Kahri J., Sane T., van Tol A., Taskinen M.R.

Effect of gemfibrozil on the regulation of HDL subfractions in hypertriglyceridaemic patients.
J Intern Med, 1995, 238, 429-36.

Kan C.C., Ruan Z.S., Bittman R.

Interaction of cholesterol with sphingomyelin in bilayer membranes: evidence that the hydroxy group of sphingomyelin does not modulate the rate of cholesterol exchange between vesicles.
Biochemistry, 1991, 30, 7759-66.

Kandror K.V., Stephens J.M., Pilch P.F.

Expression and compartmentalization of caveolin in adipose cells: coordinate regulation with and structural segregation from GLUT4.
J Cell Biol, 1995, 129, 999-1006.

Karhunen L., Franssila-Kallunki A., Rissanen P., Valve R., Kolehmainen M., Rissanen A., Uusitupa M.

Effect of orlistat treatment on body composition and resting energy expenditure during a two-year weight-reduction programme in obese Finns.
Int J Obes Relat Metab Disord, 2000, 24, 1567-72.

Kaser S., Foger B., Ebenbichler C.F., Kirchmair R., Gander R., Ritsch A., Sandhofer A., Patsch J.R.

Influence of leptin and insulin on lipid transfer proteins in human hepatoma cell line, HepG2.
Int J Obes Relat Metab Disord, 2001, 25, 1633-9.

Kawakami M., Murase T., Ogawa H., Ishibashi S., Mori N., Takaku F., Shibata S.

Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells.
J Biochem (Tokyo), 1987, 101, 331-8.

Kawashima Y., Musoh K., Kozuka H

Peroxisome proliferators enhance linoleic acid metabolism in rat liver. Increased biosynthesis of omega 6 polyunsaturated fatty acids.
J Biol Chem, 1990, 265, 9170-5.

Kawakami M. and Kuroki M.

Roles of cytokines and growth factors in atherogenesis.
Nippon Rinsho, 1993, 51, 2010-5.

Keller, S.R. and Lienhard G.E.

Insulin signalling: the role of insulin receptor substrate 1.
Trends in Cell Biology, 1994, 4, 115-119.

Kelley D.E., Bray G.A., Pi-Sunyer F.X., Klein S., Hill J., Miles J., Hollander P.

Clinical efficacy of orlistat therapy in overweight and obese patients with insulin-treated type 2 diabetes: A 1-year randomized controlled trial.
Diabetes Care, 2002, 25, 1033-41.

Kelly G.S.

Insulin resistance: lifestyle and nutritional interventions.
Altern Med Rev, 2000, 5, 109-32.

Kielar D., Dietmaier W., Langmann T., Aslanidis C., Probst M., Naruszewicz M., Schmitz G.

Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR.
Clin Chem, 2001, 47, 2089-97.

Kim J.B., Wright H.M., Wright M., Spiegelman B.M.

ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand.
Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1998, 95, 4333-7.

Kim S. and Moustaid-Moussa N.

Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte.
J Nutr, 2000, 130, 3110S-3115S.

Kitagawa M., Nakagawa S., Mino M.

Influence of plasma lipids and adiposity on red blood cell tocopherol level.
Eur J Pediatr, 1983, 140, 238-43.

Kobayashi H., Adachi-Akahane S., Nagao T.

Involvement of BK(Ca) channels in the relaxation of detrusor muscle via beta-adrenoceptors.
Eur J Pharmacol, 2000, 404, 231-8.

Kobayashi M.

Life style and the onset of diabetes mellitus.
Nippon Naika Gakkai Zasshi, 2001, 90, 1739-43.

Kolehmainen M., Vidal H., Alhava E., Uusitupa M.I.

Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) expression in human obesity.
Obes Res, 2001, 9, 706-12.

Kondrat'eva E.I. and Meniavtseva T.A.

Circulating immune complexes and insulin antibodies in obesity in children.
Pediatria, 1999, 21-4.

Korshennikova E., Seppala-Lindroos A., Vehkavaara S., Goto T., Virkamaki A.
Elevated fasting insulin concentrations associate with impaired insulin signaling in skeletal muscle of healthy subjects independent of obesity.
Diabetes Metab Res Rev, 2002, 18, 209-16.

Kotani K., Ogawa W., Matsumoto M., Kitamura T., Sakaue H., Hino Y., Miyake K., Sano W., Akimoto K., Ohno S., Kasuga M.
Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes.
Mol Cell Biol, 1998, 18, 6971-82.

Kotzka J., Muller-Wieland D., Koponen A., Njamen D., Kremer L., Roth G., Munck M., Knebel B., Krone W.
ADD1/SREBP-1c mediates insulin-induced gene expression linked to the MAP kinase pathway.
Biochem Biophys Res Commun, 1998, 249, 375-9.

Kubota N., Terauchi Y., Miki H., et al.
PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance.
Mol Cell, 1999, 4, 597-609.

Kuh D., Hardy R., Chaturvedi N., Wadsworth M.E.
Birth weight, childhood growth and abdominal obesity in adult life.
Int J Obes Relat Metab Disord, 2002, 26, 40-7.

Kulschar R., Engelmann B., Brautigam C., Duhm J., Thiery J., Richter W.O.
Fast transmission of alterations in plasma phosphatidylcholine/sphingomyelin ratio and lyso phosphatidylcholine levels into changes of red blood cell membrane phospholipid composition after low density lipoprotein apheresis.
Eur J Clin Invest, 1995, 25, 258-65.

Kwon H.Y., Bultman S.J., Loffler C., Chen WJ., Furdon P.J., Powell J.G., Usala A.L., Wilkison W., Hansmann I., Woychik R.P.
Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the agouti gene.
Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1994, 91, 9760-4.

Laakso M.
Dyslipidaemias, insulin resistance and atherosclerosis.
Ann Med, 24, 505-9, 1992.

Laganriere S. and Yu B.P.
Modulation of membrane phospholipid fatty acid composition by age and food restriction.
Gerontology, 1993, 39, 7-18.

Lagrost L.
The role of cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein remodelling of plasma high-density lipoproteins.
In: *Trends Cardiovasc Med*, 1997, volume 7, N° 6, pp: 218-224.

Lagrost L., Desrumaux C., Masson D., Deckert V., Gambert P.

Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein.
Curr Opin Lipidol, 1998, 9, 203-9.

Lamarche B., Lemieux I., Despres J.P.

The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: epidemiology, pathophysiology and therapeutic aspects.
Diabetes Metab, 1999, 25, 199-211.

Lamphere L., Carpenter C.L., Sheng Z.F., Kallen R.G., Lienhard G.E.

Activation of PI 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes by association with insulin receptor substrate-1.
Am J Physiol, 1994, 266, E486-94.

Langin D., Lucas S., Lafontan M.

Millennium fat-cell lipolysis reveals unsuspected novel tracks.
Horm Metab Res, 2000, 32, 443-52.

Langmann T., Klucken J., Reil M., Liebisch G., Luciani M.F., Chimini G., Kaminski W.E., Schmitz G.

Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages.
Biochem Biophys Res Commun, 1999, 257, 29-33.

Lapidus L., Bengtsson C., Larsson B., Pennert K., Rybo E., Sjostrom L.

Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden.
Br Med J, 1984, 289, 1257-61.

Larsson B., Svardsudd K., Welin L., Wilhelmsen L., Bjorntorp P., Tibblin G.

Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913.
Br Med J, 1984, 288, 1401-4.

Lau R., Blinn W.D., Bonen A., Dyck D.J.

Stimulatory effects of leptin and muscle contraction on fatty acid metabolism are not additive.
Am J Physiol, 2001, 281, E122-9.

Lavan B.E., Lane W.S., Lienhard G.E.

The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family.
J Biol Chem, 1997, 272, 11439-43.

Laville M., Auboeuf D., Khalfallah Y., Vega N., Riou J.P., Vidal H.

Acute regulation by insulin of phosphatidylinositol-3-kinase, Rad, Glut 4, and lipoprotein lipase mRNA levels in human muscle.
J Clin Invest, 1996, 98, 43-9.

Le Lay S., Krief S., Farnier C., Lefrere I., Le Liepvre X., Bazin R., Ferre P., Dugail I.
Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes.
J Biol Chem, 2001, 276, 16904-10.

Le Marchand-Brustel Y., Tanti JF., Cormont M., Ricort J.M., Gremeaux T., Grillo S.
From insulin receptor signalling to Glut 4 translocation abnormalities in obesity and insulin resistance.
J Recept Signal Transduct Res, 1999, 19, 217-28.

Lee J. and Pilch P.F.
The insulin receptor: structure, function, and signaling.
Am J Physiol, 1994, 266, C319-34.

Lefebvre A.M., Laville M., Vega N., Riou J.P., van Gaal L., Auwerx J., Vidal H.
Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects.
Diabetes, 1998, 47, 98-103.

Leger J., Jaquet D., Levy-Marchal C., Czernichow P.
Syndrome X a consequence of intra-uterine malnutrition?
J Pediatr Endocrinol Metab, 2000, 13 Suppl 5, 1257-9.

Lemieux S., Prud'homme D., Bouchard C., Tremblay A., Despres J.P.
Sex differences in the relation of visceral adipose tissue accumulation to total body fatness.
Am J Clin Nutr, 1993, 58, 463-7.

Lemieux S.
Contribution of visceral obesity to the insulin resistance syndrome.
Can J Appl Physiol, 2001, 26, 273-90.

Lentz B.R., Hoehli M., Barenholz Y.
Acyl chain order and lateral domain formation in mixed phosphatidylcholine--sphingomyelin multilamellar and unilamellar vesicles.
Biochemistry, 1981, 20, 6803-9.

Levin G., Cogan U., Mokady S.
Food restriction and membrane fluidity.
Mech Ageing Dev, 1992, 62, 137-41.

Lewis G.F., O'Meara N.M., Soltys P.A., Blackman J.D., Iverius P.H., Druetzler A.F., Getz G.S., Polonsky K.S.
Postprandial lipoprotein metabolism in normal and obese subjects: comparison after the vitamin A fat-loading test.
J Clin Endocrinol Metab, 1990, 71, 1041-50.

Li S., Sun G. and Budde R.J.
Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant p50csk protein tyrosine kinase: a tool for signal transduction research.
Hybridoma, 1995, 14, 341-6.

Lissner L. and Heitmann B.L.

Dietary fat and obesity: evidence from epidemiology.

Eur J Clin Nutr, 1995, 49, 79-90.

Lithell H., Boberg J., Hellsing K., Lundqvist G., Vessby B.

Lipoprotein-lipase activity in human skeletal muscle and adipose tissue in the fasting and the fed states.

Atherosclerosis, 1978, 30, 89-94.

Liu S., Baracos V.E., Quinney H.A., Clandinin M.T.

Dietary omega-3 and polyunsaturated fatty acids modify fatty acyl composition and insulin binding in skeletal-muscle sarcolemma.

Biochem J, 1994, 299, 831-7.

Liu Z.Y., Ganju R.K., Wang J.F., Ona M.A., Hatch W.C., Zheng T., Avraham S., Gill P., Groopman J.E.

Cytokine signaling through the novel tyrosine kinase RAFTK in Kaposi's sarcoma cells.

J Clin Invest, 1997, 99, 1798-804.

Lloyd J.K., Wolff O.H., Whelen W.S.

Childhood obesity.

Br Med J, 1961, 2, 145-148.

Loizou C.L., Ozanne S.E., Martensz N.D., Petry C.J., Wang C.L., Hales C.N.

Early growth restriction, membrane phospholipid fatty acid composition, and insulin sensitivity.

Metabolism, 2001, 50, 1070-7.

Long S.D. and Pekala P.H.

Lipid mediators of insulin resistance: ceramide signalling down- regulates GLUT4 gene transcription in 3T3-L1 adipocytes.

Biochem J, 1996, 319, 179-84.

Lowry O.H., Rosebrough J.N., Farr A., Randall J.R.

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J Biol Chem, 1951, 193, 265-275.

Luiken J.J., Dyck D.J., Han X.X., Tandon N.N., Arumugam Y., Glatz J.F., Bonen A.

Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane.

Am J Physiol, 2002, 282, E491-5

Luo J., Rizkalla S.W., Boillot J., Alamowitch C., Chaib H., Bruzzo F., Desplanque N., Dalix A.M., Durand G., Slama G.

Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids improve adipocyte insulin action and glucose metabolism in insulin-resistant rats: relation to membrane fatty acids.

J Nutr, 1996, 126, 1951-8.

MacClain D.A., Maegawa H., Lee J., Dull T.J., Ulrich A., Olefsky J.M.

A mutant insulin receptor with defective tyrosine kinase displays no biologic activity and does not undergo endocytosis.

J Biol Chem, 1987, 262, 14663-71.

MacLean P.S., Bower J.F., Vadlamudi S., Green T., Barakat H.A.

Lipoprotein subpopulation distributions in lean, obese, and type 2 diabetic women: a comparison of African and white Americans.

Obes Res, 2000, 8, 62-70.

Maeda N., Takahashi M., Funahashi T., et al.

PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein.

Diabetes, 2001, 50, 2094-9.

Maegawa H., Shigeta Y., Egawa K., Kobayashi M.

Impaired autophosphorylation of insulin receptors from abdominal skeletal muscles in nonobese subjects with NIDDM.

Diabetes, 1991, 40, 815-9.

Malmstrom R., Packard C.J., Caslake M., Bedford D., Stewart P., Yki-Jarvinen H., Shepherd J., Taskinen M.R.

Effects of insulin and acipimox on VLDL1 and VLDL2 apolipoprotein B production in normal subjects.

Diabetes, 1998, 47, 779-87.

Marin P., Darin N., Amemiya T., Andersson B., Jern S., Bjorntorp P.

Cortisol secretion in relation to body fat distribution in obese premenopausal women.

Metabolism, 1992, 41, 882-6.

Marques B.G., Hausman D.B., Martin R.J.

Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity.

Am J Physiol, 1998, 275, R1898-908.

Marshall C.J.

Cell signalling. Raf gets it together.

Nature, 1996, 383, 127-8.

Martinez M., Vaya A., Marti R., Gil L., Lluch I., Carmena R., Azna.

Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and hemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin

Thromb Res, 1996, 83, 375-88.

Martinez M., Vaya A., Gil L., Marti R., Dalmau J., Azna.

The cholesterol/phospholipid ratio of the erythrocyte membrane in children with familial hypercholesterolemia. Its relationship with plasma lipids and red blood cell aggregability.

Clin Hemorheol Microcirc, 1998, 18, 259-63.

Martinez J.A., Aguado M., Fruhbeck G.

Interactions between leptin and NPY affecting lipid mobilization in adipose tissue.
J Physiol Biochem, 2000, 56, 1-8.

Maslowska M.H., Sniderman A.D., MacLean L.D., Cianflon.

Regional differences in triacylglycerol synthesis in adipose tissue and in cultured preadipocytes
J Lipid Res, 1993, 34, 219-28.

Maslowska M, Scantlebury T, Germinario R, Cianflone K.

Acute in vitro production of acylation stimulating protein in differentiated human adipocytes.
J Lipid Res, 1997, 38, 1-11.

Mastick C.C., Brady M.J., Saltiel A.R.

Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin.
J Cell Biol, 1995, 129, 1523-31.

Mastick C.C. and Saltiel A.R.

Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin is specific for the differentiated adipocyte phenotype in 3T3-L1 cells.
J Biol Chem, 1997, 272, 20706-14.

Masui H., Urade R., Kit.

Selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into organelle phospholipids of animal cells
Biosci Biotechnol Biochem, 1997, 61, 900-2.

Matsuzawa Y., Shimomura I., Nakamura T., Keno Y., Tokunag.

Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity.
Diabetes Res Clin Pract, 1994, 24 Suppl, S11.

Matsuzawa Y., Funahashi T., Nakamura T.

Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances.
Ann N Y Acad Sci, 1999, 892, 146-54.

Matsuzaka T., Shimano H., Yahagi N., Amemiya-Kudo M., Yoshikawa T., Hasty A.H., Tamura Y., Osuga J., Okazaki H., Iizuka Y., Takahashi A., Sone H., Gotoda T., Ishibashi S., Yamad.

Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPAR alpha.
J Lipid Res, 2002, 43, 107-14.

Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S., Naylor B.A., Treacher D.F., Turner R.C.

Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man.
Diabetologia, 1985, 28, 412-9.

- Matveev S., Uittenbogaard A., van Der Westhuyzen D., Smart E.J.**
Caveolin-1 negatively regulates SR-BI mediated selective uptake of high-density lipoprotein-derived cholesteryl ester.
Eur J Biochem, 2001, 268, 5609-16.
- Mayfield D.K., Brown A.M., Page G.P., Garvey W.T., Shriver M.D., Argyropoulo.**
A role for the Agouti-Related Protein promoter in obesity and type 2 diabetes. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287, 568-73.
- Mazzone T., Foster D., Chait A.**
In vivo stimulation of low-density lipoprotein degradation by insulin.
Diabetes, 1984, 33, 333-8.
- McIntosh T.J., Simon S.A., Needham D., Huang.**
Structure and cohesive properties of sphingomyelin/cholesterol bilayer
Biochemistry, 1992, 31, 2012-20.
- McKeel D.W., and Jarett L.**
Preparation and characterization of a plasma membrane fraction from isolated fat cells.
J Cell Biol, 1970, 44, 417-32.
- McLaughlin T., Abbasi F., Carantoni M., Schaaf P., Reave.**
Differences in insulin resistance do not predict weight loss in response to hypocaloric diets in healthy obese women
J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84, 578-81.
- McLaughlin T., Abbasi F., Lamendola C., Kim H.S., Reaven.**
Metabolic changes following sibutramine-assisted weight loss in obese individuals: role of plasma free fatty acids in the insulin resistance of obesity
Metabolism, 2001, 50, 819-24.
- Mekki N., Christofilis M.A., Charbonnier M., Atlan-Gepner C., Defoort C., Juhel C., Borel P., Portugal H., Pauli A.M., Vialettes B., Lairo.**
Influence of obesity and body fat distribution on postprandial lipemia and triglyceride-rich lipoproteins in adult women
J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84, 184-91.
- Mendez A.J., Lin G., Wade D.P., Lawn R.M., Oram J.F.**
Membrane lipid domains distinct from cholesterol/sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABCA1-mediated lipid secretory pathway.
J Biol Chem. 2001, 276, 3158-66.
- Meng L., Zhou J., Sasano H., Suzuki T., Zeitoun K.M., Bulun.**
Tumor necrosis factor alpha and interleukin 11 secreted by malignant breast epithelial cells inhibit adipocyte differentiation by selectively down-regulating CCAAT/enhancer binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma: mechanism of desmoplastic reaction.
Cancer Res, 2001, 61, 2250-5.

Merrill A.H. Jr., and Jones D.D.

An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1044, 1-12.

Michailov M.L.

The free fatty acid pattern in blood serum in young spontaneously hypertensive rats. *Biochem Exp Biol*, 1979, 15, 286-9.

Michailov B., Ostlund R.E Jr., Patterson B.W., Klein S.

Orlistat inhibits dietary cholesterol absorption. *Obes Res*, 2001, 9, 599-604.

Misbin R.I., Almira E.C., Cleman M.W.

Insulin degradation in serum of a patient with apparent insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 1981, 52, 177-80.

Mittendorfer B., Ostlund R.E. Jr., Patterson B.W., Klein S.

Orlistat inhibits dietary cholesterol absorption. *Obes Res*, 2001, 9, 599-604.

Mohamed-Ali V., Goodrick S., Rawesh A., Katz D.R., Miles J.M., Yudkin J.S., Klein S., Coppack S.W.

Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82, 4196-200.

Mohamed-Ali V., Pinkney J.H., Coppack S.W.

Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1998, 22, 1145-58.

Moller D.E., Chang P.Y., Yaspelkis B.B 3rd., Flier J.S., Wallberg-Henriksson H., Ivy J.L.

Transgenic mice with muscle-specific insulin resistance develop increased adiposity, impaired glucose tolerance, and dyslipidemia. *Endocrinology*, 1996, 137, 2397-405.

Montague C.T., Prins J.B., Sanders L., Zhang J., Sewter C.P., Digby J., Byrne C.D., O'Rahilly S.

Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes*, 1998, 47, 1384-91.

Montague C.T. and O'Rahilly S.

The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes*, 2000, 49, 883-8.

Moon Y.A., Shah N.A., Mohapatra S., Warrington J.A., Horton J.D.

Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*, 2001, 276, 45358-66.

Moore G.B., Chapman H., Holder J.C., Lister C.A., Piercy V., Smith S.A., Clapham J.C.
Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice.
Biochem Biophys Res Commun, 2001, 286, 735-41.

Morel Y.
Dietary approach to obesity.
Schweiz Rundsch Med Prax. 1996, 85, 1584-8.

Morrison W.R., and Smith L.M.
Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoride methanol.
J Lipid Res, 1964, 5, 600-608.

Moule S.K., Edgell N.J., Welsh G.I., Diggle T.A., Foulstone E.J., Heesom K.J., Proud C.G., Denton R.M.
Multiple signalling pathways involved in the stimulation of fatty acid and glycogen synthesis by insulin in rat epididymal fat cells.
Biochem J, 1995, 311, 595-601.

Moussa N.M. and Claycombe K.J.
The yellow mouse obesity syndrome and mechanisms of agouti-induced obesity.
Obes Res, 1999, 7, 506-14.

Muls E., Kolanowski J., Scheen A., Van Gaal L.
The effects of orlistat on weight and on serum lipids in obese patients with hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo- controlled, multicentre study.
Int J Obes Relat Metab Disord, 2001, 25, 1713-21.

Munoz P., Mora S., Sevilla L., Kaliman P., Tomas E., Guma A., Testar X., Palacin M., Zorzano A.
Expression and insulin-regulated distribution of caveolin in skeletal muscle. Caveolin does not colocalize with GLUT4 in intracellular membranes.
J Biol Chem, 1996, 271, 8133-9.

Murao K., Wada Y., Nakamura T., Taylor A.H., Mooradian A.D., Wong N.C.
Effects of glucose and insulin on rat apolipoprotein A-I gene expression.
J Biol Chem, 1998, 273, 18959-65.

Murata M., Peranen J., Schreiner R., Wieland F., Kurzchalia T.V., Simons K.
VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein.
Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1995, 92, 10339-43.

Murray I., Kohl J., Cianflone K.
Acylation-stimulating protein (ASP): structure-function determinants of cell surface binding and triacylglycerol synthetic activity.
Biochem J 1999, 342, 41-8.

Murthy S., Born E., Mathur S.N.
LXR/RXR activation enhances basolateral efflux of cholesterol in CaCo-2 cells.
J Lipid Res, 2002, 43, 1054-64.

Myers M.G., Sun X.J., White M.F.

The IRS-1 signalling system.

TIBS, 1994, 19, 290-293.

Mykkanen L., Zaccaro D.J., Hales C.N., Festa A., Haffner S.M.

The relation of proinsulin and insulin to insulin sensitivity and acute insulin response in subjects with newly diagnosed type II diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study.

Diabetologia, 1999, 42, 1060-6.

M'Zali H. and Giraud F.

Phosphoinositide reorganization in human erythrocyte membrane upon cholesterol depletion.

Biochem J, 1986, 234, 13-20.

Nagaev I. and Smith U.

Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle.

Biochem Biophys Res Commun, 2001, 285, 561-4.

Nakielnny S., Cohen P., Wu J., Sturgill T.

MAP kinase activator from insulin-stimulated skeletal muscle is a protein threonine/tyrosine kinase.

EMBO J, 1992, 11, 2123-9.

Naumov V.G., Lupanov V.P., Dotsenko IuV., Tvorogova M.G.

Six-month xenical (orlistat) therapy of patients with stable angina pectoris concomitant with obesity and hyperlipidemia.

Ter Arkh, 2002, 74, 47-51.

Neufeld N.D., Ezrin C., Corbo L., Long D., Bush M.A.

Effects of caloric restriction and exercise on insulin receptors in obesity: association with changes in membrane lipids.

Metabolism, 1986, 35, 580-7.

Niesler C.U., Siddle K., Prins J.B.

Human preadipocytes display a depot-specific susceptibility to apoptosis.

Diabetes, 1998, 47, 1365-8.

Ninomiya-Tsuji J., Torti F.M., Ringold G.M.

Tumor necrosis factor-induced c-myc expression in the absence of mitogenesis is associated with inhibition of adipocyte differentiation.

Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1993, 90, 9611-5.

Nugent C., Prins J.B., Whitehead J.P., Wentworth J.M., Chatterjee V.K., O'Rahilly S.

Arachidonic acid stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by increasing GLUT1 and GLUT4 levels at the plasma membrane. Evidence for involvement of lipoxygenase metabolites and peroxisome proliferator- activated receptor gamma.

J Biol Chem, 2001, 276, 9149-57.

O'Brien R.M. and Granner D.K.

Regulation of gene expression by insulin.
Physiol Rev, 1996, 76, 1109-61

O'Brien R.M., Streeper R.S., Ayala J.E., Stadelmaier B.T., Hornbuckle L.A.

Insulin-regulated gene expression.
Biochem Soc Trans, 2001, 29, 552-8.

O'Neill .T.J., Rose DW., Pillay TS., Hotta K., Olefsky JM., Gustafson TA

Interaction of a GRB-IR splice variant (a human GRB10 homolog) with the insulin and insulin-like growth factor I receptors. Evidence for a role in mitogenic signaling.
J Biol Chem, 1996, 271, 22506-13.

Oizumi T., Daimon M., Saitoh T., Kameda W., Yamaguchi H., Ohnuma H., Igarashi M., Eguchi H., Manaka H., Tominaga M., Kato T.

Genotype Arg/Arg, but not Trp/Arg, of the Trp64Arg polymorphism of the beta(3)-adrenergic receptor is associated with type 2 diabetes and obesity in a large Japanese sample.
Diabetes Care, 2001, 24, 1579-83.

Okada T., Kawano Y., Sakakibara T., Hazeki O., Ui M.

Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin.
J Biol Chem 1994, 269, 3568-73.

Okuno M., Caraveo V.E., Goodman D.S., Blaner W.S.

Regulation of adipocyte gene expression by retinoic acid and hormones: effects on the gene encoding cellular retinol-binding protein.
J Lipid Res, 1995, 36, 137-47.

Okuno A., Tamemoto H., Tobe K., Ueki K., Mori Y., Iwamoto K., Umesono K., Akanuma Y., Fujiwara T., Horikoshi H., Yazaki Y., Kadowaki T.

Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats.
J Clin Invest, 1998 Mar 15, 101, 1354-61.

Oliver W.R. Jr., Shenk J.L., Snaith M.R., et al.

A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001, 98, 5306-11.

Ollmann M.M., Wilson B.D., Yang Y.K., Kerns J.A., Chen Y., Gantz I., Barsh G.S.

Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein.
Science, 1997, 278, 135-8.

Oppert J.M., Tourville J., Chagnon M., Mauriege P., Dionne F.T., Perusse L., Bouchard C.

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.

Oram J.F.

Molecular basis of cholesterol homeostasis: lessons from Tangier disease and ABCA1. *Trends Mol Med*, 2002, 8, 168-73.

Osawa H., Nishimiya T., Ochi M., Niiya T., Onuma H., Kitamuro F., Kaino Y., Kida K., Makino H.

Identification of novel C253Y missense and Y864X nonsense mutations in the insulin receptor gene in type A insulin-resistant patients. *Clin Genet*, 2001, 59, 194-7.

Ozerova I.N., Metel'skaia V.A., Perova N.V.

High density lipoprotein composition in moscovites with low and high HDL cholesterol level. *Ter Arkh*, 2001, 73, 34-8.

Pagano E., Siani A., Pauciullo P., Lirato C., Iacone R., Sacchi A., Strazzullo P.

Effect of dietary versus pharmacological correction of hypertriglyceridemia on red blood cell membrane sodium/lithium countertransport activity. *Life Sci*, 1997, 60, 2389-97.

Pan D.A., Lillioja S., Milner M.R., Kriketos A.D., Baur L.A., Bogardus C., Storlien L.H.

Skeletal muscle membrane lipid composition is related to adiposity and insulin action. *J Clin Invest*, 1995, 96, 2802-8.

Pasanisi F., Contaldo F., de Simone G., Mancini M.

Benefits of sustained moderate weight loss in obesity. *Nutr Metab Cardiovasc*, 2001, 11, 401-6.

Path G., Bornstein S.R., Gurniak M., Chrousos G.P., Scherbaum W.A., Hauner H.

Human breast adipocytes express interleukin-6 (IL-6) and its receptor system: increased IL-6 production by beta-adrenergic activation and effects of IL-6 on adipocyte function. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86, 2281-8.

Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW.

Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J*, 1991, 10, 885-92.

Pelikanova T., Kohout M., Hilgertova J., Base J., Farska I., Valek J.

Erythrocyte insulin receptor characteristics and erythrocyte membrane lipid composition in healthy men. *Physiol Bohemoslov*, 1989, 38, 419-25.

Percy A.K., Schmel E., Earles B.J., Lennarz W.J.

Phospholipid biosynthesis in the membranes of immature and mature red blood cells. *Biochemistry*, 1973, 12, 2456-61.

Peyron-Caso E., Fluteau-Nadler S., Kabir M., Guerre-Millo M., Quignard-Boulangé A., Slama G., Rizkalla S.W.

Regulation of Glucose Transport and Transporter 4 (GLUT-4) in Muscle and Adipocytes of Sucrose-Fed Rats: Effects of N-3 Poly- and Monounsaturated Fatty Acids.
Horm Metab Res, 2002, 34, 360-6.

Petruschke T. and Hauner H.

Tumor necrosis factor-alpha prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells.
J Clin Endocrinol Metab, 1993, 76, 742-7.

Phinney S.D., Davis P.G., Johnson S.B., Holman R.T

Obesity and weight loss alter serum polyunsaturated lipids in humans.
Am J Clin Nutr, 1991, 53, 831-8.

Phinney S.D.

Arachidonic acid maldistribution in obesity.
Lipids, 1996, 31 Suppl, S271-4.

Piazzè Garnica J.J., Anceschi M.M., Pierucci F., Pollastrini L., Cesa F., Cosmi E.V.

Differences in erythrocyte membrane cholesterol to phospholipids ratio in postmenopausal women with and without hormone replacement.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1997, 72, 191-4.

Pinhas-Hamiel O., Dolan L.M., Daniels S.R., Standiford D., Khoury P.R., Zeitler P.

Increased incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents.
J Pediatr, 1996, 128, 608-15.

Ponizovsky AM, Modai I, Nechamkin Y, Barshtein G, Ritsner MS, Yedgar S, Lecht S, Bergelson LD. Phospholipid patterns of erythrocytes in schizophrenia: relationships to symptomatology.

Schizophr Res, 2001, 52, 121-6.

Popp-Snijders C., Schouten J.A., Heine R.J., Van Der Meer E.A.

Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids improves insulin sensitivity in non-insulin-dependant diabetes.
Diabetes Res, 1987, 4, 141-147.

Pratley R.E., Ren K., Milner M.R., Sell S.M.

Insulin increases leptin mRNA expression in abdominal subcutaneous adipose tissue in humans.
Mol Genet Metab, 2000, 70, 19-26.

Previs S.F., Withers D.J., Ren J.M., White M.F., Shulman G.I.

Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo.
J Biol Chem, 2000, 275, 38990-4.

Prins J.B., Niesler C.U., Winterford C.M., Bright N.A., Siddle K., O'Rahilly S., Walker N.I., Cameron D.P.

Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells.
Diabetes, 1997, 46, 1939-44.

Prins J., Ledgerwood E., Ameloot P., Vandenabeele P., Faraco P., Bright N., O'Rahilly S., Bradley J.

Tumour necrosis factor induced autophagy and mitochondrial morphological abnormalities are mediated by TNFR-I and/or TNFR-II and do not invariably lead to cell death.
Biosci Rep. 1998, 18, 329-40.

Qian H., Hausman D.B., Compton M.M., Martin R.J., Della-Fera M.A., Hartzell D.L., Baile C.A.

TNFalpha induces and insulin inhibits caspase 3-dependent adipocyte apoptosis.
Biochem Biophys Res Commun, 2001, 284, 1176-83.

Radeau T., Robb M., Lau P., Borthwick J., McPherson R.

Relationship of adipose tissue cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA to plasma concentrations of CETP in man.
Atherosclerosis, 1998, 139, 369-76.

Ramsay T.G.

Porcine leptin alters insulin inhibition of lipolysis in porcine adipocytes in vitro.
J Anim Sci, 2001, 79, 653-7.

Rau H., Kocova M., O'Rahilly S., Whitehead J.P.

Naturally occurring amino acid substitutions at Arg1174 in the human insulin receptor result in differential effects on receptor biosynthesis and hybrid formation, leading to discordant clinical phenotypes.
Diabetes, 2000, 49, 1264-8.

Rayner D.V. and Trayhurn P.

Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions.
J Mol Med 2001, 79, 8-20.

Reaven G.M.

Diet and Syndrome X.
Curr Atheroscler Rep, 2000, 2, 503-7.

Reaven G.

Syndrome X.
Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2001, 3, 323-332.

Reaven G., Segal K., Hauptman J., Boldrin M., Lucas C.

Effect of orlistat-assisted weight loss in decreasing coronary heart disease risk in patients with syndrome X.
Am J Cardiol, 2001, 87, 827-31.

Redgrave T.G., Roberts D.C., West C.E.

Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation.
Anal Biochem, 1975, 65, 42-9.

Reed D.R., Ding Y., Xu W., Cather C., Green E.D., Price R.A.

Extreme obesity may be linked to markers flanking the human OB gene.
Diabetes, 1996, 45, 691-4.

Richter E.A., Derave W., Wojtaszewski J.F.

Glucose, exercise and insulin: emerging concepts.
J Physiol, 2001, 535, 313-22.

Ridgway N.D.

Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin.
Biochim Biophys Acta, 2000, 1484, 129-41.

Riemens S.C., van Tol A., Sluiter W.J., Dullaart R.P.

Plasma phospholipid transfer protein activity is related to insulin resistance: impaired acute lowering by insulin in obese Type II diabetic patients.
Diabetologia, 1998, 41, 929-34.

Rieusset J., Andreelli F., Auboeuf D., Roques M., Vallier P., Riou JP., Auwerx J., Laville M., Vidal H.

Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator- activated receptor-gamma in human adipocytes.
Diabetes, 1999, 48, 699-705.

Rizza R.A., Mandarino L.J., Gerich J.E.

Mechanisms of insulin resistance in man. Assessment using the insulin dose-response curve in conjunction with insulin-receptor binding.
Am J Med, 1981, 70, 169-76.

Roch-Arveiller M. and Couderc R.

Caveolae membrane domains, specialized transmembrane exchange zones implicated in cell signalling.
Ann Biol Clin (Paris), 2000, 58, 141-6.

Rogiers V., Crokaert R., Vis H.L.

Altered phospholipid composition and changed fatty acid pattern of the various phospholipid fractions of red cell membranes of cystic fibrosis children with pancreatic insufficiency.
Clin Chim Acta, 1980, 105, 105-15.

Roh C., Roduit R., Thorens B., Fried S., Kandror K.V.

Lipoprotein lipase and leptin are accumulated in different secretory compartments in rat adipocytes.
J Biol Chem, 2001, 276, 35990-4.

- Rolland-Cachera M. F., Cole T. J., Sempe M., Tichet J., Rossignol C., Charraud A.**
Body Mass Index variations: centiles from birth to 87 years
Eur J Clin Nutr, 1991, 45, 13-21.
- Rordorf-Nikolic T., Van Horn D.J., Chen D., White M.F., Backer J.M.**
Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase by tyrosyl phosphoproteins. Full activation requires occupancy of both SH2 domains in the 85-kDa regulatory subunit.
J Biol Chem, 1995, 270, 3662-6.
- Ros-Baro A., Lopez-Iglesias C., Peiro S., Bellido D., Palacin M., Zorzano A., Camps M**
Lipid rafts are required for GLUT4 internalization in adipose cells.
Proc Natl Acad Sci U.S.A., 2001, 98, 12050-5.
- Rose H.G. and Oklander M.**
Improved procedure for extraction of lipids from human erythrocytes.
J Lipid Res., 1965, 6, 428-431.
- Rosenfalck A.M., Hendel H., Rasmussen M.H., Almdal T., Anderson T., Hilsted J., Madsbad S.**
Minor long-term changes in weight have beneficial effects on insulin sensitivity and beta-cell function in obese subjects.
Diabetes Obes Metab 2002, 4, 19-28.
- Ross R., Shaw K.D., Rissanen J., Martel Y., de Guise J., Avruch L.**
Sex differences in lean and adipose tissue distribution by magnetic resonance imaging: anthropometric relationships.
Am J Clin Nutr, 1994, 59, 1277-85.
- Ross R., Dagnone D., Jones P.J., Smith H., Paddags A., Hudson R., Janssen I.**
Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise-induced weight loss in men. A randomized, controlled trial.
Ann Intern Med, 2000, 133, 92-103.
- Rossner S., Walldius G., Bjorvell H.**
Fatty acid composition in serum lipids and adipose tissue in severe obesity before and after six weeks of weight loss.
Int J Obes, 1989, 13, 603-12.
- Rothblat G.H., de la Llera-Moya M., Atger V., Kellner-Weibel G., Williams D.L., Phillips M.C.**
Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights.
J Lipid Res, 1999, 40, 781-96.
- Ryder J.W., Chibalin A.V., Zierath J.R.**
Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle.
Acta Physiol Scand, 2001, 171, 249-57.

Sadurska B, Skalska-Hilgier E.

Role of lipases in human metabolism.
Postepy Hig Med Dosw. 2001, 55, 541-63.

Saito H., Arimoto I., Tanaka M., Sasaki T., Tanimoto T., Okada S., Handa T.

Inhibition of lipoprotein lipase activity by sphingomyelin: role of membrane surface structure.
Biochim Biophys Acta, 2000, 1486, 312-20.

Saghizadeh M., Ong J.M., Garvey W.T., Henry R.R., Kern P.A.

The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance.
J Clin Invest, 1996, 97, 1111-6.

Sakaue S., Nishihira J., Hirokawa J., Yoshimura H., Honda T., Aoki K., Tagami S., Kawakami Y.

Regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression by glucose and insulin in adipocytes in vitro.
Mol Med, 1999, 5, 361-71.

Saltiel A.R.

You are what you secrete.
Nat Med, 2001, 7, 887-8.

Samad F., Yamamoto K., Pandey M., Loskutoff D.J.

Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice.
Mol Med, 1997, 3, 37-48.

Samad F., Pandey M., Bell P.A., Loskutoff D.J.

Insulin continues to induce plasminogen activator inhibitor 1 gene expression in insulin-resistant mice and adipocytes.
Mol Med, 2000, 6, 680-92.

Sanchez-Gutierrez J.C., Sanchez-Arias J.A., Valle J.C., Guadano A., Samper B., Mato J.M., Feliu J.E.

Insulin resistance in genetically obese (fa/fa) rats: changes in the glycosylphosphatidylinositol signaling system in isolated hepatocytes.
Endocrinology, 1994, 134, 1485-92.

Sandra A., Fyler D.J., Marshall S.J.

Effects of lipids on the transport activity of the reconstituted glucose transport system from rat adipocyte.
Biochim Biophys Acta, 1984, 778, 511-5.

Sankaram M.B. and Thompson T.E.

Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin.
Biochemistry, 1990, 29, 10670-5.

Savage D.B., Sewter C.P., Klenk E.S., Segal D.G., Vidal-Puig A., Considine R.V., O'Rahilly S.

Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans.

Diabetes, 2001, 50, 2199-202.

Schmidt W., Poll-Jordan G., Loffler G.

Adipose conversion of 3T3-L1 cells in a serum-free culture system depends on epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, corticosterone, and cyclic AMP.

J Biol Chem, 1990, 265, 15489-95.

Schmitz G., and Drobnik W.

ATP-binding cassette transporters in macrophages: promising drug targets for treatment of cardiovascular disease.

Curr Opin Investig Drugs, 2002, 3, 853-8.

Schmitz-Peiffer C.

Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply.

Cell Signal, 2000, 12, 583-94.

Schouten J.A., Van Gent C.M., Popp-Snijders C., Van der Veen E.A., Van der Voort H.A.

The influence of low calorie (240 kcal/day) protein-carbohydrate diet on serum lipid levels in obese subjects.

Int J Obes, 1981, 5, 333-9.

Seely B.L. and Olefsky J.M.

Potential cellular and genetic mechanisms of insulin resistance in the common disorders of diabetes and obesity.

Baillière's Clin Endocrinol Met, 1993, 7, 187-252.

Shanmugasundaram K.R., Visvanathan A., Dhandapani K., Srinivasan N., Rasappan P., Gilbert R., Alladi S., Kancharla S., Vasanthi N.

Effect of high-fat diet on cholesterol distribution in plasma lipoproteins, cholesterol esterifying activity in leucocytes, and erythrocyte membrane components studied: importance of body weight.

Am J Clin Nutr, 1986, 44, 805-15.

Shao J., Catalano P.M., Yamashita H., Ruyter I., Smith S., Youngren J., Friedman J.E.

Decreased insulin receptor tyrosine kinase activity and plasma cell membrane glycoprotein-1 overexpression in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes mellitus (GDM): evidence for increased serine/threonine phosphorylation in pregnancy and GDM.

Diabetes, 2000, 49, 603-10.

Shepherd P.R., Gnudi L., Tozzo E., Yang H., Leach F., Kahn B.B.

Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue.

J Biol Chem, 1993, 268, 22243-6.

Shimomura I., Shimano H., Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S.

Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells.
J Clin Invest, 1997, 99, 838-45.

Shimomura I., Matsuda M., Hammer R.E., Bashmakov Y., Brown M.S., Goldstein J.L.

Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice.
Mol Cell, 2000, 6, 77-86.

Shoelson S.E., White M.F., Kahn C.R.

Tryptic activation of the insulin receptor. Proteolytic truncation of the alpha-subunit releases the beta-subunit from inhibitory control.
J Biol Chem, 1988, 263, 4852-60.

Shulman G.I.

Cellular mechanisms of insulin resistance in humans.
J Clin Invest, 2000, 106, 171-6.

Sims E.A.

Are there persons who are obese, but metabolically healthy?
Metabolism, 2001, 50, 1499-504.

Sinaiko A.R., Jacobs D.R Jr., Steinberger J., Moran A., Luepker R., Rocchini A.P., Prineas R.J.

Insulin resistance syndrome in childhood: associations of the euglycemic insulin clamp and fasting insulin with fatness and other risk factors.
J Pediatr, 2001, 139, 700-7.

Singer S.J. and Nicholson G.L.

The fluid mosaic model of cell membrane.
Science, 1972, 172, 720-731.

Sjostrom L., Rissanen A., Anderson T., Boldrin M., Golay A., Koppeschaar H.P., Krempf M.

Randomised placeb-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. European Multicenter Orlistat Study Group.
Lancet, 1998, 352, 167-72.

Skeggs J.W., and Morton R.E.

LDL and HDL enriched in triglyceride promote abnormal cholesterol transport.
J Lipid Res, 2002, 43, 1264-74.

Skolnik EY, Batzer A, Li N, Lee CH, Lowenstein E, Mohammadi M, Margolis B, Schlessinger J.

The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways.
Science. 1993, 260, 1953-5.

Slater S.J., Kelly M.B., Taddeo F.J., Ho C., Rubin E., Stubbs C.D.

The modulation of protein kinase C activity by membrane lipid bilayer structure.
J Biol Chem, 1994, 269, 4866-71.

Slavin B.G., Ong J.M., Kern P.A

Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes.
J Lipid Res, 1994, 35, 1535-41.

Slotte J.P.

Sphingomyelin-cholesterol interactions in biological and model membranes.
Chem Phys Lipids, 1999, 102, 13-27.

Slyper A.H.

Low-density lipoprotein density and atherosclerosis. Unraveling the connection.
JAMA, 1994, 27, 272, 305-8.

Smith-Hall J., Pons S., Patti M.E., Burks D.J., Yenush L., Sun X.J., Kahn C.R., White M.F.

The 60 kDa insulin receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells.
Biochemistry, 1997, 36, 8304-10.

Spiegelman B.M., Flier J.S.

Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture.
Cell, 1996, 87, 377-89.

Spiegelman B.M.

PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor.
Diabetes, 1998, 47, 507-14.

Standaert M.L., Galloway L., Karnam P., Bandyopadhyay G., Moscat J., Farese R.V.

Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport.
J Biol Chem, 1997, 272, 30075-82.

Standl E. and Kolb H.J.

Insulin degrading enzyme activity and insulin binding of erythrocytes in normal subjects and Type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients.
Diabetologia, 1984, 27, 17-22.

Stears A.J. and Byrne C.D.

Adipocyte metabolism and the metabolic syndrome.
Diabetes Obes Metab, 2001, 3, 129-42.

Steinberg G.R., Dyck D.J., Calles-Escandon J., Tandon N.N., Luiken J.J., Glatz J.F., Stephens J.M. and Pekala P.H.

Transcriptional repression of the C/EBP-alpha and GLUT4 genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. Regulation is coordinate and independent of protein synthesis.
J Biol Chem, 1992, 267, 13580-4.

Steinberg H.O., Chaker H., Leaming R., Johnson A., Brechtel G., Baron A.D.

Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance.

J Clin Invest, 1996, 97, 2601-10.

Steinberg GR, Dyck DJ, Calles-Escandon J, Tandon NN, Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A.

Chronic leptin administration decreases fatty acid uptake and fatty acid transporters in rat skeletal muscle.

J Biol Chem. 2002, 277, 8854-60.

Stephens J.M. and Pekala P.H.

Transcriptional repression of the C/EBP-alpha and GLUT4 genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. Regulations is coordinate and independent of protein synthesis.

J Biol Chem, 1992, 267, 13580-4.

Stephens L., Anderson K., Stokoe D., Erdjument-Bromage H., Painter G.F., Holmes A.B., Gaffney P.R., Reese C.B., McCormick F., Tempst P., Coadwell J., Hawkins P.T.

Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B.

Science, 1998, 279, 710-4.

Steppan C.M., Bailey S.T., Bhat S., Brown E.J., Banerjee R.R., Wright C.M., Patel H.R., Ahima R.S., Lazar M.A.

The hormone resistin links obesity to diabetes.

Nature, 2001, 409, 307-12.

Stern M.P.

Strategies and prospects for finding insulin resistance genes.

J Clin Invest, 2000, 106, 323-7.

Stoeckelhuber M., Dobner P., Baumgartner P., Ehlert J., Brandt E., Mentele R., Adam D., Engelmann B.

Stimulation of cellular sphingomyelin import by the chemokine connective tissue-activating peptide III.

J Biol Chem, 2000, 275, 37365-72.

Stolyhwo A. and Martin M.

Anaysis of lipid classes by HPLC with evaporative light scattering detector.

J Liq Chromatogr, 1987, 1237-1253.

Storlien L.H., Jenkins A.B., Chisholm D.J., Pascoe W.S., Khouri S., Kraegen E.W.

Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid.

Diabetes, 1991, 40, 280-9.

Storlien L.H., Pan D.A., Kriketos A.D., O'Connor J., Caterson I.D., Cooney G.J., Jenkins A.B., Baur L.A.

Skeletal muscle membrane lipids and insulin resistance.

Lipids, 1996, 31 Suppl, S261-5.

Storlien L.H., Kriketos A.D., Calvert G.D., Baur L.A., Jenkins A.B.

Fatty acids, triglycerides and syndromes of insulin resistance.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1997, 57, 379-85.

Streicher R., Kotzka J., Muller-Wieland D., Siemeister G., Munck M., Avci H., Krone W.

SREBP-1 mediates activation of the low density lipoprotein receptor promoter by insulin and insulin-like growth factor-I.

J Biol Chem, 1996, 271, 7128-33.

Strunecka A. and Folk P.

Phospholipid biosynthesis in mature human erythrocytes.

Gen Physiol Biophys, 1988, 7, 205-16.

Summers S.A., Whiteman E.L., Birnbaum M.J.

Insulin signaling in the adipocyte.

Int J Obes Relat Metab Disord, 2000, 24 Suppl 4, S67-70.

Sun X.J., Wang L.M., Zhang Y., Yenush L., Myers M.G. Jr., Glasheen E., Lane W.S., Pierce J.H., White M.F.

Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling.

Nature, 1995, 377, 173-7.

Sutherland C., O'Brien R.M., Granner D.K.

New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1996, 351, 191-9.

Tanaka S., Togashi K., Rankinen T., Perusse L., Leon A.S., Rao D.C., Skinner J.S., Wilmore J.H., Bouchard C.

Is adiposity at normal body weight relevant for cardiovascular disease risk?

Int J Obes Relat Metab Disord, 2002, 26, 176-83.

Tang D.G., Grossi I.M., Chen Y.Q., Diglio C.A., Honn K.V.

12(S)-HETE promotes tumor-cell adhesion by increasing surface expression of alpha V beta 3 integrins on endothelial cells.

Int J Cancer, 1993, 54, 102-11.

Tanti J.F., Gremeaux T., van Obberghen E., Le Marchand-Brustel Y.

Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling.

J Biol Chem, 1994, 269, 6051-7.

Tanti J.F., Gremeaux T., Grillo S., Calleja V., Klippel A., Williams L.T., Van Obberghen E., Le Marchand-Brustel Y.

Overexpression of a constitutively active form of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to promote Glut 4 translocation in adipocytes.

J Biol Chem, 1996, 271, 25227-32.

Tanti J.F., Grillo S., Gremeaux T., Coffe P.J., Van Obberghen E., Le Marchand-Brustel Y.

Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology*, 1997, 138, 2005-10.

Taskinen M.R. and Nikkila E.A.

Effect of acute vigorous exercise on lipoprotein lipase activity of adipose tissue and skeletal muscle in physically active men.

Artery, 1980, 6, 471-83.

Taskinen M.R. and Kuusi T.

High density lipoproteins in postprandial lipemia. Relation to sex and lipoprotein lipase activity.

Atherosclerosis, 1986, 59, 121-30.

Taskinen M.R.

Insulin resistance and lipoprotein metabolism.

Curr Opin Lipidol, 1995, 6, 153-60.

Tchernof A., Poehlman E.T., Despres J.P.

Body fat distribution, the menopause transition, and hormone replacement therapy.

Diabetes Metab, 2000, 26, 12-20.

Thompson C.H., Sanderson A.L., Sandeman D., Stein C., Borthwick A., Radda G.K., Phillips D.I.

Fetal growth and insulin resistance in adult life: role of skeletal muscle morphology.

Clin Sci (Lond), 1997, 92, 291-6.

Tilly-Kiesi M., Knudsen P., Groop L., Taskinen M.R.

Hyperinsulinemia and insulin resistance are associated with multiple abnormalities of lipoprotein subclasses in glucose-tolerant relatives of NIDDM patients. Botnia Study Group.

J Lipid Res, 1996, 37, 1569-78.

Tsigos C., Kyrou I., Chala E., Tsapogas P., Stavridis J.C., Raptis S.A., Katsilambros N.

Circulating tumor necrosis factor alpha concentrations are higher in abdominal versus peripheral obesity.

Metabolism, 1999, 48, 1332-5.

Turinsky J., O'Sullivan D.M., Bayly B.P.

1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo.

J Biol Chem, 1990, 265, 16880-5.

Uchida T.

Stimulation of phospholipid synthesis in HeLa cells by epidermal growth factor and insulin: activation of choline kinase and glycerophosphate acyltransferase.

Biochim Biophys Acta, 1996, 1304, 89-104.

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.

Urban S., Zieseniss S., Werder M., Hauser H., Budzinski R., Engelmann B.

Scavenger receptor BI transfers major lipoprotein-associated phospholipids into the cells.

J Biol Chem, 2000, 275, 33409-15.

Vague J.

Sexual differentiation, a factor affecting the forms of obesity.

Presse Med, 1947, 30, 339-340.

Valet P., Saulnier-Blache J.S.

Metabolic and trophic role of catecholamines in the development of white adipose tissue.

Ann Endocrinol (Paris), 1999, 60, 167-74.

Valve R., Sivenius K., Miettinen R., Pihlajamaki J., Rissanen A., Deeb S.S., Auwerx J., Uusitupa M., Laakso M.

Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor- gamma gene are associated with severe overweight among obese women.

J. Clin Endocrinol Metab, 1999, 84, 3708-12.

Van de Werve G., Zaninetti D., Lang U., Vallotton M.B., Jeanrenaud B.

Identification of a major defect in insulin-resistant tissues of genetically obese (fa/fa) rats. Impaired protein kinase C.

Diabetes, 1987, 36, 310-4.

Van der Westhuyzen D.R., Stein M.L., Henderson H.E., Marais A.D., Fourie A.M., Coetzee G.A.

Deletion of two growth-factor repeats from the low-density-lipoprotein receptor accelerates its degradation.

Biochem J, 1991, 277, 677-82.

Van Dijck P.W.

Negatively charged phospholipids and their position in the cholesterol affinity sequence.

Biochim Biophys Acta, 1979, 555, 89-101.

Vasselli J.R., Fiene J.A., Maggio C.A.

Relationship of adipocyte size to hyperphagia in developing male obese Zucker rats.

Am J Physiol, 1992, 262, R33-8.

Verges B.

Insulin sensitivity and lipids.

Diabetes Metab, 2001, 27, 223-7.

Vessby B., Tengblad S., Lithell H.

Insulin sensitivity is related to the fatty acid composition of serum lipids and skeletal muscle phospholipids in 70-year-old men.

Diabetologia, 1994, 37, 1044-50.

Vgontzas A.N., Papanicolaou D.A., Bixler E.O., Hopper K., Lotsikas A., Lin H.M., Kales A., Chrousos G.P.

Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance, and hypercytokinemia.

J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85, 1151-8.

Vidgren H.M., Agren J.J., Valve R.S., Karhunen L.J., Rissanen A.M., Uusitupa M.I.

The effect of orlistat on the fatty acid composition of serum lipid fractions in obese subjects.

Clin Pharmacol Ther, 1999, 66, 315-22.

Walston J., Silver K., Bogardus C., Knowler W.C., Celi F.S., Austin S., Manning B., Strosberg A.D., Stern M.P., Raben N., et al.

Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta 3-adrenergic-receptor gene.

N Engl J Med, 1995, 333, 343-7.

Wang N., Silver D.L., Thiele C., Tall A.R.

ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein.

J Biol Chem, 2001, 276, 23742-7.

Wang Q., Somwar R., Bilan P.J., Liu Z., Jin J., Woodgett J.R., Klip A.

Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts.

Mol Cell Biol, 1999, 19, 4008-18.

Wang X., Sato R., Brown M.S., Hua X., Goldstein J.L.

SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis.

Cell, 1994, 77, 53-62.

Waters S.B., Chen D., Kao A.W., Okada S., Holt K.H., Pessin J.E.

Insulin and epidermal growth factor receptors regulate distinct pools of Grb2-SOS in the control of Ras activation.

J Biol Chem, 1996, 271, 18224-30.

Waters, S.B. and Pessin J.E.

Insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS 1 and IRS 2): what a tangle web we weave.

Trends in Cell Biology, 1996, 6, 1-4.

Watson R.T., Shigematsu S., Chiang S.H., Mora S., Kanzaki M., Macara I.G., Saltiel A.R., Pessin J.E.

Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation.

J Cell Biol, 2001, 154, 829-40.

Way J.M., Gorgun C.Z., Tong Q., Uysal K.T., Brown K.K., Harrington W.W., Oliver W.R Jr., Willson T.M., Kliewer S.A., Hotamisligil G.S.

Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists.

J Biol Chem, 2001, 276, 25651-3.

Weinstock R.S., Dai H., Wadden T.A.

Diet and exercise in the treatment of obesity: effects of 3 interventions on insulin resistance. *Arch Intern Med*, 1998, 158, 2477-83.

Welsh G.I., Foulstone E.J., Young S.W., Tavare J.M., Proud C.G.

Wortmannin inhibits the effects of insulin and serum on the activities of glycogen synthase kinase-3 and mitogen-activated protein kinase.

Biochem J, 1994, 303, 15-20.

Weyer C., Funahashi T., Tanaka S., Hotta K., Matsuzawa Y., Pratley R.E., Tataranni P.A.

Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia.

J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86, 1930-5 .

Weyer C., Yudkin J.S., Stehouwer C.D., Schalkwijk C.G., Pratley R.E., Tataranni P.A.

Humoral markers of inflammation and endothelial dysfunction in relation to adiposity and in vivo insulin action in Pima Indians.

Atherosclerosis, 2002, 161, 233-42.

White M.F., Livingston J.N., Backer J.M., Lauris V., Dull T.J., Ullrich A., Kahn C.R.

Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity.

Cell, 1988, 54, 641-9.

White M.F.

The insulin signalling system and the IRS proteins.

Diabetologia, 1997, 40 Suppl 2, S2-17.

White M. F.

The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action.

Mol Cell Biochem, 1998, 182, 3-11.

WHO (World Health Organization).

Preventing and managing the global epidemic. Report of WHO consultation on Obesity. Geneva, 3-5 June 1997, World Health Organization, Geneva, 1998.

Widen E., Lehto M., Kanninen T., Walston J., Shuldiner A.R., Groop L.C.

Association of a polymorphism in the beta 3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns.

N Engl J Med, 1995, 333, 348-51.

Wiernsperger N.

Vascular defects in the aetiology of peripheral insulin resistance in diabetes. A critical review of hypotheses and facts.

Diabetes Metab Rev, 1994, 10, 287-307.

Withers D.J., Gutierrez J.S., Towery H., Burks D.J., Ren J.M., Previs S., Zhang Y., Bernal D., Pons S., Shulman G.I., Bonner-Weir S., White M.F.

Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice.
Nature, 1998, 391, 900-4.

Wootan M.G., Bernlohr D.A., Storch J.

Mechanism of fluorescent fatty acid transfer from adipocyte fatty acid binding protein to membranes.
Biochemistry, 1993, 32, 8622-7.

Wymann M.P., Bulgarelli-Leva G., Zvelebil M.J., Pirola L., Vanhaesebroeck B., Waterfield M.D., Panayotou G.

Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction.
Mol Cell Biol, 1996, 16, 1722-33.

Xing H., Northrop J.P., Grove J.R., Kilpatrick K.E., Su J.L., Ringold G.M.

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.

Xu H.E., Lambert M.H., Montana V.G., Parks D.J., Blanchard S.G., Brown P.J., Sternbach D.D., Lehmann J.M., Wisely G.B., Willson T.M., Kliewer S.A., Milburn M.V.

Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors.
Mol Cell, 1999, 3, 397-403.

Yang G., Li L., Dang H.

Alteration of fatty acid components of erythrocyte membrane and insulin resistance in diabetic patients.
Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 1998, 78, 269-71.

Yang-Feng T. L., Francke U., Ullrich A.

Gene for human insulin receptor: localization to site on chromosome 19 involved in pre-B-cell leukemia.
Science, 228, 728-731, 1985.

Yeaman S.J., Armstrong J.L., Bonavaud S.M., Poinasamy D., Pickersgill L., Halse R.

Regulation of glycogen synthesis in human muscle cells.
Biochem Soc Trans, 2001, 29, 537-41.

Yegutkin G.G., Sambursky S.S., Zhitkovitch A.V., Gatsko G.G.

Evaluation of age-related changes of physicochemical properties and functional activity of rat adipose plasma membranes and their possible relationship.
Mech Ageing Dev, 1991, 59, 1-16.

Yenush L. and White M.F.

The IRS-signalling system during insulin and cytokine action.
Bioessays, 1997, 19, 491-500.

Young S.G., and Fielding C.J.

The ABCs of cholesterol efflux.
Nat Genet, 1999,22, 316-8.

Young-Hyman D., Schlundt D.G., Herman L., De Luca F., Counts D.

Evaluation of the insulin resistance syndrome in 5- to 10-year-old overweight/obese African-American children.
Diabetes Care, 2001, 24, 1359-64.

Yu K., Bayona W., Kallen C.B., Harding H.P., Ravera C.P., McMahon G., Brown M., Lazar M.A.

Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids.
J Biol Chem, 1995, 270, 23975-83.

Zammit V.A., Waterman I.J., Topping D., McKay G.

Insulin stimulation of hepatic triacylglycerol secretion and the etiology of insulin resistance.
J Nutr, 2001, 131, 2074-7.

Zechner R., Moser R., Newman T.C., Fried S.K., Breslow J.L.

Apolipoprotein E gene expression in mouse 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue and its regulation by differentiation and lipid content.
J Biol Chem, 1991, 266, 10583-8.

(a) 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.

(b) 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, 2000, 279, E736-43.

Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J., Korsmeyer S.J.

Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L).
Cell, 1996, 87, 619-28.

Zhang J., Ou J., Bashmakov Y., Horton J.D., Brown M.S., Goldstein J.L.

Insulin inhibits transcription of IRS-2 gene in rat liver through an insulin response element (IRE) that resembles IREs of other insulin-repressed genes.
Proc Natl Acad Sci U.S.A., 2001, 98, 3756-61.

Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M.

Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.
Nature, 1994, 372, 425-32.

(a) Ziegler O., Quilliot D., Guerci B., Drouin P.

Macronutrients, fat mass, fatty acid flux and insulin sensitivity.
Diabetes Metab, 2001, 27, 261-70.

(b) Ziegler O., Delbachian I., Poissonet C.M., Vidailhet M., Strosberg A.D., Méjean L.
Effets synergiques de 4 polymorphismes génétiques fréquents sur la masse grasse. L'étude GénOLor 1.
Nutrition-Obésité 2001. AFERO - 29-30 novembre 2001 Paris. Poster

Zlatkis A., and Zak B.
Study of a new cholesterol reagent.
Anal Biochem, 1969, 29, 143-8.

Zorzano A., Fandos C., Palacin M.
Role of plasma membrane transporters in muscle metabolism.
Biochem J, 2000, 349, 667-88.

Zwiauwer K. and Widhalm K.
Effect of 2 different reducing diets on the concentration of HDL cholesterol in obese adolescents.
Klin Padiatr, 1987, 199, 392-8.

INCREASE IN MEMBRANE SPHINGOMYELIN : A NOVEL MARKER OF HUMAN METABOLIC SYNDROME

SUMMARY

The hyperinsulinemia, resulting from insulin-resistance (IR) is often associated to obesity. It is one of the components of metabolic syndrome, a risk factor for type 2 diabetes mellitus and cardio-vascular diseases. The mechanisms of IR are not clearly understood. An hypothesis suggests that IR could be related to changes in the structural properties of cell membranes. Previous studies showed a positive relationship between the membrane SM content and hyperinsulinemia. This work examined in detail the SM-IR relationships and attempted to approach the mechanisms. We analyzed the lipid composition of erythrocyte membranes which reflect the composition of an insulin sensitive cell such as adipocyte.

The erythrocyte membrane phospholipid composition was examined in a cross-sectional comparison of non obese subjects, obese adults and children. Insulin resistance markers were positively related with membrane SM contents in the three groups.

In two intervention studies, the phospholipid and fatty acid composition were analyzed in obese subjects before and after a diet and drug (Orlistat)-induced weight loss. At baseline, hyperinsulinemia is related to increased SM and decreased arachidonic acid membrane contents. In both studies, insulin sensitivity and membrane parameters were improved after weight loss in the most insulin resistant subjects. Despite a similar weight loss, hyperinsulinemia and membrane SM did not change in the less insulin resistant obese subjects.

In a preliminary study, the role of lipoprotein-cell exchanges on the IR-induced changes in lipid membrane composition has been investigated. The phospholipid composition of HDL and LDL seems to be of importance.

In conclusion, the increased membrane SM content could be included in the constellation of factors of metabolic syndrome.

Nom : Mr YOUNSI
Prénom : Mohamed

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT

Spécialité : BIOLOGIE CELLULAIRE

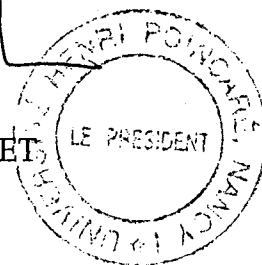
VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

n° 756

Nancy, le 5 décembre 2002

Le Président de l'Université

C. BURLÉ



RESUME

L'hyperinsulinémie, conséquence de l'insulino-résistance (IR), fréquemment associée à l'obésité, constitue un des éléments du syndrome métabolique, facteur de risque pour le diabète de type 2 et les maladies cardio-vasculaires. Les mécanismes de l'IR ne sont pas totalement élucidés. Une hypothèse membranaire suggère que l'IR pourrait être due à des altérations des propriétés structurales des membranes cellulaires. Des travaux antérieurs ont mis en évidence une relation positive entre le contenu membranaire en SM et l'hyperinsulinémie. Dans ce travail, nous avons approfondi l'étude des relations SM-IR et tenté d'en approcher les mécanismes en utilisant la membrane d'hématie dont la composition en SM reflète celle de l'adipocyte.

Dans une étude transversale, les phospholipides de l'hématie ont été déterminés chez des sujets non obèses, des adultes et enfants obèses. Une augmentation de la SM membranaire avec l'IR est observée dans les trois groupes, la SM étant le facteur membranaire le plus significatif expliquant la variance de l'insulinémie.

Dans deux études d'intervention, les phospholipides et acides gras ont été déterminés avant et après perte de poids à la suite d'un régime hypocalorique ou une intervention pharmacologique (Orlistat). A l'état basal, l'hyperinsulinémie est associée à un excès de SM et à un déficit en acide arachidonique. Dans les deux études, l'insulinémie diminue et les paramètres membranaires se normalisent chez les sujets les plus insulino-résistants. Malgré une perte de poids identique, l'insulinémie et la SM ne varient pas chez les sujets les moins insulino-résistants.

Dans une étude préliminaire, le rôle éventuel des échanges lipoprotéines-cellules sur les altérations de la composition lipidique membranaire associées à l'IR a été abordé. La composition en phospholipides des HDL et LDL semble importante.

En conclusion, un excès de SM membranaire pourrait être un élément dans la constellation de facteurs constituant le syndrome métabolique.

DISCIPLINE : Génie Biologique et Médical

MOTS-CLES :

Hyperinsulinémie, obésité, composition lipidique membranaire, sphingomyéline, acide arachidonique, régime hypocalorique, Orlistat, fluidité membranaire.

Adresse du Laboratoire :

EA 3446 - Proliférateurs de Peroxysomes
Equipe : Nutrition et Maladies Métaboliques
Faculté de Médecine
Avenue de la Forêt de Haye
54505 – Vandoeuvre les Nancy