



HAL
open science

Obésité et insulino-résistance : étude longitudinale avec un traceur du transport du glucose, le [125I]-6-déoxy-6-iodo-D-glucose

Marion Henri

► **To cite this version:**

Marion Henri. Obésité et insulino-résistance : étude longitudinale avec un traceur du transport du glucose, le [125I]-6-déoxy-6-iodo-D-glucose. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENS028 . tel-00728180

HAL Id: tel-00728180

<https://theses.hal.science/tel-00728180>

Submitted on 5 Sep 2012

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie, Instrumentation, Signal et Imagerie
pour la Médecine, la Biologie et l'Environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Marion HENRI

Thèse dirigée par **Catherine GHEZZI** et
codirigée par **Pascale PERRET**

préparée au sein du **Laboratoire Radiopharmaceutiques
Biocliniques – INSERM U1039**
dans **l'École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition
et l'Environnement**

Obésité et insulino-résistance : étude longitudinale avec un traceur du transport du glucose, le [¹²⁵I]-6-déoxy-6-iodo-D- glucose

Thèse soutenue publiquement le **18 novembre 2011**,
devant le jury composé de :

Mme Frédérique FROUIN

Chargée de recherches INSERM, Paris, Membre

Mme Catherine GHEZZI

Professeur à l'UJF, Grenoble, Membre

M. Jacques GROBER

Maître de Conférences à AgroSup, Dijon, Rapporteur

M. Bernard LACOUR

PU-PH, Hôpital Necker, Paris, Rapporteur

Mme Pascale PERRET

Chargée de recherches INSERM, Grenoble, Membre

M. Gérald VANZETTO

PU-PH, CHU, Grenoble, Membre



Je tiens tout d'abord à remercier Daniel Fagret de m'avoir accueilli au sein du laboratoire « Radiopharmaceutiques Biocliniques » et permis d'y réaliser ma thèse ainsi que Catherine Ghezzi et Pascale Perret d'avoir accepté d'encadrer ce travail.

Je remercie vivement Bernard Lacourt, Jacques Grober, Frédérique Frouin et Gérald Vanzetto d'avoir accepté de lire et d'évaluer cette thèse. Je remercie particulièrement Frédérique Frouin, du Laboratoire d'Imagerie Fonctionnelle, qui nous a permis d'envisager l'utilisation de l'Analyse Factorielle des Séquences d'Images Médicales pour traiter nos données expérimentales.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire « Radiopharmaceutiques Biocliniques » avec lesquels j'ai travaillé durant ces années de thèse. Merci pour votre accueil, votre aide de près ou de loin, et les bons moments partagés. Je n'oublie pas ceux qui sont partis du labo entre temps !

Je remercie chaleureusement ceux qui m'ont aidée dans les manipes : l'équipe des radiochimistes, Jean-Paul Mathieu, Mitra Ahmadi et Sandrine Martin pour la préparation du 6DIG ; René Bontron, pour l'attention et les soins portés aux animaux; Lotfi Slimani pour son aide sur la partie mathématique de ce travail; Anne-Sophie Gauchez et toutes les techniciennes du Département de Biologie Intégrée de l'hôpital pour leur accueil dans leurs locaux. Un grand merci à Julien Vollaire qui m'a appris à réaliser les expériences 6DIG quand j'étais une « petiotte » stagiaire. Enfin, un immense merci à Elsa Cleysac et Danièle Marti-Battle, avec qui j'ai passé de longues heures (presque toutes...) en salle de manipe : j'espère que vous garderez un aussi bon souvenir que moi de ce travail ensemble.

Ces années de thèse m'ont également permis de découvrir l'enseignement à l'université en tant que monitrice. Merci à Catherine de m'avoir fait confiance et de m'avoir confié des cours diversifiés tout au long de ces trois années, en me laissant beaucoup de liberté. Le monitorat a aussi été l'occasion de rencontrer des doctorants de toutes disciplines et de découvrir des sujets de recherches passionnants : j'ai apprécié ces échanges lors des formations.

Merci à mes amis, du labo ou d'ailleurs, pour les bons moments passés ensemble et pour les efforts que vous avez faits pour me distraire quand j'avais le nez dans la thèse ! Vous vous reconnaissez.

Merci enfin à ma famille pour les nombreuses discussions scientifiques –qui ont dû former mon esprit depuis mon plus jeune âge-, l'aide technique et les relectures mais surtout, merci pour vos encouragements et votre soutien sans faille : merci à mon père, ma mère et Pascal, à mon frère Etienne. Merci Sylvain pour ta patience et ta présence au quotidien à mes côtés.

LISTE DES FIGURES.....	6
ABREVIATIONS FREQUEMMENT UTILISEES	8
INTRODUCTION	9
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	11
I. LE SYNDROME METABOLIQUE	11
1. Définitions.....	11
1.1. Chez l'adulte.....	11
1.2. Chez l'enfant.....	13
2. Prévalence du syndrome métabolique.....	13
2.1. Chez l'adulte.....	13
2.2. Chez l'enfant.....	14
II. L'OBESITE	15
1. Définition	15
2. Prévalence de l'obésité	16
2.1. Dans le monde	16
2.2. En France	17
3. Estimation de l'obésité.....	18
4. L'obésité, conséquence d'une dérégulation de la balance énergétique	19
5. Causes de l'obésité.....	20
5.1. Facteurs génétiques	20
5.2. Evolution des modes de vie	22
5.3. Environnement périnatal.....	23
5.4. Autres facteurs.....	25
6. Pathologies associées à l'obésité.....	25
III. L'INSULINO-RESISTANCE	27
1. L'insuline	27
1.1. Structure de l'insuline	27
1.2. Synthèse de l'insuline	27
1.3. Facteurs régulant la production d'insuline.....	29
1.4. Sécrétion d'insuline.....	30
1.4.1 Contrôle de la sécrétion.....	30
1.4.2 Mécanisme de la sécrétion	31
1.5. Récepteur et signalisation	31
1.5.1 Récepteur à l'insuline.....	31
1.5.2 Signalisation de l'insuline	32
1.6. Implication de l'insuline dans le métabolisme	34
1.6.1 Action de l'insuline sur le transport du glucose	34
1.6.2 Action de l'insuline sur le métabolisme glucidique	34
1.6.3 Action de l'insuline sur le métabolisme lipidique	35
1.6.4 Autres actions de l'insuline.....	35
1.7. Actions de l'insuline sur le système cardiovasculaire	35
2. L'insulino-résistance.....	36
2.1. Prévalence.....	36
2.2. Définition	36
2.3. Insulino-résistance musculaire	37
2.3.1 Métabolisme du glucose.....	37
2.3.2 Métabolisme des lipides	38
2.3.3 Altération de la fonction mitochondriale	39
2.4. Insulino-résistance cardiaque	39
2.5. Mécanismes de l'insulino-résistance.....	41
2.5.1 Altération de la signalisation insulinique.....	41
2.5.2 Rôle des acides gras dans la résistance à l'insuline.....	42
3. Le diabète de type 2.....	42
IV. LE TISSU ADIPEUX	44
1. Généralités.....	44
2. Développement du tissu adipeux blanc	46
2.1. Mécanismes généraux de l'adipogenèse.....	46
2.2. Développement du tissu adipeux dans l'obésité : hypertrophie ou hyperplasie ?.....	48
3. Métabolisme lipidique au sein du tissu adipeux blanc.....	49
3.1. Synthèse des triglycérides.....	49
3.1.1 Provenance sanguine des acides gras	49
3.1.2 Lipogenèse <i>de novo</i> dans l'adipocyte.....	51

3.1.3 Mécanismes de synthèse des triglycérides.....	52
3.2. La lipolyse.....	52
3.2.1 Rôle des PPAR dans le métabolisme adipocytaire.....	53
4. <i>Fonction endocrine</i>	53
4.1. Adiponectine.....	53
4.1.1 Structure.....	53
4.1.2 Récepteurs de l'adiponectine.....	54
4.1.3 Action de l'adiponectine.....	55
4.2. Leptine.....	56
4.2.1 Structure et sécrétion.....	56
4.2.2 Récepteurs à la leptine et signalisation intracellulaire.....	56
4.2.3 Rôle de la leptine dans la régulation de l'homéostasie énergétique.....	57
4.2.4 Rôle de la leptine sur le métabolisme lipidique.....	58
4.2.5 La leptine dans l'obésité et l'insulino-résistance.....	59
4.2.6 Résistance à la leptine.....	60
4.3. Autres molécules sécrétées.....	60
V. INFLAMMATION DU TISSU ADIPEUX, LIEN ENTRE L'INSULINO-RESISTANCE ET L'OBESITE.....	64
1. <i>Dérégulation de la production d'adipokines</i>	64
2. <i>Infiltration macrophagique</i>	66
3. <i>Rôle des cellules endothéliales</i>	67
4. <i>Rôle de l'hypoxie</i>	68
5. <i>Implication de la flore intestinale</i>	68
VI. MODELES ANIMAUX POUR L'ETUDE DE L'OBESITE ET DE L'INSULINO-RESISTANCE.....	70
1. <i>Modèles génétiques</i>	70
1.1. Souris ob/ob.....	70
1.2. Souris db/db.....	71
1.3. Rats Zucker (fa/fa) et Diabetic Zucker fatty (ZDF).....	71
1.4. Autres modèles d'obésité génétique.....	72
2. <i>Induction du Syndrome métabolique</i>	72
2.1. Agents chimiques.....	72
2.2. Régimes alimentaires.....	73
2.2.1 Régimes enrichis en glucides.....	73
2.2.2 Régimes enrichis en lipides.....	74
2.2.3 Régimes enrichis en graisses et en sucres.....	75
2.2.4 Résistance à l'obésité.....	77
VII. METHODES DE MESURE DE L'INSULINO-RESISTANCE.....	79
1. <i>Clamp euglycémique hyperinsulinémique</i>	79
2. <i>Test de tolérance au glucose</i>	80
3. <i>Index HOMA</i>	80
4. <i>Autres tests</i>	81
VIII. TRACEURS DU TRANSPORT DU GLUCOSE.....	82
1. <i>La SRMN</i>	82
2. <i>La technique de dilution des multiples traceurs</i>	82
3. <i>Le 2DG</i>	83
4. <i>La tomographie par émission de positons</i>	83
5. <i>Le 6-déoxy-6-iodo-D-glucose (6DIG)</i>	85
5.1. Mesure de l'insulino-résistance cardiaque avec le 6DIG.....	86
5.1.1 Faisabilité de la méthode <i>in vivo</i>	86
5.1.2 Validation de la méthode par imagerie scintigraphique.....	87
5.2. Mesure de l'insulino-résistance dans le muscle squelettique avec le 6DIG.....	89
TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	91
IERE PARTIE : MISE EN PLACE DU MODELE EXPERIMENTAL.....	91
I. MATERIEL ET METHODES.....	91
1. <i>Animaux et régimes alimentaires</i>	91
2. <i>Protocole expérimental</i>	93
3. <i>Expression des résultats et analyses statistiques</i>	94
II. RESULTATS.....	95
1. <i>Première étude</i>	95
2. <i>Seconde étude</i>	96
3. <i>Troisième étude</i>	97
III. DISCUSSION.....	99

2^{EME} PARTIE : ETUDE DU DEVELOPPEMENT DE L'OBESITE ET DE L'INSULINO-RESISTANCE AVEC LE 6DIG	104
I. MATERIEL ET METHODES	104
1. <i>Matériel</i>	104
1.1. Animaux et régimes alimentaires	104
1.2. Le 6DIG	104
1.3. Acquisition de la radioactivité	106
2. <i>Méthodes</i>	107
2.1. Animaux et régimes	107
2.2. Prélèvements et analyses biologiques	107
2.2.1 Prélèvements sanguins	107
2.2.2 Dosages plasmatiques	108
2.2.3 Extraction et dosage des triglycérides ectopiques	109
2.2.3.1 Extraction des triglycérides intramusculaires	109
2.2.3.2 Extraction des triglycérides hépatiques	109
2.2.3.3 Méthode de dosage des triglycérides	109
2.3. Mesure de l'insulino-résistance	110
2.3.1 Protocole général	110
2.3.2 Préparation des animaux	111
2.3.3 Protocole d'acquisition de la radioactivité	112
2.3.4 Analyse des résultats	113
2.3.4.1 Analyse des cinétiques cardiaques du 6DIG	113
2.3.4.2 Analyse des cinétiques musculaires du 6DIG	114
2.4. Expression des résultats et analyses statistiques	115
II. RESULTATS	116
1. <i>Effets du régime sur la croissance, la prise alimentaire et la masse adipeuse des animaux</i>	116
2. <i>Effets du régime sur différents paramètres d'intérêt</i>	118
2.1. Glycémie et insulnémie plasmatiques	118
2.2. Cholestérol et triglycérides plasmatiques	119
2.3. Adiponectine et leptine	120
2.4. Triglycérides ectopiques	121
2.5. Evaluation de l'insulino-résistance globale par calcul de l'index HOMA	121
3. <i>Effets des régimes Cafétéria et Lard sur la sensibilité à l'insuline du muscle cardiaque et du muscle squelettique</i>	122
3.1. Mesure de l'insulino-résistance cardiaque avec le 6DIG	122
3.2. Mesure de l'insulino-résistance musculaire avec le 6DIG	123
III. DISCUSSION	124
3^{EME} PARTIE : OPTIMISATION DU TRAITEMENT DES DONNEES	128
I. DETERMINATION DE LA REGION D'INTERET SUR LE MUSCLE CARDIAQUE – UTILISATION DE L'ANALYSE FACTORIELLE DES SEQUENCES D'IMAGES MEDICALES	130
1. <i>Introduction</i>	130
2. <i>Matériel et méthodes</i>	131
2.1. Protocole expérimental	131
2.2. Analyse des images	132
2.2.1 Placement de la ROI après analyse factorielle	132
2.2.2 Placement manuel de la ROI	132
2.3. Etude de reproductibilité inter-observateur	133
3. <i>Résultats</i>	133
3.1. Reproductibilité inter-observateur après placement de la ROI grâce à l'analyse factorielle des séquences d'images médicales	133
3.2. Reproductibilité inter-observateurs après placement manuel de la ROI	135
4. <i>Discussion</i>	136
II. TRAITEMENT DES DONNEES POUR L'ETUDE DE L'INSULINO-RESISTANCE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE	137
1. <i>Contexte</i>	137
2. <i>Matériel et méthodes</i>	139
2.1. Animaux	140
2.2. Préparation des animaux	140
2.3. Acquisition de la radioactivité	140
2.4. Traitement numérique des données	141
2.4.1 Expression des données	141
2.4.2 Modélisation mathématique	141
2.4.3 Extrapolation des données	142
3. <i>Résultats</i>	142

3.1. Extrapolation des données musculaires entre 20 et 90 minutes à partir des cinétiques mesurées pendant 90 minutes.....	142
3.2. Extrapolation des données sanguines entre 20 et 90 minutes à partir des cinétiques mesurées, par prélèvements de sang, pendant 90 minutes.....	144
3.3. Calcul des index d'insulino-résistance avec le modèle mathématique.....	145
4. <i>Discussion</i>	146
III. ESTIMATION DE LA CINETIQUE SANGUINE A PARTIR DE LA CINETIQUE HEPATIQUE DU TRACEUR.....	147
1. <i>Contexte</i>	147
2. <i>Matériel et méthodes</i>	147
2.1. Animaux et matériel.....	147
2.2. Préparation des animaux.....	147
2.3. Protocole d'acquisition de la radioactivité par imagerie.....	148
2.4. Obtention de la cinétique hépatique.....	148
3. <i>Résultats</i>	148
4. <i>Discussion</i>	149
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	150
BIBLIOGRAPHIE.....	151
RESUME.....	169
ABSTRACT.....	169

Liste des figures

Figure 1.	Prévalence du surpoids et de l'obésité dans le monde selon le sexe en 2010.....	16
Figure 2.	Prévalence de l'obésité en 2009 aux Etats-Unis d'Amérique.....	17
Figure 3.	Répartition de la population par niveau d'IMC depuis 1997, hommes et femmes.....	18
Figure 4.	Répartition de la prévalence de l'obésité par tranche d'âge entre 1997 et 2009, hommes et femmes.....	18
Figure 5.	Relation entre la croissance post-natale et l'apparition de l'obésité à l'âge adulte.....	23
Figure 6.	Mécanismes potentiels impliqués dans le développement de l'obésité et du diabète de type 2 en fonction de l'environnement péri-natal.....	24
Figure 7.	Structure de la préproinsuline humaine.....	28
Figure 8.	Synthèse de l'insuline.....	29
Figure 9.	Structure du récepteur à l'insuline.....	32
Figure 10.	Mécanismes de la signalisation à l'insuline.....	33
Figure 11.	Répartition du tissu adipeux chez l'homme.....	44
Figure 12.	Microscopie électronique à balayage de tissu adipeux brun et blanc.....	45
Figure 13.	Structure du tissu adipeux blanc.....	46
Figure 14.	Implication des PPAR γ dans la différenciation adipocytaire.....	47
Figure 15.	Captation des acides gras issus des chylomicrons.....	51
Figure 16.	Différentes formes de l'adiponectine.....	54
Figure 17.	Signalisation à la leptine médiée par le récepteur ObRb.....	57
Figure 18.	Activation croisée entre macrophage et adipocyte.....	67
Figure 19.	Mécanismes potentiels du développement de l'inflammation du tissu adipeux dans l'obésité.....	69
Figure 20.	Modélisation à trois compartiments du transport et du métabolisme du FDG.....	84
Figure 21.	Modélisation à trois compartiments du 3-OMG dans le muscle squelettique.....	85
Figure 22.	Modèle mathématique à trois compartiments pour la mesure de l'insulino-résistance cardiaque avec le 6DIG.....	87
Figure 23.	Modèle mathématique à trois compartiments pour la mesure de l'insulino-résistance musculaire avec le 6DIG.....	89
Figure 24.	Evolution de la masse corporelle des animaux durant E1.....	95
Figure 25.	Tissu adipeux en fin de régime (E1).....	96
Figure 26.	Evolution de la masse corporelle des animaux durant E2.....	96
Figure 27.	Tissu adipeux en fin de régime (E2).....	97
Figure 28.	Evolution de la masse corporelle des animaux durant E3.....	98
Figure 29.	Prise alimentaire des rats.....	98
Figure 30.	Tissu adipeux en fin de régime (E3).....	99
Figure 31.	Le [125 I]-6-déoxy-6-iodo-D-glucose ou 6DIG.....	104
Figure 32.	Stabilité du 6DIG 60 jours après marquage.....	105
Figure 33.	Etude <i>in vivo</i> du métabolisme du 6DIG chez le rat Wistar.....	106
Figure 34.	Gamma-caméra et sonde NaI utilisées pour détecter la radioactivité.....	107
Figure 35.	Répartition des animaux entre les différents groupes expérimentaux.....	107
Figure 36.	Protocole général de l'étude des paramètres sanguins d'intérêt.....	108
Figure 37.	Protocole général de l'étude de l'insulino-résistance.....	111
Figure 38.	Pose du cathéter dans la veine caudale.....	111
Figure 39.	Acquisition de la radioactivité cardiaque et musculaire.....	112
Figure 40.	Protocole de mesure de l'insulino-résistance avec le 6DIG.....	112
Figure 41.	Exemple de cinétiques cardiaques obtenues avec le 6DIG.....	113
Figure 42.	Calcul du descripteur empirique à partir de la cinétique cardiaque par analyse graphique.....	114
Figure 43.	Calcul du descripteur empirique à partir de la cinétique musculaire.....	115
Figure 44.	Evolution de la prise de poids des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard.....	116
Figure 45.	Evolution de la consommation calorique des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard.....	117
Figure 46.	Tissu adipeux en fin de régime.....	118
Figure 47.	Evolution de la glycémie et de l'insulinémie plasmatiques.....	118
Figure 48.	Evolution de la cholestérolémie et de la triglycéridémie plasmatiques.....	119
Figure 49.	Concentrations plasmatiques en adiponectine et en leptine.....	120
Figure 50.	Concentrations en triglycérides hépatique et musculaire.....	121
Figure 51.	Insulino-sensibilité globale des animaux estimée par HOMA.....	122
Figure 52.	Descripteur empirique cardiaque des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard.....	123
Figure 53.	Descripteur empirique musculaire des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard.....	123
Figure 54.	Exemple de scintigraphie obtenue avec le 6DIG chez le rat.....	133
Figure 55.	Résultat de l'analyse factorielle sur des images scintigraphiques obtenues après injection de 6DIG.....	134
Figure 56.	Cinétique de transport du 6DIG en condition basale puis sous insuline dans le muscle squelettique.....	137
Figure 57.	Modèle mathématique à trois compartiments développé pour l'étude du transport du 6DIG dans le muscle squelettique chez le rat <i>in vivo</i>	138
Figure 58.	Exemple de calcul des coefficients de variation des constantes cinétiques du modèle mathématique en fonction du temps.....	139

Figure 59.	Protocole de mesure du transport du 6DIG dans le muscle squelettique en condition basale et en condition insuline.	141
Figure 60.	Extrapolation des cinétiques musculaires.	143
Figure 61.	Extrapolation des cinétiques musculaires après correction de la valeur à 90 minutes.	143
Figure 62.	Extrapolation des cinétiques sanguines obtenues après injection du 6DIG.	144
Figure 63.	Index d'insulino-résistance musculaire.	146
Figure 64.	Comparaison entre une cinétique sanguine réelle et une cinétique obtenue à partir d'une région d'intérêt hépatique.	148

Abréviations fréquemment utilisées

ACC	Acétyl-CoA Carboxylase
AdipoR	Récepteur à l'adiponectine
AMPK	AMP-activated Protein Kinase
AFSIM	Analyse Factorielle des Séquences d'Images Médicales
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-reactive protein
2DG	2-déoxy-D-glucose
6DIG	6-déoxy-6-iodo-D-glucose
DT2	Diabète de Type 2
FDG	[¹⁸ F]-2-fluoro-2-déoxy-D-glucose
GIR	Glucose Infusion Rate
GLUT	Glucose Transporter
HDL	High Density Lipoprotein
HF	High Fat
HFCS	High Fructose Corn Syrup
HOMA	Homeostasis Model Assessment
IDF	International Diabetes Federation
IL-6	Interleukine 6
IR	Insulino-résistance
IRS	Insulin Receptor Substrate
IMC	Indice de Masse Corporelle
LDL	Low Density Lipoprotein
LEP-R	Récepteur à la leptine (ou Ob-R)
LPL	LipoProtéine Lipase
LPS	LipoPolySaccharide
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
OGTT	Oral Glucose Tolerance Test
OLETF	Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty
3-OMG	3-O-méthyl-D-glucose
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ObR-	Récepteur à la leptine
PET	Positron Emission Tomography (ou TEP)
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3'Kinase
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PtdIns	Phosphatidylinositol
SOCS3	Suppressor Of Cytokine Signaling-3
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography (ou TEMP)
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
SRMN	Résonance Magnétique Nucléaire Spectroscopique
TEMP	Tomographie par Emission Mono Photonique (ou SPECT)
TEP	Tomographie par Emission de Positron (ou PET)
TG	Triglyceride
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
ZDF	Zucker Diabetic Fatty

Introduction

L'augmentation de la prévalence de l'obésité dans les pays développés ou en voie de développement est incontestable et préoccupante : selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), cette pathologie a atteint le seuil épidémique et on estime aujourd'hui à près de 500 millions le nombre de personnes en surpoids ou obèses à travers le monde. Parallèlement, le nombre d'individus atteints de diabète de type 2 (DT2) augmente également : en 2002, il était 171 millions. L'obésité et le diabète de type 2 sont étroitement liés puisque 46 % des diabétiques de types 2 sont obèses (Isganaitis, 2005) et près de 90 % sont au moins en surpoids (Haslam, 2005). Ces deux pathologies sont associées à une forte morbidité et à une augmentation du risque cardiovasculaire et elles constituent un réel problème de santé publique.

Le diabète de type 2 associe un défaut de sécrétion d'insuline à une insulino-résistance. Celle-ci se caractérise par un défaut d'action de l'insuline sur ses tissus cibles (muscle squelettique, cœur, tissu adipeux et foie) et conduit à terme à l'apparition d'une hyperglycémie à jeun, premier signe clinique du diabète de type 2. L'insulino-résistance est parfois définie comme un stade pré-diabétique et l'absence de symptômes associés rend son diagnostic difficile. Une nouvelle technique de mesure de l'insulino-résistance a été développée au laboratoire « Radiopharmaceutiques Biocliniques ». Elle repose sur l'utilisation d'un analogue du glucose radiomarké en position 6 par un atome d'iode 123, le [¹²³I]-6-Déoxy-6-Iodo-D-Glucose (6DIG). L'utilisation de cette molécule en imagerie nucléaire permet de mettre en évidence un éventuel défaut de transport du glucose caractéristique de l'insulino-résistance dans deux organes d'intérêt : le muscle cardiaque et le muscle squelettique. Cette technique étant non invasive, elle permet d'envisager la mesure répétée de l'insulino-résistance *in vivo* sur un même animal au cours du temps.

L'association d'une alimentation riche en graisses et/ou en sucres et d'un faible niveau d'activité physique semble être la cause principale du déséquilibre énergétique conduisant au développement de l'obésité et du diabète de type 2. Les mécanismes liant le diabète de type 2 à l'obésité font l'objet de nombreuses recherches et plusieurs études suggèrent que les dérégulations métaboliques provoquées par l'obésité favoriseraient l'apparition de l'insulino-résistance (Guilherme, 2008).

L'objectif de ce travail était de suivre l'évolution de l'insulino-sensibilité et l'éventuelle apparition d'une insulino-résistance dans le muscle cardiaque et le muscle squelettique chez un modèle d'obésité de rat nourri avec des régimes alimentaires induisant l'obésité.

La première partie du travail expérimental a donc consisté à développer un modèle animal d'obésité induite par régime alimentaire.

La seconde partie de ce travail a porté sur l'étude de l'évolution de l'insulino-résistance dans le myocarde et dans le muscle squelettique au cours d'un régime de 3 mois provoquant l'obésité.

Enfin, une troisième partie a été consacrée à l'optimisation du traitement des données obtenues avec le 6DIG.

Revue Bibliographique

I. LE SYNDROME METABOLIQUE

Décrit pour la première fois par Reaven en 1988 sous le nom de « syndrome X » ou « syndrome d'insulino-résistance », le syndrome métabolique est défini comme un ensemble de perturbations métaboliques et cardiovasculaires (Reaven, 1988), dont l'élément central est l'insulino-résistance. Par la suite, le rôle de l'obésité dans le développement de ce syndrome est mis en évidence (Reaven, 1995). Le syndrome métabolique entraîne un risque plus important d'apparition de diabète de type 2 et il est également un facteur de risque de morbi-mortalité cardiovasculaire.

L'alimentation semble jouer un grand rôle dans l'apparition de ce syndrome : le risque de développer un syndrome métabolique est augmenté de 70 % quand plus de 60 % des calories totales sont apportées par les glucides. En outre, les fumeurs ont 1,5 à 1,8 fois plus de chance que les non fumeurs de développer un syndrome métabolique. Enfin, plusieurs études ont montré que la prévalence du syndrome métabolique était moins importante chez les individus ayant suivi des études secondaires et que le risque de syndrome métabolique était augmenté de 50 % chez les femmes dont le revenu annuel du foyer est inférieur à 15 000 dollars en comparaison avec des femmes dont le revenu annuel est supérieur à 25 000 dollars (Park, 2003).

1. Définitions

1.1. Chez l'adulte

Le concept de syndrome métabolique représentant un ensemble de désordres métaboliques est aujourd'hui communément admis. Cependant, il n'existe à l'heure actuelle aucune définition consensuelle de ce syndrome.

Selon l'OMS, le syndrome métabolique est basé sur la présence d'une insulino-résistance, associée à au moins deux des anomalies suivantes : une dyslipidémie, une pression artérielle élevée, une microalbumminurie et une obésité centrale (Alberti, 1998). Dans ce cas, l'insulino-résistance est évaluée sur la base d'une glycémie élevée à jeun, d'une intolérance au glucose ou d'un diabète de type 2 avéré. L'intolérance au glucose est diagnostiquée lorsque la glycémie à jeun est supérieure ou égale à 5,6 mmol.L⁻¹ et inférieure à 7 mmol.L⁻¹, ou lorsque la glycémie est comprise entre 7,8 mmol.L⁻¹ (inclus) et 11,1 mmol.L⁻¹ (exclus) deux heures après une charge en glucose (Stumvoll, 2005).

L'EGIR (European Group for the study of Insulin Resistance) a proposé une définition dont l'élément central est une hyperinsulinémie. Celle-ci doit être associée à au moins deux

des anomalies suivantes : une dyslipidémie, une hypertension, une glycémie à jeun élevée et une obésité centrale.

L'American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) a proposé sa propre définition du syndrome métabolique. Celle-ci présente la particularité d'exclure les patients diabétiques de type 2. En revanche, l'élément principal de cette définition est l'intolérance au glucose. Celle-ci doit être associée à au moins deux des facteurs suivants : un taux élevé de triglycérides, un taux faible de HDL et une hypertension (Bloomgarden, 2003).

Selon l'IDF (International Diabetes Federation), l'élément principal du syndrome métabolique est l'obésité abdominale. Celle-ci doit être évaluée selon les seuils établis pour les différentes ethnies (Europe, Asie, Chine, Japon, Amérique du sud, Amérique centrale, Afrique sub-saharienne et pays méditerranéens). Pour diagnostiquer un syndrome métabolique, elle doit être associée à plus de deux anomalies parmi : une concentration importante de triglycérides plasmatiques, une hyperglycémie à jeun, un taux faible de HDL et une hypertension (Alberti, 2005).

La définition du NCEP :ATPIII (National Cholesterol Education Program : Adult Treatment Panel III) ne considère pas l'insulino-résistance comme l'élément principal du syndrome métabolique, bien que la glycémie à jeun fasse partie des anomalies retenues pour diagnostiquer le syndrome métabolique. Selon cette nouvelle définition, le syndrome métabolique est diagnostiqué quand le patient présente au moins 3 des facteurs suivants : une obésité abdominale, un faible taux de HDL (High density lipoprotein), un taux élevé de triglycérides, une hypertension et une glycémie à jeun élevée (Reaven, 2006).

Enfin, la définition donnée par l'American Heart Association et le National Heart, Lung and Blood Institute (AHA/NHLBI) propose d'établir le diagnostic de syndrome métabolique quand au moins 3 des 5 anomalies suivantes sont présentes chez un individu : obésité abdominale, taux élevé de triglycérides, taux faible de HDL, glycémie à jeun élevée et hypertension.

Si certains facteurs sont donc retrouvés dans plusieurs définitions, les seuils mêmes de ces facteurs varient entre les définitions. Par exemple, les seuils de l'hypertension proposés par le NCEP:ATPIII et l'AACE sont plus bas que ceux indiqués par l'OMS et l'EGIR (Tableau 1).

DEFINITION	Anomalies de la régulation de la glycémie	Hyper-insulinémie	Obésité	HDL-Cholestérol	Triglycérides plasmatiques	Pression Artérielle	Micro-albuminurie	Diagnostic
OMS	Glycémie à jeun élevée ou intolérance au glucose ou IR ou DT2		taille/hanche >0,90 (H) ; > 0,85 (F) ou IMC > 30 kg.m ²		TG plasmatiques > 1,7 mmol.L ⁻¹ ou HDL-Cholestérol < 0,9 mmol.L ⁻¹ (H) ; < 1,0 (F)	140/90 mmHg ou TM	excrétion urinaire > 20 µg.min ⁻¹ ou albumine/créatine > 30 mg.g ⁻¹	Critère principal + au moins 2 autres critères
EGIR	Glycémie à jeun > 6,1 mmol.L ⁻¹	Taux plasmatique supérieur au quartile supérieur pour les sujets non diabétiques (36-110 pM)	Tour de taille > 94 cm (H) ; > 80 cm (F)		TG plasmatiques > 2 mmol.L ⁻¹ ou HDL-Cholestérol < 1,0 mmol.L ⁻¹	140/90 mmHg		Critère principal + au moins 2 autres critères
AACE	intolérance au glucose			< 1 mmol.L ⁻¹ (H) ; < 1,3 mmol.L ⁻¹ (F)	> 1,7 mmol.L ⁻¹	130/85 mmHg		Critère principal + au moins 2 autres critères
IDF	> 5,6 mmol.L ⁻¹ ou DT2		Obésité abdominale	< 1,03 mmol.L ⁻¹ (H) ; < 1,29 mmol.L ⁻¹ (F) ou TM	> 1,7 mmol.L ⁻¹ ou TM	130/85 mmHg ou TM		Critère principal + au moins 2 autres critères
NCEP :ATPIII	> 6,1 mmol.L ⁻¹		Tour de taille > 102 cm (H) ; > 88 cm (F)	< 1,03 mmol.L ⁻¹ (H) ; < 1,29 mmol.L ⁻¹ (F)	> 1,7 mmol.L ⁻¹	130/85 mmHg ou TM		Au moins 3 critères
AHA/NHLBI	> 5,6 mmol.L ⁻¹ ou TM		Tour de taille > 102 cm (H) ; > 88 cm (F)	< 1 mmol.L ⁻¹ (H) ; < 1,3 mmol.L ⁻¹ (F) ou TM	> 1,7 mmol.L ⁻¹ ou TM	130/85 mmHg		Au moins 3 critères

Tableau 1. Différents critères du syndrome métabolique.

DT2 : diabète de type 2 ; F : femmes ; H : hommes ; IMC : indice de masse corporelle ; TM : traitement médicamenteux. OMS : Organisation Mondiale de la Santé ; EGIR : European Group for the study of Insulin Resistance ; AACE : American Association of Clinical Endocrinologists ; IDF : International Diabetes Federation ; NCEP:ATPIII : National Cholesterol Education Program : Adult Treatment Panel III ; AHA/NHLBI : American Heart Association et le National Heart, Lung and Blood Institute

1.2. Chez l'enfant

Chez l'enfant, le développement de perturbations métaboliques est associé à un risque de développer un diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires à l'âge adulte (Zimmet, 2007). Cependant, chez l'enfant comme chez l'adulte, il n'existe pas de consensus sur la définition du syndrome métabolique et les critères diffèrent selon les définitions tant au niveau des paramètres pris en compte qu'au niveau des seuils retenus. On retrouve comme éléments principaux le tour de taille ou l'obésité, les taux de triglycérides plasmatiques, de HDL, la pression artérielle, la glycémie. L'IDF a développé une série de critères diagnostiques par tranche d'âges, dont l'obésité est le principal élément.

2. Prévalence du syndrome métabolique

2.1. Chez l'adulte

La prévalence du syndrome métabolique varie selon la définition utilisée pour le diagnostic. Cependant, quelle que soit la définition considérée, la prévalence du syndrome métabolique est en augmentation dans le monde (Grundy, 2008).

Aux Etats-Unis, selon les critères de l'IDF, 39 % de la population était atteinte de syndrome métabolique en 2002 (Ford, 2005). Selon les critères du NCEP :ATPIII, la prévalence du syndrome métabolique était de 34,5 %

En Europe, la prévalence du syndrome métabolique est moins élevée, mais elle est très variable selon les pays : elle atteint 24 % au Portugal contre 34 % en Croatie (Grundy, 2008).

En France, deux études permettent d'apprécier la prévalence du syndrome métabolique. L'étude DESIR (Data from Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome) datant de 2003 a été menée sur des sujets âgés de 30 à 65 ans, sur la base des critères NCEP. Elle a montré une prévalence du syndrome métabolique de 17 % chez les hommes et 10 % chez les femmes (Balkau, 2003). Une seconde étude, menée par l'Institut inter Régional de la Santé (IRSA) entre 2002 et 2004, permet de comparer les prévalences obtenues avec les différentes définitions du syndrome métabolique (Tableau 2) (Balkau, 2007).

	Critères NCEP :ATPIII	Critères IDF	Critères AHA/NHBLI
Femmes	9 %	17 %	14 %
Hommes	10 %	21 %	18 %

Tableau 2. Prévalence du syndrome métabolique en France entre 2002 et 2004 suivant différents critères diagnostiques.

Etude réalisée par l'Institut inter Régional de la Santé (IRSA) auprès de 19126 hommes et 19874 femmes de 20 à 74 ans (D'après Balkau, 2008).

2.2. Chez l'enfant

Une étude réalisée entre 1999 et 2002 a permis d'estimer la prévalence du syndrome métabolique chez l'enfant américain entre 2 et 9,4 %. Chez l'enfant obèse, celle-ci est estimée entre 12,4 et 44,2 % (Cook, 2008). Une autre étude a montré que la prévalence du syndrome métabolique augmente avec la sévérité de l'obésité : elle est de 38,7 % chez les enfants atteints d'obésité modérée et de 49,7 % en cas d'obésité sévère (Weiss, 2004).

Bien qu'il existe plusieurs définitions du **syndrome métabolique**, la plupart d'entre elles tiennent compte de **l'obésité abdominale et de l'insulino-résistance**. En France, selon les critères considérés, la prévalence du syndrome métabolique était estimée entre 10 % et 20 % au début des années 2000. Le nombre de personnes atteintes de ce syndrome devrait en outre augmenter de façon importante dans les années à venir.

II. L'OBESITE

1. Définition

L'obésité et le surpoids sont définis par l'Organisation Mondiale de la Santé comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé ». Ils peuvent être estimés chez l'adulte par le calcul de l'Indice de Masse Corporelle (IMC) qui correspond au ratio du poids (en kg) par la taille au carré (en m²). Une classification de la masse corporelle en fonction de l'IMC a été établie par l'OMS (Tableau 3) : un individu sera considéré comme obèse si son IMC est supérieur ou égal à 30 kg.m⁻². Il sera en surpoids pour un IMC compris entre 25 et 29,9 kg.m⁻². Cette classification est par ailleurs reliée à des seuils déterminant les risques de développer des maladies associées à l'obésité. Cependant, l'interprétation des seuils de l'IMC associés au risque varie suivant la population concernée. Il a en outre été établi que les risques de développer certaines pathologies augmentent avec l'IMC de manière continue : les seuils définis ne sont pas des paliers réels et même une faible augmentation de l'IMC peut avoir des conséquences sur la santé. Ainsi, le risque de développer des maladies augmente dès l'IMC 22-24, soit la fourchette haute du diagnostic « normal ».

Diagnostic	Indice de Masse Corporelle (kg.m ⁻²)
Maigreur	IMC ≤ 18,5
Normal	18,5 ≤ IMC ≤ 24,9
Surpoids	25 ≤ IMC ≤ 29,9
Obésité modérée	30 ≤ IMC ≤ 34,9
Obésité sévère	35 ≤ IMC ≤ 39,9
Obésité morbide	≥ 40

Tableau 3. Classification internationale de la masse corporelle chez l'adulte en fonction de l'Indice de Masse Corporelle, selon l'OMS.

Le calcul de l'IMC est préconisé au niveau international par l'OMS afin de pouvoir estimer rapidement la corpulence d'un individu. Cependant, cette estimation reste générale et ne rend pas compte de la même façon du risque associé à l'obésité pour chaque type de population. Chez l'enfant, l'évaluation de l'obésité est plus délicate, notamment en raison des variations importantes de corpulence durant la croissance. L'OMS a mis au point des normes de croissance de l'enfant (de 0 à 18 ans) utilisées pour dépister le surpoids et l'obésité, les seuils évoluant en fonction des âges et du sexe.

2. Prévalence de l'obésité

2.1. Dans le monde

Depuis la fin des années 1990, l'obésité a atteint le stade d'épidémie mondiale : l'OMS estimait en 2008 que 1,5 milliard de personnes de plus de 20 ans étaient en surpoids, parmi lesquelles près de 200 millions d'hommes et 300 millions de femmes étaient obèses (Figure 1). En 2010, le surpoids concernait près de 43 millions d'enfants de moins de cinq ans.

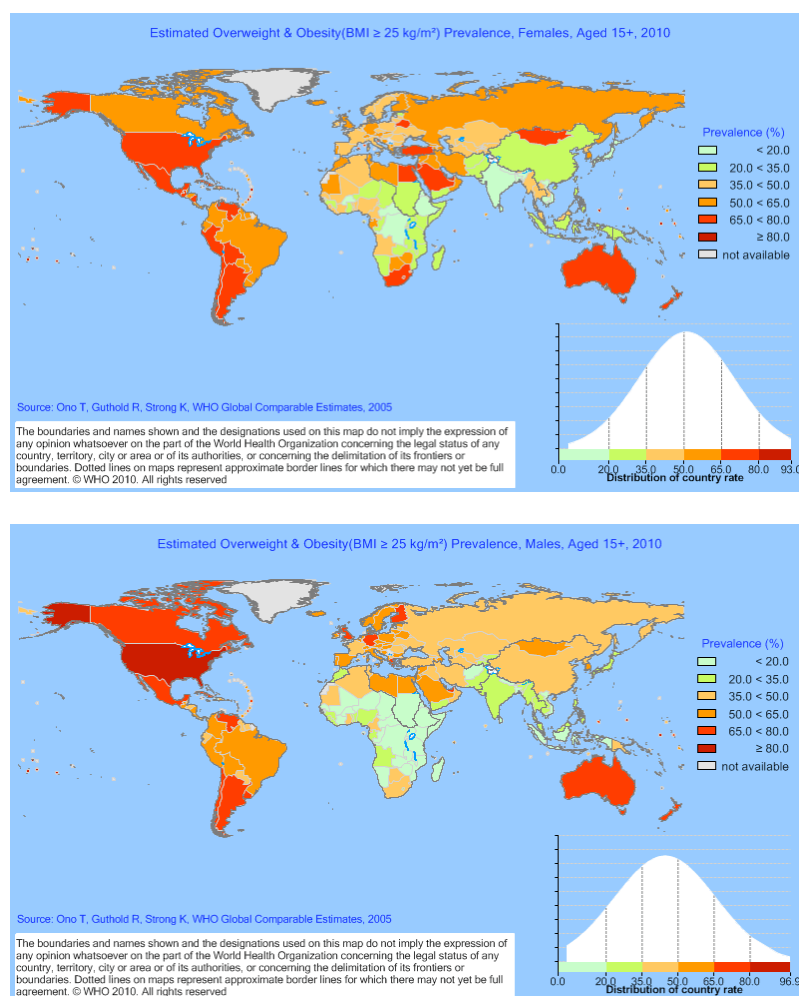


Figure 1. Prévalence du surpoids et de l'obésité dans le monde selon le sexe en 2010.

La prévalence du surpoids et de l'obésité ($IMC > 25 \text{ kg.m}^{-2}$) est détaillée ici par pays chez les femmes (en haut) et chez les hommes (en bas). Le surpoids et l'obésité touchent principalement les pays industrialisés et en voie de développement. Les Etats-Unis d'Amérique, le Canada et l'Australie sont particulièrement concernés (OMS).

Aux Etats-Unis, selon des données publiées par le National Health and Nutrition Examination Survey en 2008, 68 % des adultes entre 20 et 74 ans étaient en surpoids ou obèses (Figure 2). Une autre étude estime que si aucune évolution n'a lieu dans les années à venir, en 2030, près de 86 % de la population pourrait être en surpoids ou obèse et près de

21,1 % d'adultes pourraient être obèses. Le surpoids atteindrait environ 30 % chez l'enfant. (Wang, 2008)

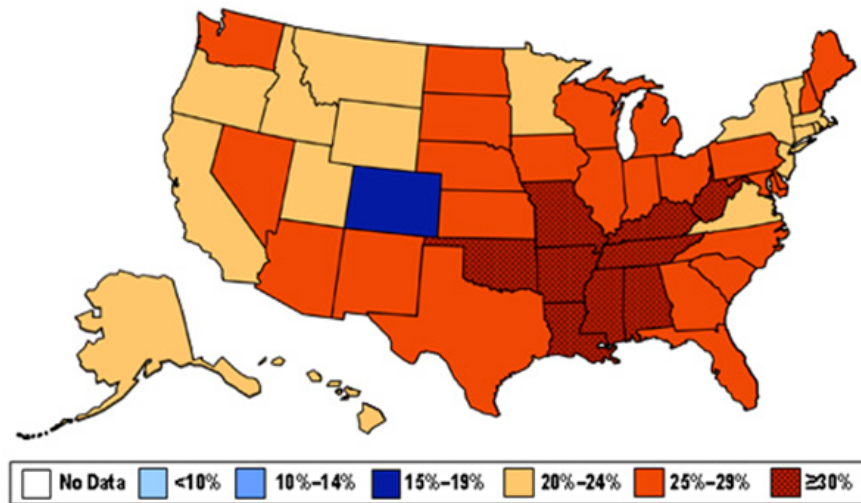


Figure 2. Prévalence de l'obésité en 2009 aux Etats-Unis d'Amérique.

En 2009, la prévalence de l'obésité aux Etats-Unis dépassait les 20 % dans la quasi-totalité des états. Dans certains états du sud-est, plus de 30 % de la population est obèse. (Source : Center for Disease Contrôle)

2.2. En France

En France, deux grandes études ont récemment été réalisées pour estimer la prévalence de l'obésité : une étude effectuée par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) publiée en 2006 et l'enquête ObEpi, réalisée tous les trois ans depuis 1997 par l'Inserm, TNS HEALTHCARE et les laboratoires Roche. L'étude publiée par l'InVS en 2006 montre des chiffres légèrement supérieurs à ceux de l'étude ObEpi : 32,4 % de la population française adulte (18 à 74 ans) était en surpoids et 16,9 % de la population était obèse. Selon l'étude ObEpi 2009, réalisée sur un échantillon représentatif de la population française de 18 ans et plus, 14,5 % de la population est obèse, soit environ 6,5 millions des personnes. La prévalence du surpoids atteint quant à elle 31,9 % soit environ 14 millions de personnes. Il a été montré qu'il existait un biais dans la déclaration du poids et de la taille chez les adultes : une sous-déclaration du poids (écart-moyen de -1,05 kg) et une sur-déclaration (écart-moyen de 0,79 cm) de la taille ont été observées, conduisant à des estimations de prévalences de l'obésité et du surpoids significativement différentes entre les données déclarées et les données mesurées (Julia, 2010). Ceci peut expliquer les différences de prévalence estimées par l'étude ObEpi et l'étude publiée par l'InVS. L'InVS a en effet utilisé des mesures effectuées par des professionnels alors que l'étude ObEpi s'est appuyée sur des mesures communiquées directement par les individus sondés pour calculer l'IMC.

Les différentes études ObEpi (entre 1997 et 2009) permettent d'observer une augmentation progressive de la prévalence de l'obésité en France (Figure 3). L'augmentation relative de l'obésité est estimée à 5,9 % par an depuis 1997.

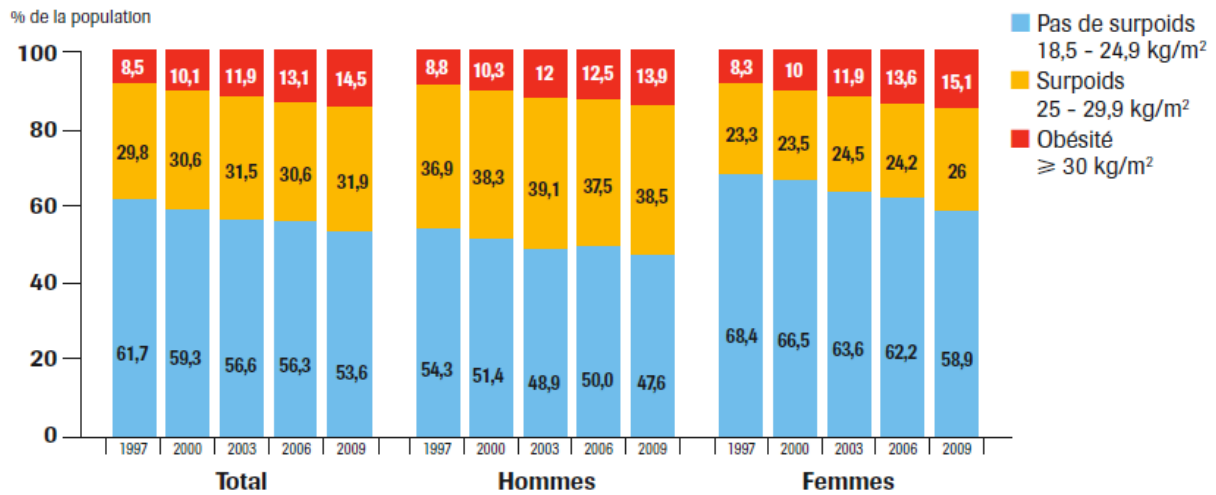


Figure 3. Répartition de la population par niveau d'IMC depuis 1997, hommes et femmes.

Source : Obépi 2009

Le tour de taille des Français est également en constante augmentation depuis 1997, passant en 12 ans de 85,2 cm à 89,9 cm en moyenne (ObEpi, 2009). Enfin, la prévalence de l'obésité augmente, quelle que soit la tranche d'âge considérée (Figure 4) et quelle que soit la région géographique de France métropolitaine considérée.

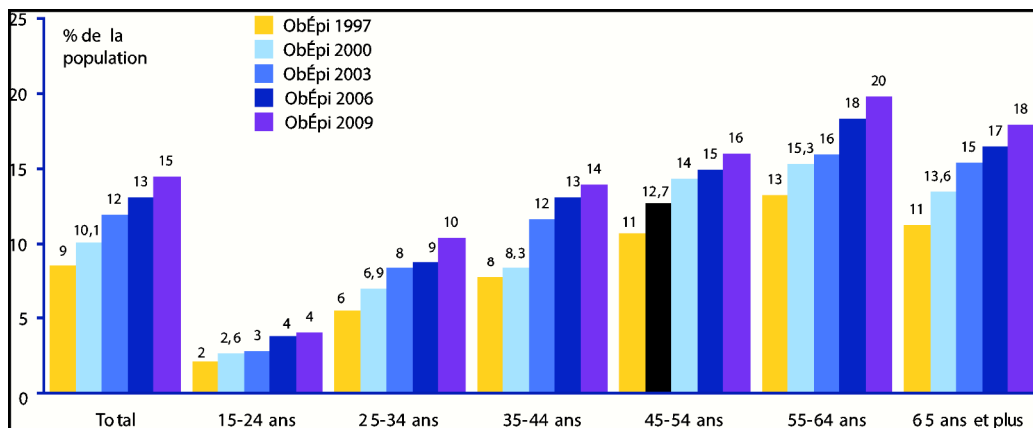


Figure 4. Répartition de la prévalence de l'obésité par tranche d'âge entre 1997 et 2009, hommes et femmes.

Sources : Obépi 2009

3. Estimation de l'obésité

La répartition du tissu adipeux au niveau anatomique a son importance dans les facteurs de risques de l'obésité. On peut en effet distinguer deux principales formes d'obésité : l'obésité dite « androïde », lorsque la graisse est répartie au niveau abdominal, à laquelle sont associés la majorité des facteurs de risques cardiovasculaires et l'obésité « gynoïde », dans laquelle le tissu adipeux est reparti plus uniformément.

Si le calcul de l'IMC représente un moyen rapide d'estimer l'obésité, il ne permet en revanche ni de faire la distinction entre masse grasse et masse maigre, ni de tenir compte de la répartition du tissu adipeux dans l'organisme, notamment au niveau abdominal. Il est donc peu adapté pour les personnes présentant une masse musculaire importante ou les personnes ayant perdu de la masse musculaire.

D'autres mesures anthropométriques permettent d'affiner les estimations obtenues par le calcul de l'IMC. La mesure du tour de taille ou le calcul du rapport tour de taille sur tour de hanche permet d'apprécier l'obésité centrale de l'individu. Un tour de taille supérieur à 102 cm chez les hommes et à 88 cm chez les femmes ou un rapport taille sur hanche supérieur à 0,90 pour les hommes et à 0,85 pour les femmes sont des bons indices d'une obésité abdominale. L'IDF a proposé des seuils spécifiques à chaque ethnie (Europe, Asie du sud, Chine, Japon, Amérique du sud, Amérique centrale, Afrique sub-saharienne, pays méditerranéens et Moyen Orient) afin d'ajuster au mieux les critères diagnostiques de l'obésité lors de la mesure du tour de hanche (Alberti, 2005).

La mesure des plis cutanés permet une évaluation plus précise de la masse grasse. Cette mesure se fait à l'aide d'une pince à pli, au niveau des plis bicipital, tricipital, sous-scapulaire et supra-iliaque. Elle est cependant observateur-dépendant (Ruiz, 1971) et est difficilement applicable lors d'obésité massive. Son utilisation se fait donc généralement pour mesurer l'évolution de l'obésité, lorsque le praticien reste le même d'une mesure sur l'autre.

Les balances à impédancemétrie, basées sur les différences de résistances qu'opposent les différents tissus biologiques au passage d'un courant, permettent également d'estimer la quantité de masse grasse d'un individu.

Certaines techniques d'imagerie peuvent parfois être utilisées, mais elles restent plus compliquées à mettre en œuvre. Le scanner, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) l'absorption bi-photonique à rayons X (DEXA pour Dual Energy X-ray Absorptiometry) sont utilisés pour évaluer la masse grasse avec une meilleure précision.

4. L'obésité, conséquence d'une dérégulation de la balance énergétique

L'obésité est caractérisée par une accumulation anormale ou excessive de tissus adipeux. Elle résulte d'une dérégulation sur le long terme de la balance énergétique et donc d'un bilan positif entre apport énergétique et dépense énergétique.

L'apport énergétique provient de tout aliment solide ou liquide qui va être ingéré, digéré et dont les composants vont être métabolisés par l'organisme. Il dépend donc de la quantité de nourriture ingérée mais aussi de la nature des éléments qui la composent. En effet, la valeur énergétique (qui correspond à la quantité d'énergie extraite de la digestion d'un aliment) est différente selon les macronutriments considérés : la valeur énergétique des glucides et des protéines est de 17 kJ.g^{-1} (4 kcal.g^{-1}) alors que celle des lipides avoisine les 37

kJ.g^{-1} (9 kcal.g^{-1}). Une faible modification de l'apport calorique à long terme peut conduire à une augmentation de la masse corporelle : il a été estimé qu'une balance énergétique excédentaire de 150 kcal par jour induit un changement de 21,4 g par jour soit 1,8 kg par an (Rosenbaum et Leibel, 1988).

La dépense énergétique est la somme des dépenses énergétiques dues au métabolisme de repos, à la thermogénèse (principalement post-prandiale) et à l'activité physique. Le métabolisme de repos correspond à l'énergie dépensée au repos, éveillé, allongé, sans mouvement et dans une atmosphère thermiquement neutre. Il représente l'énergie nécessaire au fonctionnement quasi minimal des organes et des tissus, afin de pouvoir maintenir la circulation sanguine, la respiration et les fonctions rénales. Cette valeur dépend de la masse maigre du sujet et le métabolisme de repos varie donc suivant les individus. La dépense énergétique de repos se détermine à jeun, pour s'affranchir de la thermogénèse post-prandiale. La thermogénèse correspond à la dissipation d'énergie sous forme de chaleur, elle est principalement post-prandiale et elle correspond au coût énergétique résultant d'une prise alimentaire. Elle est le reflet de l'énergie nécessaire à la digestion, au transport, au stockage des nutriments ingérés. Elle dépend de la nature des aliments ingérés et de leur quantité. La thermogénèse liée à un environnement froid a lieu dans le tissu adipeux brun ou dans les muscles (grâce aux frissons musculaires). Enfin, la dépense énergétique liée à l'activité physique est l'élément le plus variable de l'équation, puisqu'elle varie considérablement entre un sujet sédentaire et un sujet actif. En moyenne, elle est estimée à 20 à 30 % de la dépense énergétique totale mais elle peut atteindre 60 % de la dépense énergétique totale chez les grands sportifs (Rising, 1994). La thermogénèse liée à l'activité physique est divisée en deux catégories : la thermogénèse liée à l'activité physique volontaire et la thermogénèse liée à des activités physiques non programmées (non exercise activity thermogenesis). Cette dernière représente entre 15 % et 50 % de la dépense énergétique totale quotidienne, suivant le niveau de sédentarité de l'individu (Levine, 2004).

5. Causes de l'obésité

5.1. Facteurs génétiques

Lors de la découverte du gène de la leptine dans les années 1990, l'hypothèse d'une origine génétique de l'obésité a été largement développée. Une mutation sur le gène de la leptine ou sur celui de son récepteur provoque en effet chez les souris porteuses de ces mutations une obésité constitutive. Chez l'Homme, il est apparu que ces mutations conduisant à une obésité sévère ne concernaient qu'un très faible nombre de familles : seulement 3 mutations, touchant une dizaine de personnes, sont connues pour être impliquées dans une prise de poids excessive (Mazen, 2009). D'autres gènes impliqués dans des formes monogéniques d'obésité ont également été découverts : des mutations sur les gènes codant la

prohormone convertase 1 (impliquée dans la conversion de la proinsuline en insuline) ou la proopiomélanocortine (POMC) conduisent ainsi à une prise alimentaire excessive. La protéine POMC est le précurseur de l' α -melanocyte stimulating hormone, un neuropeptide réduisant la prise alimentaire en agissant sur les récepteurs à la mélanocortine 3 et 4 (MC3R et MC4R) présents dans l'hypothalamus. Les mutations sur le gène codant le récepteur MC4R représentent quant à elles une forme plus fréquente d'obésité monogénique, puisqu'elles concerneraient 1 à 6 % des individus obèses (Bell, 2005). Enfin, quelques cas d'obésité dus à une mutation sur le gène du récepteur à la cholécystokinine, impliqué dans le signal de satiété, ont également été décrits (Panchal, 2011).

Si les formes monogéniques d'obésité sont relativement rares, dans un même environnement, certains individus ont plus de risque que d'autres de devenir obèses. L'hypothèse du « thrifty gene » (ou gène économe), développée par Neel en 1962, sous-entend que les individus porteurs de certains gènes impliqués dans l'accumulation de tissu adipeux possédaient un avantage sélectif lors des famines : ils auraient ainsi été favorisés au cours des siècles. Dans l'environnement actuel, les individus possédant ces gènes seraient fortement prédisposés à l'obésité (Prentice, 2005). Globalement, l'expression de ces gènes tendrait à favoriser le stockage de l'énergie par rapport sa dépense. Bien que fréquemment reprise, cette hypothèse reste néanmoins controversée (Speakman, 2006). Une autre hypothèse est que l'organisme serait « programmé » pour gérer la sous-nutrition et aurait une capacité moindre à gérer la sur-nutrition : les moyens pour limiter la perte de poids seraient plus efficaces que ceux destinés à la limiter (Blundell, 1996). A l'heure actuelle, on connaît plus d'une centaine de gènes liés à l'obésité : ces gènes sont impliqués dans le métabolisme énergétique, le contrôle de la prise alimentaire, le développement du tissu adipeux ou encore les activités mitochondriales.

L'étude des lignées d'animaux prédisposés à l'obésité¹ permet également de mieux comprendre l'importance des facteurs génétiques dans son développement. Chez le rat, le croisement entre des animaux résistants au développement de l'obésité et des animaux prédisposés à l'obésité a montré la transmission du phénotype « prédisposition à l'obésité », associé à l'hyperphagie, l'obésité, l'insulino-résistance, l'hypertension et l'hyperlipidémie en réponse à un régime hypercalorique (Levin, 2010). L'induction de l'obésité chez des femelles sensibles à l'obésité durant la gestation et la lactation conduit au développement de l'obésité chez leur progéniture à l'âge adulte, quel que soit le régime alimentaire de celle-ci. Ceci n'est pas observé chez les animaux nés de mère présentant une résistance à l'obésité, même lorsqu'ils sont nourris avec un régime hypercalorique (Levin, 1998).

En outre, plusieurs études sur des ethnies données suggèrent l'existence de facteurs génétiques prédisposant les individus à l'obésité, lorsque ces individus sont soumis à un mode

¹ Voir paragraphe VI.1

de vie plus sédentaire. Ainsi, la prévalence de l'obésité importante chez les indiens Pima d'Arizona a été reliée par plusieurs études à l'abandon du mode de vie traditionnel (OMS 2003). D'autres études, réalisées sur les populations aborigènes d'Australie, montrent que cette ethnie est sujette à l'obésité abdominale, à l'hypertension et au diabète de type 2, mais que ces facteurs diminuent lorsque les individus reviennent à un mode de vie traditionnel. De même, la reprise d'une alimentation traditionnelle chez des populations autochtones d'Hawaï réduit le risque de développer une obésité et ou des pathologies cardiovasculaires (OMS 2003).

5.2. Evolution des modes de vie

L'évolution des modes de vie concerne principalement l'alimentation et l'exercice physique, deux éléments majeurs de la régulation de la balance énergétique. L'évaluation de ces paramètres est complexe.

Certaines études montrent une augmentation de la consommation calorique entre les années 1970 et les années 2000. Cependant, ces données sont contredites par d'autres publications qui estiment quant à elles qu'aucune évolution significative de la prise énergétique n'a pu être mise en évidence lors de ces dernières décennies. Quelques paramètres ont cependant été suggérés afin d'expliquer l'influence de la nourriture sur l'épidémie d'obésité dans les pays industrialisés, tels qu'une plus grande disponibilité des aliments, une augmentation des repas pris en dehors du foyer (incluant les fast-food), une plus grande consommation de boissons sucrées, une augmentation de la taille des portions alimentaires (Stein, 2004). La nature des produits entrant dans la composition des aliments est également modifiée : la consommation quotidienne de fructose par personne a augmenté de 16 % entre 1986 et 2007 (Tappy, 2010). L'augmentation de la consommation de boissons sucrées semble participer à cette consommation importante de fructose (Bray, 2004).

L'augmentation du nombre de personnes obèses résulte également de la modification de la dépense énergétique. En quelques dizaines d'années, le mode de vie dans les pays industrialisés a changé de façon importante notamment grâce aux avancées technologiques : ainsi, les individus ont moins besoin de marcher ou de bouger pour les activités quotidiennes. En 1996, 60 % des Américains ne pratiquaient pas d'activité physique régulière et 25 % étaient presque totalement sédentaires. En France, en 2008, 50 % des Français pratiquaient une activité physique régulière (Baromètre santé nutrition, INPES) et seulement 42,5 % d'entre eux la pratiquent suffisamment longtemps pour qu'il y ait un effet favorable pour la santé. Une étude a estimé qu'il y a 150 ans, les individus dépensaient en moyenne 2,8 fois plus d'énergie que l'individu moyen occidental à l'heure actuelle, soit une différence de marche de 16 km.jour⁻¹ (Egger, 2001). En outre, le temps moyen passé par les Américains devant la télévision en 2000 avoisinait les 8h par jour, soit près de deux fois plus que 50 ans plus tôt (Brownson, 2005).

Ces informations peuvent paraître caricaturales, mais globalement, les nouveaux modes de vie dans les pays occidentaux montrent une diminution de la dépense énergétique et une augmentation de l'apport énergétique, qui participent au développement de l'obésité.

5.3. Environnement périnatal

L'environnement pré- et post-natal semble jouer un rôle important dans la prédisposition à l'obésité. Des facteurs de stress subis par le fœtus (sous-nutrition, hypoxie, exposition au tabac mais aussi obésité maternelle) peuvent conduire à un faible poids de l'enfant à la naissance. Or, il existe une relation positive entre le faible poids à la naissance et le risque de développer une obésité abdominale à l'âge adulte. Une relation inverse entre la taille à la naissance et le ratio taille sur hanche à l'âge adulte a été mise en évidence (Kuh, 2002). Des observations concordantes ont été faites sur des enfants nés prématurément : la prévalence de l'obésité infantile varie alors selon la catégorie de poids à laquelle ces enfants appartiennent à la naissance (Casey, 2011). Plus encore que le poids à la naissance, c'est la prise de poids rapide après la naissance pour « rattraper » un poids normal qui semble être importante dans la prédisposition à l'obésité (Figure 5).

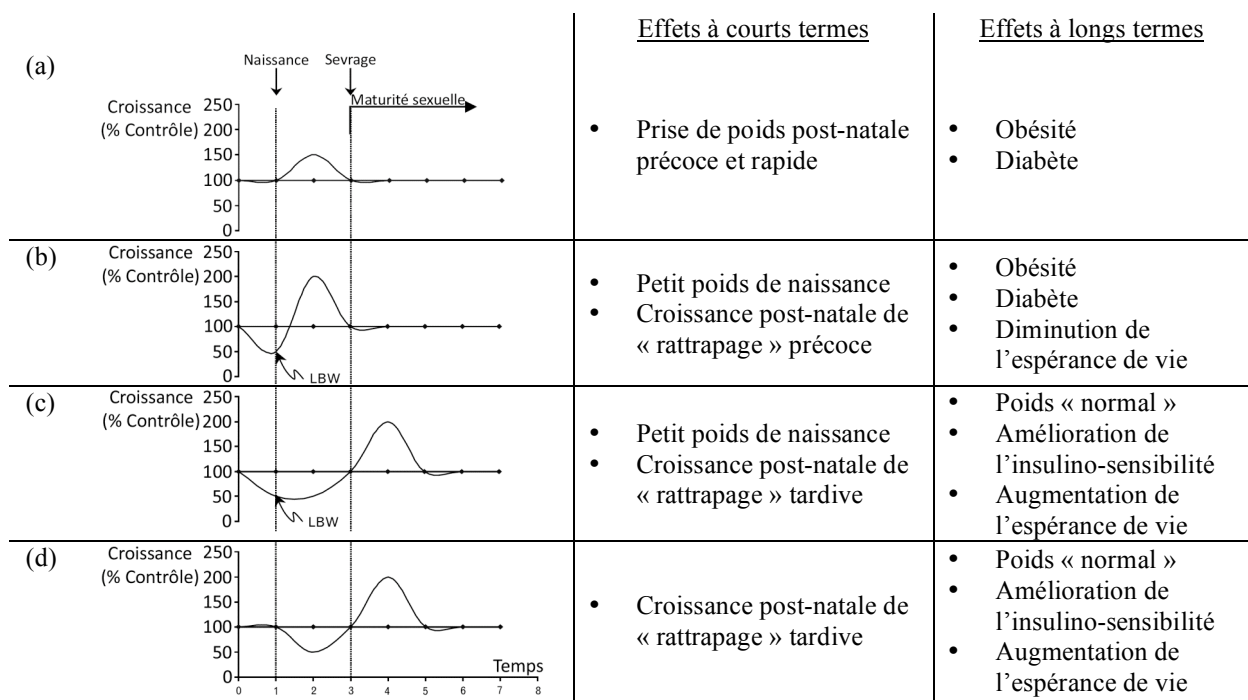


Figure 5. Relation entre la croissance post-natale et l'apparition de l'obésité à l'âge adulte.

En (a) : poids normal à la naissance et croissance post-natale rapide et précoce. En (b) : retard de croissance prénatal et faible poids à la naissance, suivi d'une prise de poids rapide post-natale. En (c) : retard de croissance prénatal et faible poids à la naissance, suivi d'une prise de poids progressive post-natale. En (d) : poids normal à la naissance puis légère diminution de la croissance en période post-natale suivie d'une croissance rapide après le sevrage. Les valeurs supérieures à 100% indiquent une croissance accélérée et les valeurs inférieures à 100% indiquent un ralentissement du taux de croissance. LBW : Low birth weight. (Traduit d'après Jimenez, 2006)

Une rapide croissance post-natale pourrait conduire à des adaptations métaboliques, par la suite responsables de dérèglements à l'âge adulte. Chez les enfants prématurés, la prise

de poids durant la première année est un important prédicteur de développement de l'obésité (Casey, 2011). Expérimentalement, la prévention d'une reprise de poids rapide après la naissance normalise l'obésité (Jimenez, 2006).

Les mécanismes impliqués dans ce phénomène sont encore à l'étude. Chez le rat, l'exposition intra-utérine à la dexaméthasone, une molécule utilisée pour provoquer un phénomène inflammatoire, conduit à un poids diminué à la naissance. Dans le tissu adipeux de ces animaux, le profil des ARNm codant des protéines impliquées dans l'homéostasie lipidique et notamment dans le stockage des lipides est différent du profil observé chez les animaux contrôle (Drake, 2010). Une prolifération plus importante des précurseurs des cellules adipeuses a également été observée expérimentalement (Bol, 2008). Des études sur modèles animaux ont permis de mettre en évidence des modifications épigénétiques qui pourraient être à l'origine de la prédisposition à l'obésité et aux maladies associées chez les enfants nés avec un faible poids à la naissance et ayant repris rapidement du poids (Figure 6). L'existence d'une hyperméthylation du promoteur du gène codant la pro-opio-mélanocortine, une neurohormone impliquée dans la régulation de la prise alimentaire a ainsi été mise en évidence chez des animaux nés avec un faible poids et sur-nourris à la naissance (Plagemann, 2009). Des études suggèrent en outre que certains de ces phénotypes associés pourraient être transmis à la génération suivante (Drake, 2005).

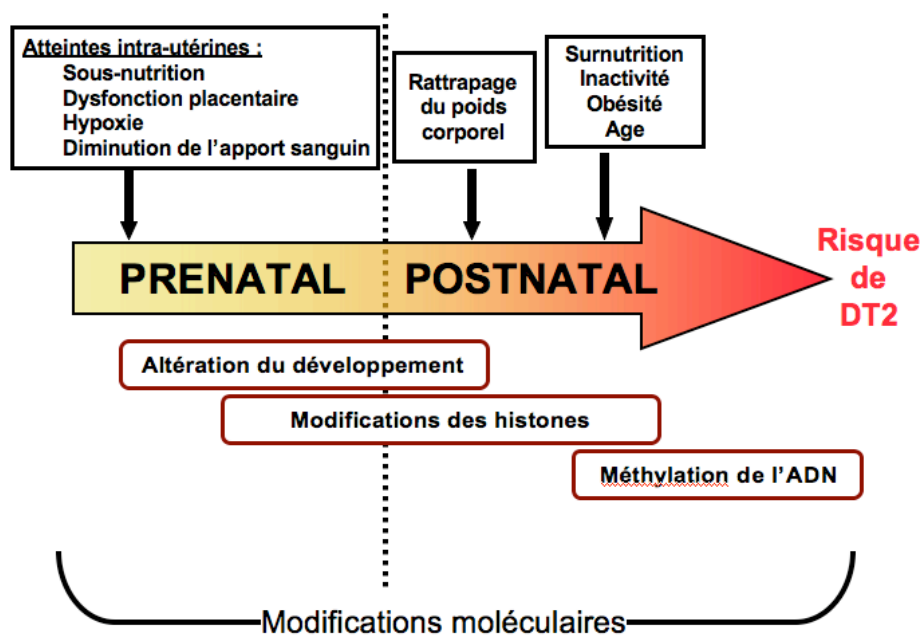


Figure 6. Mécanismes potentiels impliqués dans le développement de l'obésité et du diabète de type 2 en fonction de l'environnement péri-natal.

Des facteurs pré-natal (sous-nutrition, hypoxie, ...) ou post natal (prise de poids rapide) peuvent favoriser l'apparition d'un diabète de type 2 à l'âge adulte en entraînant des modifications moléculaires encore à l'étude. DM : Diabète de type 2. (Traduit d'après Woo, 2008)

5.4. Autres facteurs

D'autres facteurs peuvent intervenir dans la prise de poids excessive. Selon l'OMS, certaines périodes de la vie sont « critiques » pour le développement de l'obésité : le rebond d'adiposité (entre 5 et 7 ans), l'adolescence, le début de l'âge adulte, la grossesse et la ménopause constituent des périodes durant lesquelles les comportements alimentaires et physiques changent et sont susceptibles de favoriser la prise de poids. La prise de certains médicaments peut également favoriser le développement de l'obésité : l'effet des contraceptifs, antidépresseurs, corticoïdes sur la prise de poids est relativement bien documenté. Les autres facteurs sont principalement liés aux changements brusques du mode de vie : arrêt du tabac, changements sociaux et environnementaux (modification de la structure familiale, changement de travail). Plus rarement, la prise excessive de poids est la conséquence de pathologies, principalement endocriniennes (OMS, 2003).

6. Pathologies associées à l'obésité

Selon certaines études récentes, l'obésité pourrait participer à la diminution de l'espérance de vie des enfants naissant aujourd'hui, comparée à celle de leurs parents (Olshansky, 2005). L'obésité est en effet un élément clé du syndrome métabolique et elle est associée à de nombreuses co-morbidités, telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2, l'hypertension, l'apnée du sommeil, la dyslipidémie, certains cancers. En outre, les conséquences globales de l'obésité sont également importantes : elle conduit à une diminution générale de la qualité de vie et peut-être associée à l'apparition de problèmes psychologiques, au dérèglement des cycles menstruels et à des complications lors des grossesses chez la femme.

L'obésité et particulièrement l'obésité abdominale, sont des facteurs de risque indépendants d'apparition de maladies coronariennes. De nombreuses études ont souligné l'importance des liens entre l'obésité et l'augmentation du risque cardiovasculaire. Ainsi, 20 à 30 % de la mortalité cardiovasculaire est liée à une surcharge pondérale (Stein, 2004) et les personnes en surpoids ont 1 à 3 fois plus de risques de développer des maladies cardiovasculaires. L'obésité infantile en elle-même représente un risque de développer un syndrome métabolique à l'âge adulte (Sun, 2008), des maladies cardiovasculaires et un diabète de type 2 (Baker, 2007) et les adolescents en surpoids ont plus de deux fois plus de risque de mourir de maladie coronarienne durant l'âge adulte que les adolescents minces. La stéatose hépatique non-alcoolique et les dyslipidémies sont également plus fréquentes chez les individus obèses. De même, des taux élevés de triglycérides et de LDL sont retrouvés chez des individus présentant un IMC élevé. Le risque de développer une hypercholestérolémie s'accroît de manière linéaire avec l'augmentation de l'IMC chez les hommes mais atteint un maximum pour un IMC compris entre 25 et 27 kg.m⁻² chez les femmes (Eckel, 1998). Le

poids et la prise de poids sont positivement corrélés au développement de l'hypertension et il a été montré une relation positive entre l'IMC et la pression artérielle. Les complications liées à l'hypertension sont par ailleurs multiples : maladies cardiovasculaires, dissection aortique, accident vasculaire cérébral, insuffisance rénale. En 2002, l'International Agency for Research on Cancer a estimé que le surpoids et l'obésité étaient liés à 9 % des cancers du sein post-ménopause, 11 % des cancers du côlon, 25 % des cancers du rein et 37 % des cancers oesophagiens (Stein, 2004).

L'**obésité** est définie par l'OMS comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse qui peut nuire à la santé ». Elle concerne près de 500 millions de personnes dans le monde et sa prévalence est passée en France de 8,4 % à 14,9 % entre 1997 et 2009. Sédentarité et mauvaise alimentation, probablement associées à un terrain génétique favorable sont les principales causes d'obésité dans les pays industrialisés. L'obésité est un facteur de risque du développement de nombreuses pathologies et constitue un problème de santé publique majeur.

III. L'INSULINO-RESISTANCE

1. L'insuline

Le maintien de l'homéostasie glucidique est primordial au bon fonctionnement de l'organisme. Il est assuré par différents signaux endocriniens, métaboliques ou nerveux. A jeun, le glucagon, les glucocorticoïdes, les catécholamines et certaines hormones telles que l'hormone de croissance permettent de maintenir l'homéostasie glucidique, grâce à leur action hyperglycémiant. Lors d'une prise alimentaire, le glucose est absorbé par le tractus digestif : une hyperglycémie est alors détectée dans la veine porte hépatique (Burcelin, 2000) et plusieurs mécanismes entrent en jeu pour rétablir rapidement une glycémie normale. L'insuline est alors la principale hormone impliquée dans cette régulation.

Le gène de l'insuline est très conservé au cours de l'évolution. Chez la souris et le rat, on retrouve deux copies de ce gène, localisées sur le chromosome 1 chez le rat et sur les chromosomes 9 et 19 chez la souris. Chez l'Homme, il n'en existe qu'un exemplaire, de 1355 paires de bases, situé sur le bras court du chromosome 11. Sa région codante comporte 3 exons séparés par 2 introns. Ce gène contrôle la synthèse d'un précurseur de haut poids moléculaire, la pré-pro-insuline qui, après maturation, donne la protéine d'insuline active. Il a été montré que des mutations sur le gène de l'insuline peuvent conduire à différentes formes de diabète, à l'hyperinsulinémie ou à l'hyperproinsulinémie.

1.1. Structure de l'insuline

L'insuline est un polypeptide d'environ 6kDa, dont la structure primaire est très conservée entre les espèces. Il s'agit d'un hétérodimère composé de deux sous-unités, la chaîne A et la chaîne B, reliées entre elles par deux ponts disulfures. Chez l'homme, la chaîne A est formée de 21 acides aminés et la chaîne B en comporte 30. Un pont disulfure relie entre eux les acides aminés 6 et 11 de la chaîne A. Le monomère d'insuline est organisé sous forme de structure globulaire dont le centre est constitué d'un noyau hydrophobe. La forme monomérique est la forme active de la protéine, cependant l'insuline est capable de se dimériser spontanément : trois dimères peuvent s'associer entre eux pour former des hexamères qui constituent la principale forme de stockage de l'insuline dans les vésicules de sécrétion.

1.2. Synthèse de l'insuline

La production d'insuline est réalisée dans les cellules β du pancréas. Cependant, certaines études font état d'une production par d'autres types cellulaires : l'insuline et son récepteur synthétisés par le cerveau sont impliqués dans le guidage des neurones en

croissance et certaines cellules du thymus produisent également de l'insuline afin d'induire la tolérance du soi (Kojima, 2006). D'autre part, il a été montré que l'insuline pouvait être synthétisée par certaines cellules du foie, de la rate ou encore du tissu adipeux dans différents modèles animaux de diabète (Suckale, 2010). Chez le rat, on retrouve dans les cellules β du pancréas environ 10 000 vésicules d'insuline, pouvant chacune contenir jusqu'à 2 milliards de molécules d'insuline, ce qui représente 10 à 20 % du volume cellulaire. Dans ces vésicules, l'insuline est stockée sous forme d'hexamères stabilisés par une molécule de calcium et deux ions de zinc.

La traduction de l'ARNm du gène de l'insuline aboutit à la formation de la pré-pro-insuline (Figure 7). Celle-ci est constituée d'un peptide signal de 25 acides aminés, dont le rôle est de favoriser le passage du peptide dans le réticulum endoplasmique. La pré-pro-insuline est déversée rapidement dans la lumière du réticulum endoplasmique où le clivage du peptide signal conduit à la formation de la pro-insuline. La pro-insuline comprend les deux chaînes A et B de l'insuline, reliées entre elles par le peptide-C qui assure le repliement de la molécule de pro-insuline et la formation de 3 ponts disulfures. Le rôle de ce peptide de 31 acides aminés serait de maintenir les ponts disulfures qui réunissent les chaînes A et B dans une position favorisant le clivage correct de la molécule lors des étapes ultérieures de la maturation (Suckale, 2010).

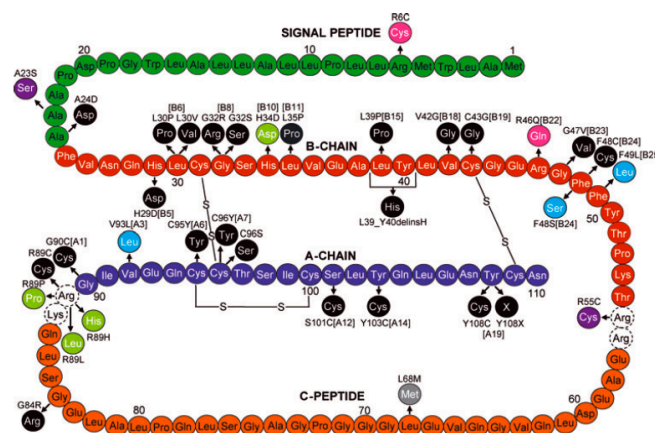


Figure 7. Structure de la préproinsuline humaine.

Les chaînes A et B correspondent respectivement aux chaînes bleu clair et rouge. Le peptide signal est représenté en vert, le peptide C est représenté en orange. Les pastilles colorées indiquent les mutations retrouvées chez des patients diabétiques ou présentant des anomalies de l'insulinémie (Steiner, 2009)

La pro-insuline va ensuite subir plusieurs étapes de maturation avant de devenir la molécule d'insuline fonctionnelle (Figure 8). Après repliement et formation des ponts disulfures, la pro-insuline est transférée dans de petites vésicules de l'appareil de Golgi. La diminution du pH à l'intérieur des vésicules augmente l'action des prohormones convertases 1 et 2 et la carboxypeptidase 2 qui vont cliver le segment connecteur pour donner l'insuline et le peptide-C. Des études menées sur des îlots isolés de rats ont montré que la synthèse de pro-

insuline dans le réticulum endoplasmique et son passage vers l'appareil de Golgi prennent environ 20 minutes et que la maturation de l'insuline dans les vésicules de Golgi augmente linéairement pendant une à deux heures. L'insuline co-précipite ensuite avec des ions zinc pour former les microcristaux contenus dans les vésicules de sécrétion (Steiner, 2009).

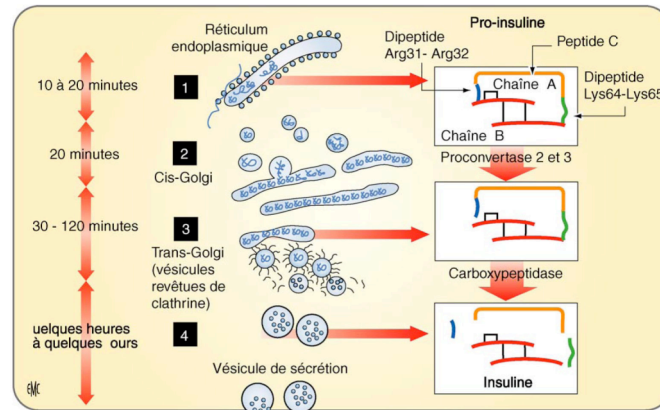


Figure 8. Synthèse de l'insuline
(Magnan, 2005)

Les granules contenant l'insuline sont stables plusieurs jours et libèrent l'insuline en réponse à une stimulation métabolique. En conditions physiologiques, 95 % de l'hormone est sécrétée sous forme d'insuline et 5 % sous forme de pro-insuline. L'insuline et le peptide C sont relâchés en quantité identique dans la circulation sanguine.

1.3. Facteurs régulant la production d'insuline

Le glucose est l'un des principaux stimulants de la synthèse d'insuline. Certains métabolites du glucose interagissent également avec les facteurs de transcription dont PDX-1 (Pancreatic duodenal homeobox 1), un facteur de transcription majeur pour le fonctionnement et le développement du pancréas en général et de la cellule β en particulier. Une mutation sur le site de fixation de PDX-1 suffit à abolir la stimulation de la transcription du gène de l'insuline, parmi lesquels le Glucagon like peptide-1 (GLP-1), l'hormone de croissance (GH), la prolactine, la leptine ou l'insuline elle-même. Le GLP-1 stimule la transcription du gène de l'insuline et augmente la stabilité des ARNm, par l'intermédiaire de l'AMPc. Il stimule également l'expression de PDX-1. Le rôle de l'insuline elle-même n'est pas encore clairement déterminé : elle exerce un rétrocontrôle sur l'expression de son gène, mais elle pourrait aussi favoriser la liaison de PDX-1 sur l'ADN par l'intermédiaire de la PI3-kinase. La leptine pourrait-elle aussi jouer un rôle dans le contrôle de la sécrétion d'insuline puisque la forme longue du récepteur à la leptine est retrouvée dans les cellules β murines et humaines. L'effet physiologique majeur de la leptine serait l'inhibition de la synthèse et de la sécrétion d'insuline, ce qui préviendrait une accumulation trop importante de triglycérides dans le tissu

adipeux. Cependant, ces conclusions sont encore controversées selon les études (Magnan, 2005).

1.4. Sécrétion d'insuline

1.4.1 Contrôle de la sécrétion

Les vésicules contenant l'insuline au sein des cellules β pancréatiques ayant une demi-vie relativement longue (de l'ordre de trois jours), l'insulinémie est principalement régulée par la sécrétion de l'insuline et donc l'exocytose. Les mécanismes capables de stimuler la sécrétion d'insuline diffèrent en grande majorité de ceux capables de réguler sa production. Le contrôle de la sécrétion d'insuline est dépendant des nutriments, des substrats énergétiques, des hormones, des neuromédiateurs. Il existe en particulier une boucle de régulation « élémentaire » entre les substrats énergétiques (le glucose par exemple) et la sécrétion d'insuline : ils stimulent la sécrétion d'insuline qui abaisse leur concentration plasmatique. La réponse à ces différents stimuli est modulée (amplification ou atténuation) par différents mécanismes.

Les agents stimulant la sécrétion d'insuline peuvent être classés en deux catégories. Les premiers sont les stimuli primaires qui déclenchent à eux seuls la sécrétion d'insuline : il s'agit du glucose, du mannose, de la leucine et du glycéraldéhyde. Seul le glucose peut exercer un effet à des concentrations physiologiques : les autres composés ont montré leur effet *in vitro*, à des concentrations bien supérieures à leurs concentrations physiologiques. Le glucose exerce également un effet régulateur puisqu'aucune de ces substances ne peut activer la sécrétion d'insuline si la glycémie est trop basse. Les stimuli secondaires amplifient la réponse aux stimuli primaires mais ne peuvent agir seuls. Ils sont hormonaux (hormones digestives) ou proviennent du système nerveux parasympathique. Certains agents sont par ailleurs capables de diminuer l'intensité de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose : on retrouve par exemple la noradrénaline, libérée par les terminaisons nerveuses sympathiques de l'îlot de Langerhans ou certaines hormones, comme la somatostatine.

En conditions physiologiques, les modifications de la glycémie entraînent une réponse proportionnelle de la sécrétion d'insuline, selon une relation sigmoïdale. *In vitro*, le seuil minimal de réponse à l'insuline dans les cellules β se situe entre 3 et 7 mM de glucose et son maximum est compris entre 15 et 30 mM (Henquin, 2006). Le glucose entre dans les cellules du pancréas par les transporteurs du glucose GLUT2 qui permettent un transport proportionnel à la glycémie plasmatique. La sécrétion de l'insuline est caractérisée par deux phases. Le premier pic de sécrétion, appelé « pic précoce », a lieu rapidement, puis il est suivi au bout de quelques minutes par une augmentation progressive de la libération d'insuline jusqu'à une valeur d'équilibre qui caractérise « le pic tardif », d'un niveau plus faible que le pic précoce, qui se maintient jusqu'à l'arrêt de la stimulation. Le rôle du pic précoce semble

être de bloquer rapidement la production de glucose par le foie mais aussi de sensibiliser les tissus cibles (muscles squelettiques, cœur et tissu adipeux) à l'effet de l'insuline. Il empêcherait également une hyperinsulinémie trop prononcée. Au niveau cellulaire, le pic précoce serait dû à l'exocytose des vésicules de sécrétion liées à la membrane plasmique et le pic tardif serait dû à celle des vésicules présentes dans le cytoplasme.

1.4.2 Mécanisme de la sécrétion

Environ 1 % des vésicules sont localisées à proximité de la membrane plasmique (Eliasson, 2008) et sont immédiatement mobilisables. Les autres vésicules sont associées aux microtubules dans le cytoplasme. Le processus d'exocytose met en jeu plusieurs protéines, dont les SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors) qui permettent la fusion membranaire. Ces protéines sont présentes sur la membrane plasmique mais aussi à la surface de la vésicule, et forment en s'associant un complexe thermodynamiquement stable qui permet le rapprochement puis la fusion des deux bicouches lipidiques. Les vésicules sont ensuite recyclées par endocytose et subissent une maturation qui leur permet d'être rechargées en insuline.

1.5. Récepteur et signalisation

1.5.1 Récepteur à l'insuline

Le récepteur à l'insuline appartient à la superfamille des récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase, dont fait partie le récepteur à l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1R). Il existe sous deux isoformes, A et B, qui diffèrent respectivement par l'absence ou la présence d'une séquence de 12 résidus suite à l'épissage alternatif d'un exon du gène codant le récepteur à l'insuline. Le récepteur est formé de deux chaînes α extracellulaires reliées par des ponts disulfures à deux chaînes β transmembranaires (Figure 9). Chaque chaîne α possède un domaine complet de liaison à l'hormone. La sous-unité β est constituée par un domaine transmembranaire hélicoïdal suivi d'un domaine juxtamembranaire contenant un domaine catalytique tyrosine kinase flanqué de deux régions régulatrices, la première impliquée dans l'internalisation du récepteur et dans la liaison à l'Insulin Receptor Substrate (IRS) 1-4 et Shc, la seconde contenant deux sites de fixation des phosphotyrosines (Youngren, 2007 ; Jensen, 2009).

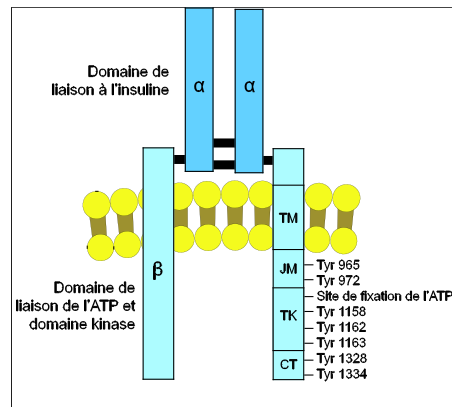


Figure 9. Structure du récepteur à l'insuline.

Le récepteur à l'insuline est composé de deux sous-unités α extracellulaire, qui vont permettre la fixation de l'insuline, et de deux sous-unités β transmembranaires (TM), qui possèdent les résidus tyrosines (Tyr) impliqués dans les cascades de signalisation à l'insuline. JM : domaine juxtamembranaire ; TK : domaine tyrosine kinase ; CT : domaine C-terminal.

Sept résidus tyrosine impliqués dans l'autophosphorylation du récepteur ont été identifiés. Les tyrosines Tyr₉₆₅ et Tyr₉₇₂ sont situées dans la région juxtamembranaire, les tyrosines Tyr₁₁₅₈, Tyr₁₁₆₂, Tyr₁₁₆₃ sont localisées dans la boucle d'activation du domaine kinase et les tyrosines Tyr₁₃₂₈, Tyr₁₃₃₄ sont proches du domaine C-terminal. En absence d'insuline, le domaine à activité tyrosine kinase possède une boucle régulatrice qui masque le site catalytique tyrosine kinase et le maintient à l'état inactif (Youngren, 2007).

En l'absence d'insuline, les sous-unités α exercent une contrainte inhibitrice et maintiennent le récepteur en configuration inactive. La fixation de l'insuline sur son récepteur conduit à un changement de conformation du récepteur qui permet le rapprochement des deux sous-unités β et entraîne l'activation du récepteur par autophosphorylation. Celle-ci conduit à l'éloignement de la boucle régulatrice et laisse accès à l'ATP sur son site consensus. Le domaine tyrosine kinase ainsi activé permet la phosphorylation d'autres tyrosines de la sous-unité β et de plusieurs protéines substrats telles que IRS et Shc (Jensen, 2009).

1.5.2 Signalisation de l'insuline

(pour revue Rains, 2011, Pirola, 2004)

L'activation du récepteur à l'insuline et la phosphorylation des substrats IRS sont essentielles à la transduction du signal (Figure 10). Les protéines IRS 1 à 4 peuvent être impliquées dans la transduction du signal, mais IRS 1 et IRS 2 sont les plus importantes pour le transport du glucose. Les protéines IRS phosphorylées recrutent des molécules contenant des domaines SH-2 (Src-homology-2) comme la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), GRB-2/mSOS et SHP-2. On distingue plusieurs voies de signalisation induites par l'insuline dont la voie de la PI3K et la voie de la mitogen-activated protein kinase (MAPK).

La PI3K est le principal élément des actions métaboliques dépendantes de l'insuline. La sous-unité régulatrice p85 de PI3K lie les résidus tyrosine phosphorylés des IRS, ce qui entraîne l'augmentation de l'activité catalytique de la sous-unité p110, qui phosphoryle PtdIns(4,5)P2 en position 3 pour donner la PtdIns(3,4,5)P3. PtdIns(3,4,5)P3 recrute les kinases PDK-1, PKB/Akt et PKC qui vont être impliquées dans différentes réponses liées à l'insuline telles que la translocation des GLUT4 vers la membrane plasmique, la synthèse de glycogène *via* la phosphorylation de la Glycogène synthétase kinase-3 et la lipogenèse *via* l'activation de la synthèse du gène de la Fatty Acid Synthase.

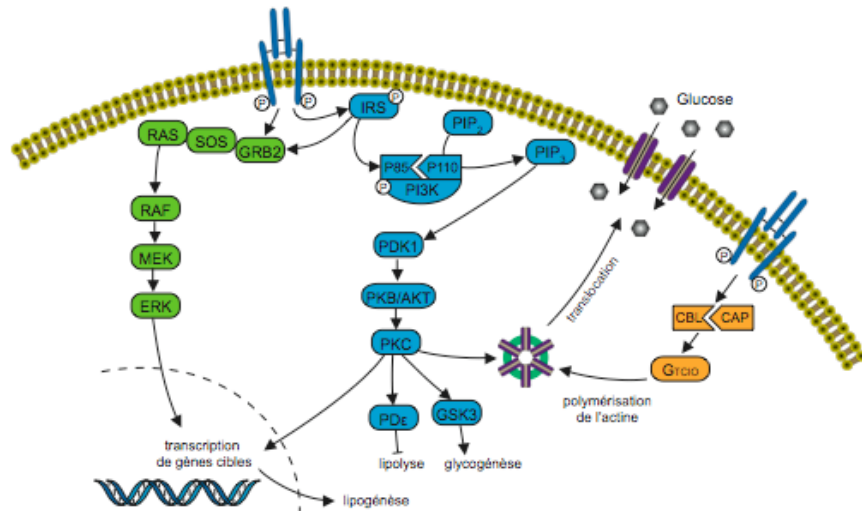


Figure 10. Mécanismes de la signalisation à l'insuline.

La fixation de l'insuline sur son récepteur permet l'activation de plusieurs voies de signalisation : la voie de la PI3K (en bleu sur le schéma), permettant la translocation des transporteurs du glucose GLUT4 vers la membrane plasmique, la synthèse du glycogène et la lipogenèse, la voie impliquant MAPK (en vert sur le schéma), impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire, et une troisième voie également impliquée dans la translocation des GLUT4, qui met en jeu l'activation de protéines CAP/CBL (en orange sur le schéma).

La voie de signalisation à l'insuline impliquant la MAPK conduit à l'expression de gènes impliqués dans la différenciation et la prolifération cellulaires. Après phosphorylation des IRS, les protéines GRB-2, SOS sont recrutées et agissent avec SHP-2 pour activer Ras, protéine intermédiaire de la cascade de phosphorylation permettant le recrutement de ERK (Extracellular signal-regulated kinase) et *in fine* la phosphorylation de facteurs de transcription activant ainsi l'expression de différents gènes.

Une troisième voie est également impliquée dans l'action de l'insuline sur la captation du glucose. Elle met en jeu la phosphorylation de la protéine Cbl, associée à une protéine adaptatrice CAP (Cbl-associated protein) qui contient 3 domaines SH3 et un domaine sorbin homology (SoHo) permettant la translocation des rafts lipidiques et leur association avec les protéines flotillin et ainsi l'activation de la protéine G TC10. Cette protéine permet la polymérisation de l'actine et participe à la translocation des GLUT4 vers la membrane plasmique.

Enfin, la régulation de l'action de l'insuline passe par la dégradation de l'insuline : le complexe ligand-récepteur est internalisé et transporté vers les lysosomes où l'insuline est dégradée et les récepteurs sont recyclés (Carpentier, 1994).

1.6. Implication de l'insuline dans le métabolisme

1.6.1 Action de l'insuline sur le transport du glucose

Les transporteurs du glucose GLUT4 ont un rôle central dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. Leur translocation dépend en effet largement du rôle de l'insuline, bien que d'autres « pools » de GLUT 4 puissent être mobilisés par l'exercice musculaire (Pereira, 2004). Dans le cytoplasme, les vésicules contenant les GLUT4 sont maintenues dans la région périnucléaire par des protéines d'ancrage de type TUG (Tether containing a UBX domain for GLUT4) (Bogan, 2003). Dans les tissus insulino-sensibles (muscle squelettique, cœur et tissu adipeux), l'insuline permet le recrutement dose-dépendant des GLUT4 d'un pool intracellulaire vers la membrane plasmique. En condition basale, les GLUT1 assurent le transport du glucose nécessaire au fonctionnement cellulaire, 90 % des GLUT4 se trouvant dans le cytoplasme. En réponse à l'insuline, les transporteurs GLUT4 sont recrutés et leur nombre à la surface de la membrane plasmique est augmenté. Selon une étude réalisée sur des biopsies de muscle squelettique humain, sous insuline, 42% des GLUT4 sont présents dans la membrane plasmique contre 13% en condition basale. L'insuline permet également la translocation plus importante de GLUT 12 vers la membrane plasmique. Le nombre de GLUT1 présents dans la membrane plasmique est quant à lui inchangé sous l'action de l'insuline (Stuart, 2009). Deux voies de signalisation à l'insuline entrent en jeu dans la translocation des GLUT4 vers la membrane plasmique : la première permet la levée du signal qui maintient les vésicules au niveau de leur site de rétention cytoplasmique et la seconde permet la migration des vésicules le long des microfilaments d'actine F, polymérisés en réponse à l'insuline. Le ciblage vers la membrane plasmique implique l'intervention du système de reconnaissance vésicule/membrane de type v-SNARE/t-SNARE. Le recyclage permanent des GLUT4 se fait par internalisation dans des vésicules à manteau de clathrine. Les GLUT4 sont ensuite redirigés vers leur compartiment de stockage (Ishiki, 2005).

1.6.2 Action de l'insuline sur le métabolisme glucidique

Le rôle de l'insuline sur le métabolisme du glucose s'exerce principalement dans le foie et le muscle squelettique. Dans le foie, elle stimule l'utilisation et le stockage du glucose sous forme de lipides et de glycogène. Dans les hépatocytes, l'insuline bloque la production et le relargage de glucose en inhibant l'expression d'enzymes intervenant dans la néoglucogenèse et la glycogénolyse en agissant directement sur son récepteur hépatique ou indirectement en diminuant la quantité d'acides gras libres dans la veine porte. Elle permet

également l'augmentation de la lipogenèse à partir du glucose ainsi que la synthèse de glycogène par activation de la glycogène synthase. L'action de l'insuline sur le foie est précoce et est totale après deux heures.

Dans le muscle squelettique, l'insuline augmente l'expression de l'hexokinase II ce qui augmente la phosphorylation du glucose et diminue ainsi la quantité de glucose libre intracellulaire, la concentration en glucose étant une étape limitante du transport du glucose. L'insuline stimule également la synthèse de glycogène (Saltiel, 2001).

1.6.3 Action de l'insuline sur le métabolisme lipidique

L'insuline agit sur le stockage, la mobilisation et l'utilisation des acides gras en activant la lipogenèse et en stimulant l'expression des enzymes de synthèse de lipides. Elle inhibe la captation des acides gras libres plasmatiques dans le muscle squelettique, le cœur et le foie. Dans les adipocytes, elle contrôle la sécrétion de la lipoprotéine lipase, qui active dans le sang la dégradation des triglycérides (TG) en acides gras et en glycérol (Saltiel, 2001).

1.6.4 Autres actions de l'insuline

En plus de ses actions sur le métabolisme lipidique et glucidique, l'insuline intervient dans le métabolisme des acides aminés : elle augmente la captation intracellulaire des acides aminés et la synthèse protéique en stimulant la transcription et la traduction *via* la stimulation de la PI3K (Proud, 2006).

1.7. Actions de l'insuline sur le système cardiovasculaire

L'insuline exerce une action sur la vasocontractilité. L'action vasodilatatrice de l'insuline est médiée par la voie de signalisation de la PI3K, qui régule l'expression de l'eNOS (Endothelial nitric oxide synthase) dans l'endothélium vasculaire. Des doses supraphysiologiques d'insuline (par exemple lors d'un clamp eulycémique hyperinsulinémique) modulent la vasodilatation dans le muscle squelettique en agissant sur la synthèse de NO. Par ailleurs, l'insuline diminue la contractilité des cellules musculaires lisses en régulant la concentration en calcium cytosolique. Inversement, l'insuline intervient dans la vasoconstriction des vaisseaux périphériques en stimulant l'activité du système nerveux sympathique (Muniyappa, 2007).

Une augmentation du recrutement des capillaires dans le muscle squelettique a été observée expérimentalement. Chez l'homme, une augmentation du volume microvasculaire de l'ordre de 45 % a ainsi été mise en évidence, suite à l'action de l'insuline sécrétée après un repas. Ce recrutement n'était pas associé à une augmentation du débit sanguin dans le muscle aux concentrations physiologiques (Vincent, 2006).

Expérimentalement, il a été montré que l'insuline pouvait avoir un rôle stimulateur de l'expression de molécules d'adhésion telles que VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) via la voie de la MAPK. La voie de la PI3K inhibe ce phénomène. En conditions physiologiques, l'équilibre entre la voie de la MAPK et la voie de la PI3K ne permet pas à l'insuline de provoquer l'augmentation de ces molécules d'adhésion.

L'insuline a également une action stimulante sur la contractilité cardiaque : l'augmentation de l'entrée du calcium dans des cardiomyocytes humains en réponse à l'insuline permet en effet d'observer une augmentation de la contraction de ces cellules (Muniyappa, 2007).

2. L'insulino-résistance

L'insulino-résistance est définie comme un défaut d'action de l'insuline sur ses tissus cibles (le muscle cardiaque, le muscle squelettique, le tissu adipeux et le foie), compensée par une hypersécrétion d'insuline et se traduisant par une hyperinsulinémie. Elle conduit à terme au diabète de type 2, qui associe un défaut de sensibilité à l'insuline à un défaut de sécrétion d'insuline. On parle parfois d'état « pré-diabétique », car l'insulino-résistance est longtemps silencieuse : son retard au diagnostic est estimé entre 5 et 7 ans.

2.1. Prévalence

La prévalence de l'insulino-résistance est difficile à établir car il n'existe pas de méthode unanimement reconnue pour la mesurer. Les méthodes de mesure actuelles sont soit difficiles à mettre en œuvre (cas du clamp euglycémique hyperinsulinémique) soit peu sensibles. Cependant, une étude estimait en 2007 qu'environ 197 millions de personnes étaient intolérantes au glucose dans le monde, l'intolérance au glucose étant l'un des indices « indirects » de l'insulino-résistance. Aux Etats-Unis, 25 % de la population présenterait une insulino-résistance, soit environ 60 millions de personnes en 2007. La prévalence de l'insulino-résistance devrait augmenter dans les années à venir : en 2025, le nombre de personnes intolérantes au glucose pourrait atteindre 420 millions (Hossain, 2007).

2.2. Définition

L'insulino-résistance se caractérise par une réponse inadaptée des cellules cibles de l'insuline à des concentrations physiologiques en insuline. Il en résulte une hyperinsulinémie compensatrice qui permet le maintien de l'homéostasie glucidique et lipidique (Wang, 2004). Elle est associée à de nombreuses pathologies et est un élément prépondérant dans le syndrome métabolique. Elle est en outre un élément central de la physiopathologie du diabète de type 2. L'insulino-résistance est fortement liée à l'obésité, puisque la majorité des individus insulino-résistants sont en surpoids ou obèses (Mokdad, 2000). L'insulino-

résistance se manifeste principalement par un défaut de transport du glucose dans le muscle squelettique et le myocarde. Dans le tissu adipeux, elle conduit à un défaut d'inhibition de la lipolyse. Dans le foie, elle conduit à un défaut d'inhibition de la production de glucose et une altération du métabolisme lipidique. L'hyperglycémie à jeun caractéristique du diabète de type 2 est en effet largement liée à l'augmentation endogène de la production de glucose (Savage, 2007). La gluconéogenèse plus que la glycogénolyse semble être responsable de l'augmentation de la production hépatique de glucose dans le diabète de type 2 (Magnusson, 1992). Récemment, il a été mis en évidence une insulino-résistance au niveau cérébral, qui pourrait être impliquée dans le développement de la maladie d'Alzheimer (Bosco, 2011). Nous détaillerons ici les connaissances actuelles sur l'insulino-résistance dans les muscles cardiaque et squelettique, puisque ces organes nous intéressent particulièrement dans notre étude.

2.3. Insulino-résistance musculaire

Le muscle squelettique est le principal organe impliqué dans la régulation de l'homéostasie du glucose. Suite à un repas, la majorité du glucose absorbé est captée par le muscle squelettique via des mécanismes insulino-dépendants, pour y être métabolisée. Sous clamp euglycémique hyperinsulinémique, 80 % de la captation du glucose a lieu dans le muscle squelettique (DeFronzo, 1985). Les données de la littérature concernant l'insulino-résistance musculaire sont nombreuses. Chez l'homme comme chez l'animal, les études ont montré que l'augmentation de la masse corporelle était accompagnée de l'augmentation d'une insulino-résistance musculaire (Abdul-Ghani, 2010). La perte de poids du sujet obèse est en outre associée à une diminution de l'insulino-résistance musculaire (Vitola, 2009). L'insulino-résistance affecte dans le muscle squelettique la signalisation à l'insuline, le transport du glucose et le métabolisme du glucose : une diminution de la phosphorylation et de l'oxydation du glucose est observée, ainsi qu'une déficience en glycogène synthase. Elle concerne également le métabolisme lipidique.

2.3.1 Métabolisme du glucose

Transport du glucose

L'insulino-résistance est caractérisée par un défaut de transport du glucose sous insuline. Celui-ci résulte d'une diminution de la translocation des GLUT4, principaux transporteurs du glucose en présence d'insuline.

Il a été bien établi que le transport du glucose était diminué chez les individus insulino-résistants (Krook, 2000). L'ARNm des GLUT4 et la protéine GLUT4 sont retrouvés en quantité équivalente chez les personnes saines ou insulino-résistantes (Abdul-Ghani, 2010). *In vivo*, il a été montré que le transport du glucose était diminué dans le muscle

squelettique chez les patients obèses. Le défaut de transport du glucose chez les sujets diabétiques est donc dû à un défaut de translocation ou d'activité des transporteurs, mais pas à une diminution de leur nombre. Dans une moindre mesure, l'insulino-résistance pourrait affecter les GLUT12, qui possèdent des homologues de séquences avec les GLUT4 et qui peuvent participer au transport du glucose contrôlé par l'insuline (Joost, 2001 ; Stuart, 2009). La captation du glucose entre les repas (indépendante de l'insuline), est également affectée chez les individus insulino-résistants, bien que ces mécanismes ne soient pas encore compris (Abdul-Ghani, 2010). Il est à noter que la translocation des GLUT4 provoquée par l'exercice musculaire n'est pas affectée chez les individus insulino-résistants, ce qui peut expliquer en partie l'effet bénéfique de l'exercice physique chez ces patients (Pereira, 2004).

Phosphorylation du glucose.

Une diminution de la phosphorylation du glucose a été mise en évidence dans le muscle squelettique de patients atteints de diabète de type 2. Chez les sujets sains, l'insuline augmente la transcription et la traduction du gène codant l'hexokinase II dans le muscle squelettique. Cet effet est diminué chez les sujets insulino-résistants (Vogt, 2000).

Synthèse du glycogène

Les sujets obèses ou diabétiques présentent un défaut majeur de la stimulation de la glycogène synthase sous insuline. La glycogène synthase est une enzyme permettant la régulation de la synthèse de glycogène dans le muscle squelettique et sa forme active est la forme déphosphorylée. En condition normale, l'insuline déclenche une cascade de signalisation qui conduit à l'inactivation de la glycogène synthase kinase et l'activation de la glycogène synthase phosphatase, ce qui permet l'activation de la glycogène synthase. En condition basale, l'activité de la glycogène synthase est altérée chez les sujets diabétiques de type 2 et la capacité de l'insuline à l'activer est également réduite. L'activation de la glycogène synthase phosphatase par l'insuline est également diminuée (Abdul-Ghani, 2010).

Glycolyse

Dans le muscle squelettique d'individus insulino-résistants, l'activité insulino-régulée d'une enzyme clé de la glycolyse, la pyruvate deshydrogenase (PDH) est diminuée. L'obésité et le DT2 sont associés à une augmentation du turnover et de l'oxydation des acides gras qui pourraient, selon le cycle de Randle, inhiber l'activité de la PDH et donc l'oxydation du glucose (Abdul-Ghani, 2010).

2.3.2 Métabolisme des lipides

L'accumulation de lipides au sein du muscle squelettique fait partie des mécanismes clés de l'insulino-résistance et relie l'obésité à l'insulino-résistance. Indépendamment de la masse corporelle ou du diabète, la présence de triglycérides au niveau intracellulaire est fortement corrélée à l'insulino-résistance (Krssak, 1999). L'insulino-résistance induite par un

régime hyperlipidique est associée à une augmentation des lipides intramusculaires (Park, 2005) et chez l'animal, cette augmentation est corrélée au développement de l'insulino-résistance (Storlien, 1991 ; Pagliassotti, 1995). Des biopsies musculaires ont permis de mettre en évidence une augmentation des triglycérides dans le muscle squelettique de sujets obèses tolérants au glucose comparé aux individus sains et une relation inverse entre la sensibilité à l'insuline et le contenu en triglycérides intramusculaires. L'utilisation de la spectroscopie par résonance magnétique a montré que les triglycérides musculaires sont majoritairement situés à l'intérieur des cellules musculaires et assez peu dans l'espace extracellulaire au cours du développement de l'insulino-résistance (Perseghin, 1999). La diminution de l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique d'individus obèses a été démontrée chez l'homme (Kelley, 1999) comme chez l'animal (Turcotte, 2001) ; elle serait en grande partie responsable de l'accumulation des triglycérides liée à l'insulino-résistance dans le muscle squelettique (Kelley, 1999).

2.3.3 Altération de la fonction mitochondriale

L'insulino-résistance dans le muscle squelettique est associée à une diminution de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries (Abdul-Ghani, 2010). Certaines études ont associé l'état diabétique à une diminution du nombre de mitochondries et de l'expression d'un gène codant un facteur de transcription impliqué dans la biogénèse mitochondriale, PGC-1 : cette diminution serait responsable de la diminution du nombre de mitochondries dans la cellule musculaire (Patti, 2003) mais ces études ont été contredites. En effet, d'autres études ont révélé des anomalies dans la morphologie et les fonctions mitochondriales : des altérations de la respiration mitochondriale et de la synthèse d'ATP ont ainsi été mises en évidence dans le muscle squelettique d'individus insulino-résistants et obèses (Abdul-Ghani, 2010). Les raisons de ces dysfonctions – prédisposition génétique ou acquisition ultérieure ? cause ou effet de l'insulino-résistance ? – sont encore largement controversées et nécessitent d'être étudiées.

2.4. Insulino-résistance cardiaque

Dans le cœur, l'insulino-résistance met en jeu un défaut de signalisation à l'insuline, une altération du transport du glucose et du stockage du glycogène dans les cardiomyocytes.

Le maintien des concentrations intracellulaires en ATP dans le muscle cardiaque est nécessaire au maintien de l'intégrité de la fonction cardiaque. L'ATP est principalement synthétisée par phosphorylation oxydative dans les mitochondries et dans une moindre mesure par la glycolyse. En condition physiologique, la production d'ATP résulte pour 60 % à 80 % de l'oxydation des lipides, pour 20 % du glucose et 10 % du lactate. Bien que l'oxydation mitochondriale soit la principale source d'ATP dans le cœur, le métabolisme du glucose

normal est nécessaire au maintien d'une fonction cardiaque normale (Stanley, 1997). Les souris dépourvues de GLUT4 dans le cœur ont un métabolisme du glucose basal élevé mais une captation de glucose sous insuline altérée. Ces souris présentent une hypertrophie cardiaque et des dysfonctions systoliques et diastoliques (Tian, 2001).

Comme dans le muscle squelettique, le transport du glucose est assuré principalement par les transporteurs GLUT1 et GLUT4. Dans le cœur, l'insuline stimule la captation du glucose de la même façon que dans le muscle squelettique : après fixation sur son récepteur, une cascade de phosphorylations conduit à la translocation des GLUT4 vers la membrane plasmique des cardiomyocytes et permet ainsi l'augmentation de l'entrée du glucose dans la cellule. Les protéines IRS, PI3K, PDK1, Akt/PKB et PKC sont impliquées dans cette cascade de phosphorylations.

Des études *ex vivo* sur cœur isolé et perfusé, *in vitro* sur cardiomyocytes en culture ou *in vivo* par imagerie nucléaire TEP (Tomographie par Emission de Positons ou PET pour Positon Emission Tomography) ont montré l'existence d'une insulino-résistance dans le cœur diabétique humain et animal (Ohtake, 1995). Chez des souris nourries avec un régime riche en lipides, l'insulino-résistance cardiaque apparaît 10 jours après le début du régime alors que l'insulino-résistance dans le muscle squelettique, le tissu adipeux et le foie est détectée au bout de 3 semaines de régime. Cette insulino-résistance est associée à une diminution de la captation du glucose, de l'activité de la protéine Akt et également de la quantité de GLUT4 (Park, 2005). Après 20 semaines de régime, les animaux développent des anomalies cardiaques qui semblent découler de l'insulino-résistance. Chez les souris obèses db/db et ob/ob, on observe une augmentation de l'oxydation des lipides et une diminution du métabolisme du glucose *ex vivo* (Buchanan, 2005). Une étude assez semblable a montré une diminution de la glycolyse, de l'oxydation du glucose et de la captation du glucose sous insuline dans le cœur deux semaines après le début d'un régime hyperlipidique. Une diminution de 55 % de la quantité de GLUT4 a été mesurée. La translocation de la protéine semble elle aussi affectée, même si la phosphorylation d'Akt n'est pas modifiée. Une augmentation de l'oxydation des acides gras et de la consommation myocardique en oxygène a également été observée après 5 semaines de régime. Ces données suggèrent que l'altération du métabolisme glucidique dans le cœur résulterait précocement d'un défaut en GLUT4 et de sa translocation. Les mécanismes impliqués dans le défaut de translocation ne sont pas encore déterminés (Wright, 2009). La diminution de la captation du glucose a été observée *in vivo* par TEP. La diminution du gène codant GLUT4 a également été mise en évidence chez le rat Zucker obèse et diabétique (ZDF) de 19 semaines (Shoghi, 2008).

L'effet d'une forte oxydation lipidique prolongée dans le cœur pourrait conduire à l'accumulation d'intermédiaires de l'oxydation des lipides, à la génération importante d'espèces réactives de l'oxygène (par les mitochondries) et à une consommation excessive d'oxygène. L'implication des PPAR α a été montrée sur des souris surexprimant cette

protéine : elles présentent une augmentation de l'oxydation des lipides et une diminution de celle du glucose. D'autre part, ces animaux développent une insulino-résistance ainsi que des anomalies fonctionnelles et morphologiques du cœur similaires à celles observées chez les diabétiques. Une diminution de l'expression des gènes codant les GLUT4 et les protéines impliquées dans le métabolisme du glucose est également observée (Finck, 2002).

2.5. Mécanismes de l'insulino-résistance

2.5.1 Altération de la signalisation insulinique

Le défaut de signalisation à l'insuline se manifeste par une diminution de la phosphorylation d'IRS-1 et une diminution de l'activation de la PI3K. Une réduction de l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline a été démontrée dans plusieurs études mais ce fait suivrait l'hyperglycémie consécutive au diabète.

Plusieurs études ont permis de montrer que les principaux défauts du signal insulinique sont liés aux protéines IRS-1 et PI3K. Une forte diminution de la phosphorylation d'IRS-1 sur ses résidus tyrosine est observée chez les individus diabétiques de type 2. L'association de la sous-unité p85 de la PI3K avec la protéine IRS-1 et l'activation de la PI3K sont également altérées chez les sujets obèses et chez les individus diabétiques (Krook, 2000 ; Cusi, 2000). L'utilisation de modèles animaux a permis de mettre en évidence une diminution de 80 à 90 % de la phosphorylation d'IRS-1 et de l'activité de la PI3K. Le défaut de signalisation de l'insuline est également corrélé à la sévérité de l'insulino-résistance mesurée par clamp euglycémique hyperinsulinémique. Le défaut de phosphorylation des protéines IRS-1 a été expliqué par une phosphorylation anormale de la protéine sur des résidus sérine au lieu des résidus tyrosine, à la fois chez l'animal et chez l'homme (Lee, 2003). Expérimentalement, une mutation sur les résidus sérine d'IRS-1 diminue le développement de l'insulino-résistance dans le muscle squelettique de souris nourries avec un régime hyperlipidique (Morino, 2008).

Plusieurs mécanismes interviennent dans la phosphorylation des résidus sérine et/ou thréonine. La c-Jun N-terminal kinase (JNK) empêche l'interaction du domaine Phosphotyrosine binding domain (PTB) de IRS1/2 avec la Tyr₉₆₀ phosphorylée du récepteur. Cette kinase est activée par le TNF- α , les acides gras et l'insuline elle-même, ce qui explique en partie l'insulino-résistance en état d'hyperinsulinémie (Lee, 2003). La phosphorylation sur les résidus sérine peut également provenir de l'augmentation de l'activité de la protéine kinase C qui est modifiée par une alimentation hautement lipidique, l'acyl-coA et le diacylglycérol étant des activateurs des protéines kinases C. Les acides gras jouent donc un rôle important dans le développement de l'insulino-résistance.

2.5.2 Rôle des acides gras dans la résistance à l'insuline

La sécrétion d'insuline conduit normalement à l'inhibition de la lipolyse dans les adipocytes et donc à la diminution de la concentration plasmatique en acides gras libres. Parallèlement, la captation de glucose et l'activation d'enzymes impliquées dans le métabolisme glucidique sont augmentées en présence d'insuline dans le muscle squelettique, ce qui conduit à une augmentation de l'oxydation du glucose. Chez les patients diabétiques, l'insuline ne permet pas l'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux (DeFronzo, 2004). Il a par ailleurs été montré chez des sujets obèses que la sévérité de l'insulino-résistance musculaire était liée au degré d'obésité (Abdul-Ghani, 2010). De plus, la présence d'acides gras libres en grande concentration dans le plasma est impliquée dans le développement de l'insulino-résistance (Belfort, 2005).

Le défaut d'oxydation des acides gras conduit à une accumulation ectopique de triglycérides dans le muscle squelettique et le foie : on parle alors de lipotoxicité (Muoio, 2008). L'élévation des concentrations plasmatiques en acides gras libres conduit à des dysfonctions dans la cascade de signalisation de l'insuline (Abdul-Ghani, 2010). En outre, une étude menée sur des rats nourris avec un régime hyperlipidique suggère que l'accumulation ectopique de lipides est un meilleur indicateur de l'insulino-résistance que ne l'est la masse de tissu adipeux (Lim, 2009).

3. Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 est défini par une glycémie à jeun supérieure à $1,26 \text{ g.L}^{-1}$ (soit 7 mM). Cette hyperglycémie résulte d'un défaut de sécrétion d'insuline associé à un défaut d'action de cette hormone sur ses tissus cibles. Le diabète de type 2 représente environ 90 à 95 % des cas de diabète. La prévalence du diabète de type 2, comme celle de l'obésité, est en augmentation : en 2002, 171 millions de personnes étaient concernées dans le monde et ce chiffre pourrait atteindre près de 360 millions en 2030 (Wild, 2004). En France, elle était estimée à 4,57 millions en 2008 (Bringer, 2009). Chez 75 à 80 % des patients, le diabète de type 2 est précédé d'une résistance à l'insuline, d'une hyperinsulinémie, d'une dyslipidémie et d'une obésité (Lebovitz, 1999) et la plupart des patients sont atteints d'un syndrome métabolique avant l'apparition des signes cliniques du diabète (Reaven, 2005). Comme l'obésité, le diabète de type 2 est une pathologie multifactorielle, qui associe facteurs comportementaux et facteurs génétiques polygéniques. Le risque de développer un diabète de type 2 est de 40 % chez les individus dont un parent est atteint de cette maladie et de 70 % chez les individus dont les deux parents sont atteints. La concordance du diabète de type 2 chez les jumeaux monozygotes est de 70 %, alors qu'elle est de 20 à 30 % chez les jumeaux dizygotes (Ahlqvist, 2011).

Le diabète de type 2 est la conséquence d'une insulino-résistance et d'un endommagement progressif des cellules β pancréatiques. La progression de cette pathologie a été définie en 5 phases (Weir, 2004). Durant la première phase, l'insulino-résistance est compensée par une augmentation de la sécrétion d'insuline, qui résulte d'une augmentation de la quantité de cellules β pancréatiques et de l'activité de ces cellules (Prentki, 2006). Lors de la deuxième phase, dite d'adaptation, les cellules β ne sont plus capables de compenser l'insulino-résistance et une hyperglycémie apparaît. La troisième phase est la phase de décompensation : l'insulino-résistance est alors trop importante et l'hyperglycémie provoque une glucotoxicité qui empêche la sécrétion normale d'insuline par les cellules β , ce qui augmente la glucotoxicité. Lors de la 4^{ème} phase, la faible sécrétion d'insuline encore présente permet de limiter l'acidocétose due à l'accumulation de corps cétoniques. La dernière étape correspond à une décompensation sévère : la diminution de la production d'insuline est telle que l'acidocétose ne peut être contenue. Le sujet devient alors dépendant d'un apport exogène d'insuline. Les mécanismes de diminution de la masse de cellules β ont été étudiés. Chez le sujet diabétique de type 2, on observe une perte de masse et de volume d'environ 50 % par rapport aux sujets sains. Il semblerait que cette diminution soit due à une augmentation de l'apoptose des cellules (Butler, 2003). La glucotoxicité liée à l'hyperglycémie chronique est responsable de nombreuses complications microcirculatoires (néphropathies, rétinopathies, neuropathies).

L'**insuline** est un régulateur majeur du métabolisme. Son rôle hypoglycémiant passe par son action sur les tissus insulino-sensibles : le foie, le muscle squelettique, le muscle cardiaque et le tissu adipeux. Dans le muscle squelettique et le muscle cardiaque, elle augmente la captation du glucose en stimulant le recrutement de transporteurs spécifiques du glucose, les GLUT4. La **résistance à l'insuline** est caractérisée par un défaut d'action de l'insuline sur ses tissus cibles. Elle entraîne une hyperinsulinémie chronique qui conduit à terme à l'apparition du diabète de type 2. La résistance à l'insuline est une pathologie longtemps silencieuse, ce qui rend son diagnostic difficile.

IV. LE TISSU ADIPEUX

1. Généralités

Le tissu adipeux est le principal lieu de stockage des réserves énergétiques de l'organisme : plus de 95 % des lipides sont contenus dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides et seules de faibles quantités sont retrouvées dans le foie et le muscle. On estime qu'un jeune adulte de corpulence moyenne possède 10 à 15 kg de tissus adipeux, répartis en différents endroits de l'organisme (Figure 11). Longtemps considéré comme un unique tissu de stockage, la découverte de la leptine dans les années 1990 a permis de comprendre sa fonction endocrine et son importance dans la régulation du métabolisme.

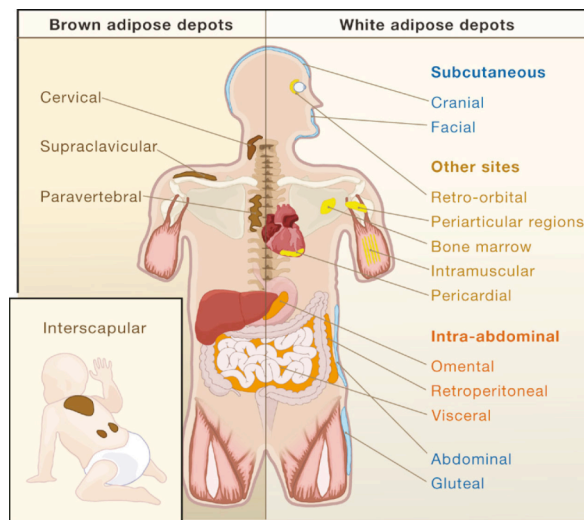


Figure 11. Répartition du tissu adipeux chez l'homme.

Deux formes de tissus adipeux sont distinguées : le tissu adipeux brun, dont le rôle principal est d'assurer le maintien de la température corporelle et le tissu adipeux blanc, principal lieu de stockage des réserves énergétiques de l'organisme. (Gesta, 2007)

Le tissu adipeux apparaît chez le fœtus à la quinzième semaine de gestation. Le nombre et la taille des adipocytes augmentent approximativement jusqu'à la 30^{ème} semaine de grossesse (Rosembaum and Leibel, 1988). On distingue deux formes de tissu adipeux chez les mammifères : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun.

La principale fonction du tissu adipeux brun est d'assurer le maintien de la température corporelle : il est donc capable de thermogénèse. Chez l'homme, on le retrouve principalement chez les nouveau-nés et sa proportion diminue durant les premières années de vie. Les cellules du tissu adipeux brun mesurent 15 à 50 μm de diamètre (Figure 12, A). Elles comportent un noyau central arrondi et un cytoplasme abondant. Elles sont riches en mitochondries et possèdent de nombreuses gouttelettes lipidiques, composées de triglycérides. Dans ces cellules, la β -oxydation n'est pas couplée à la formation d'ATP à cause de la

présence d'une protéine particulière : l'Uncoupling Proteine 1 (UCP-1), marqueur des adipocytes bruns. Ce tissu adipeux ne semble pas être impliqué dans les processus liés à l'obésité. Des études récentes réalisées chez la souris suggèrent l'existence d'une transdifférenciation entre les adipocytes bruns et blancs : dans certaines conditions, les adipocytes blancs seraient capables de devenir des adipocytes bruns positifs pour l'expression d'UCP-1 (Cinti, 2009).

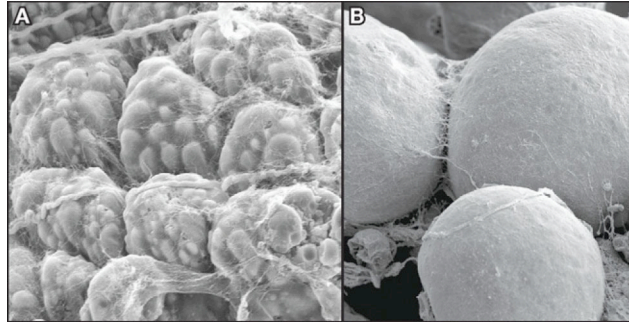


Figure 12. Microscopie électronique à balayage de tissu adipeux brun et blanc.

Les adipocytes bruns (A) contiennent de nombreuses gouttelettes lipidiques. Les adipocytes blancs (A), de plus grande taille, sont constitués d'une large goutte lipidique. (Frontini, 2010)

Le tissu adipeux blanc est réparti en différents endroits de l'organisme. On distingue principalement le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux viscéral. Le tissu adipeux sous-cutané est localisé entre les muscles et la peau. On le retrouve au niveau de la tête, de l'abdomen et de la zone glutéo-fémorale. Comme son nom l'indique, le tissu adipeux viscéral entoure les viscères. Plus précisément, il est localisé au niveau ommental, mésentérique, péritréal, rétro-péritonéal, périaortique et au niveau gonadique et urogénital (Figure 11). Suivant sa localisation dans l'organisme, le tissu adipeux blanc possède des propriétés différentes. Les cellules du tissu adipeux blanc mesurent entre 60 et 80 μm de diamètre. Elles sont caractérisées par la présence d'une large goutte lipidique qui occupe jusqu'à 90 % du volume cellulaire (Figure 12, B). Cette vacuole lipidique est constituée principalement de triglycérides, mais elle contient également cholestérols, acides gras et phospholipides. Le noyau et les mitochondries, aplatis, sont repoussés aux bords de la cellule. Le tissu adipeux blanc se décompose en deux parties : les adipocytes et les cellules de la fraction du stroma vasculaire (Figure 13), qui comprennent les cellules de l'immunité, en particulier les macrophages, les préadipocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales. Les adipocytes comme les cellules de la fraction du stroma vasculaire sécrètent des molécules, appelées adipokines.

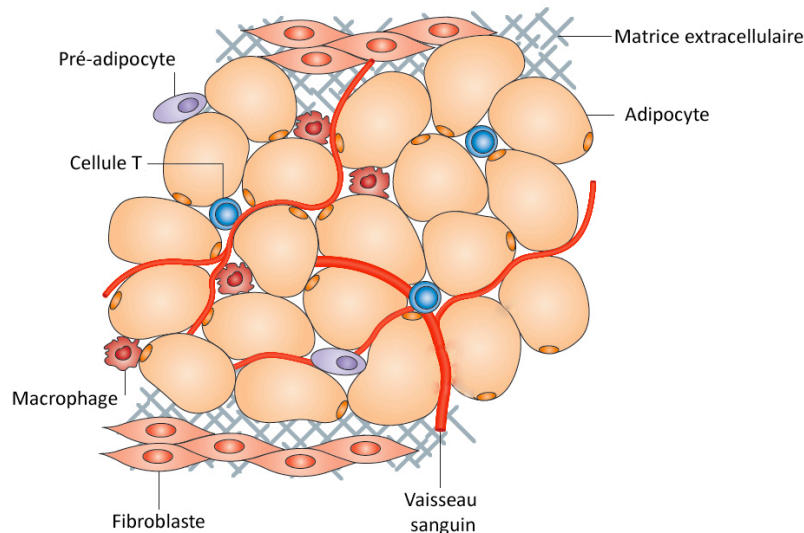


Figure 13. Structure du tissu adipeux blanc.

Le tissu adipeux blanc est composé d'adipocytes et des cellules de la fraction du stroma vasculaire, principalement les cellules immunitaires, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les préadipocytes (Traduit d'après Ouchi, 2011).

2. Développement du tissu adipeux blanc

2.1. Mécanismes généraux de l'adipogenèse

Les adipocytes dérivent des cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules multipotentes peuvent se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, myocytes et en adipocytes. On distingue deux phases dans l'adipogenèse : la détermination et la différenciation. La détermination consiste en la conversion des cellules souches mésenchymateuses en pré-adipocytes. Peu d'informations sont actuellement disponibles sur cette étape. Il semble cependant que la détermination en pré-adipocyte résulte d'une impossibilité à se différencier en d'autres types cellulaires que l'adipocyte : les pré-adipocytes possèdent des caractéristiques morphologiques semblables aux cellules souches mésenchymateuses, mais leur engagement dans la lignée adipogénique ne leur permet plus de se différencier en un autre type cellulaire. La phase de différenciation est mieux connue car les études sur l'adipogenèse sont principalement issues de recherches *in vitro* sur pré-adipocytes (lignées 3T3-L1 principalement). Cette phase correspond donc à l'acquisition par les pré-adipocytes des caractéristiques des adipocytes matures.

Récemment, des études *in vivo* ont permis de localiser les progéniteurs des adipocytes dans le compartiment périvasculaire du tissu adipeux blanc (Gregoire, 2001 ; Rosen, 2006). Il a également été montré qu'il était possible reconstituer une masse adipeuse chez des souris lipodystrophiques en utilisant ces progéniteurs. *In vitro*, la stimulation des pré-adipocytes conduit à leur prolifération et leur différenciation en cellules matures. La différenciation adipocytaire met en jeu de nombreux facteurs de transcriptions parmi lesquels les C/EBP

(CCAAT/Enhancer Binding Proteins), les SREBP (Sterol Regulatory Element binding Protein), les KLF (Kruppel-Like zinc finger transcription factor) ou encore les PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) qui sont à l'heure actuelle considérés comme les principaux facteurs de transcription impliqués dans l'adipogenèse.

Les PPAR sont des facteurs de transcription de la superfamille des récepteurs nucléaires. Leur activation dans le foie des rongeurs induit la prolifération des peroxisomes, ce qui leur a donné leur nom. Il existe trois grands types de PPAR : PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ . Les PPAR γ jouent un rôle prépondérant dans l'adipogenèse : chez l'homme comme chez la souris, on retrouve deux isoformes des PPAR γ : PPAR γ 1 et PPAR γ 2 (Zhu, 1995), qui ne diffèrent que d'une trentaine d'acides aminés. PPAR γ active ses gènes cibles en se fixant aux sites PPAR γ Responsive Element (PPRE), après dimérisation avec le récepteur RXR (9-cis retinoic receptor) (Koppen 2010).

Les deux isoformes PPAR γ 1 et PPAR γ 2 sont fortement exprimées durant la différenciation préadipocytaire (Figure 14). Il a été montré que les PPAR γ permettent la différenciation des adipocytes *in vivo* et *in vitro* (Rosen, 1999). Parmi les ligands exogènes, les thiazolidinédiones (TZD), classe de médicaments anti-diabétiques, sont les plus connus (Lehrke, 2005) : ils permettent l'augmentation des capacités de stockage des lipides dans les adipocytes et donc la diminution des quantités d'acides gras circulants. Il a été montré que les PPAR avaient la capacité de stimuler la différenciation des pré-adipocytes, conduisant ainsi à une augmentation du nombre de petits adipocytes, plus sensibles à l'insuline (Okuno, 1998). Les PPAR γ sont nécessaires pour induire la différenciation cellulaire (Rosen, 1999) et seraient également suffisants pour convertir des cellules non adipeuses en adipocytes (Siersbaek, 2010). Récemment il a été montré que les PPAR γ pouvaient participer au développement du phénotype «brown adipocyte-like» (Elabd, 2009).

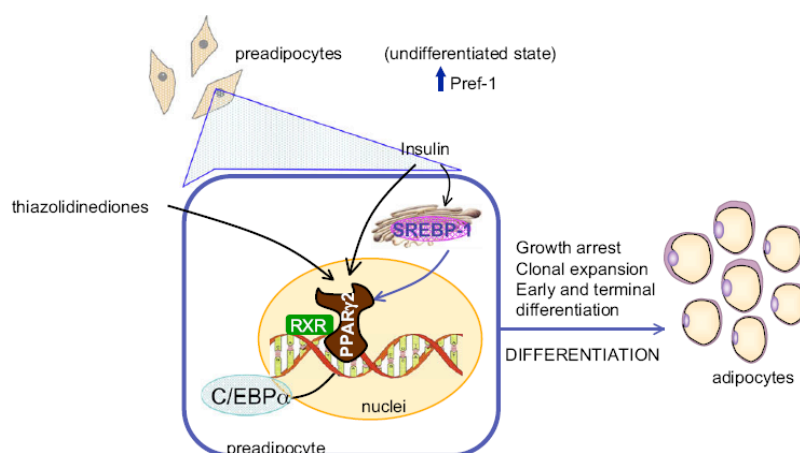


Figure 14. Implication des PPAR γ dans la différenciation adipocytaire.

Dans les préadipocytes, C/EBP et SREBP-1 activent l'expression des PPAR γ . Ces derniers peuvent également être activés par l'insuline et les thiazolidinédiones. (Vazquez-Vela, 2008)

2.2. Développement du tissu adipeux dans l'obésité : hypertrophie ou hyperplasie ?

L'obésité correspond à une augmentation excessive de la masse du tissu adipeux. Cette augmentation peut être due à une hypertrophie ou à une hyperplasie adipocytaires. Les données de la littérature à ce sujet sont parfois contradictoires. Plusieurs études ont montré qu'à l'âge adulte, les variations de masses grasses se traduisent principalement par une variation de la taille et non du nombre des adipocytes : une prise de poids sur plusieurs mois est associée à une augmentation du volume adipocytaire indépendamment du nombre d'adipocytes (Salans, 1973). La perte de poids conduit à une diminution du volume adipocytaire sans modification du nombre d'adipocytes (Spalding, 2008 ; Lofgren, 2005). L'hypertrophie est retrouvée dès le surpoids et précède l'hyperplasie (Arner, 2010). En revanche, l'hyperplasie est caractéristique des obésités sévères ou morbides. Les sujets présentant une hypertrophie adipocytaire ont significativement moins d'adipocytes indépendamment de leur masse grasse totale. La morphologie du tissu adipeux semble également être importante du point de vue clinique : dans une étude réalisée sur une population suédoise, les individus en bonne santé et non-obèses présentant des hypertrophies du tissu adipeux ont un moins bon index d'insulino-sensibilité et une insulïnémie plasmatique à jeun plus élevée que ceux présentant une hyperplasie du tissu adipeux sous-cutané. En outre, l'hypertrophie adipeuse est un facteur de risque indépendant de développer un DT2 (Lonn, 2010). Au niveau moléculaire, l'hypertrophie adipocytaire est associée à une altération des signalisations intracellulaires. *In vitro*, une augmentation de l'activité de NF- κ B a été observée durant la différenciation et l'hypertrophie de cellules 3T3-L1 (Berg, 2004). Une augmentation de la réponse au TNF- α a également été observée dans le tissu adipeux de sujets obèses, or ce phénomène est médié par l'hyperactivation de la voie NF- κ B et diminué par les inhibiteurs de NF- κ B (Maury, 2009). En outre, l'administration d'inhibiteur de NF- κ B à des individus obèses permet une diminution de la glycémie, de l'insulino-résistance et des paramètres inflammatoires (Fleischman, 2008). La taille des adipocytes hypertrophiés peut atteindre 150 à 200 μ m et cette hypertrophie conduit à la dérégulation de la production des adipokines (Skurk, 2007).

L'hypothèse d'une « taille critique des cellules adipeuses » suggère qu'une taille donnée des adipocytes conduit à leur multiplication. A l'heure actuelle, on ne sait pas si l'hyperplasie retrouvée chez les personnes obèses est la conséquence d'un recrutement d'adipocytes à l'âge adulte ou au contraire si elle est le reflet d'une prédisposition à l'obésité (par leur nombre important d'adipocytes avant l'âge adulte). Cependant, des études ont récemment montré l'existence d'un turnover dans les adipocytes : tous les 8 ans environ, 50 % des adipocytes du tissu sous-cutané humain sont ainsi remplacés (Spalding, 2008). Si ce phénomène semble exister chez les individus sains et obèses, il est également lié à la morphologie du tissu adipeux : chez les individus obèses présentant majoritairement une

hypertrophie adipocytaire, on constate une diminution de l'adipogenèse et de la mort cellulaire des adipocytes (Arner, 2010). Cependant, il a été retrouvé chez l'homme et chez la souris des adipocytes apoptotiques et nécrotiques, sans variation de leur nombre (Cinti, 2005), ce qui suggère donc l'existence d'un renouvellement des adipocytes sans diminution de leur nombre. En outre, la nécrose des cellules ainsi que l'activation et le recrutement des macrophages augmentent avec l'IMC. Cette nécrose adipocytaire semble donc jouer un rôle important dans le développement de pathologies liées à l'obésité.

3. Métabolisme lipidique au sein du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux est le principal organe de stockage de l'énergie. Il contient plus de 95 % des lipides de l'organisme sous forme de triglycérides (TG). Moins de 0,1 % des lipides de l'organisme sont retrouvés dans le plasma. Le métabolisme lipidique du tissu adipeux consiste au stockage des lipides sous forme de TG d'une part et à la mobilisation des acides gras lors d'une demande en énergie de l'organisme d'autre part. Ces acides gras seront ensuite oxydés dans le foie, le cœur ou le muscle squelettique et permettront ainsi la synthèse d'ATP. La mobilisation des réserves énergétiques se fait par la lipolyse, c'est-à-dire l'hydrolyse des triglycérides en acides gras et glycérols. Une partie des acides gras libérés par la lipolyse est distribuée aux différents organes sous forme d'acides gras liés à l'albumine. Dans le foie, les acides gras pourront être utilisés pour former de nouveaux triglycérides ou des molécules de VLDL (Very-low-density lipoprotein). Une autre partie des acides gras libérés par la lipolyse (30 à 70 %) est ré-estérifiée au sein de l'adipocyte. La quantité d'acides gras libérée par le tissu adipeux n'est donc pas le reflet de la lipolyse.

3.1. Synthèse des triglycérides

La synthèse des triglycérides est réalisée à partir d'acides gras et de glycérol-3-phosphate. Le glycérol-3-phosphate est obtenu grâce à la glycolyse, la glycéronéogenèse ou par phosphorylation du glycérol par la glycérol kinase. Les acides gras utilisés pour la lipolyse sont soit synthétisés directement dans l'adipocyte à partir de substrats non lipidiques (lipogenèse *de novo*) soit captés par l'adipocyte depuis la circulation sanguine. Les acides gras présents dans la circulation sanguine proviennent eux-mêmes de différentes sources : l'alimentation ou la synthèse *de novo* dans le foie.

3.1.1 Provenance sanguine des acides gras

La digestion des triglycérides présents dans les aliments par les sels biliaires et les sucs pancréatiques aboutit à la libération d'acides gras et de monoglycérides regroupés sous forme de micelles. L'absorption de ces molécules a lieu dans l'intestin. L'association d'acides gras transformés en Acyl-CoA par l'Acyl-CoA synthase avec les monoglycérides permet de

former de nouveaux triglycérides, regroupés dans des chylomicrons. Ces chylomicrons sont la forme de transport des triglycérides issus de l'alimentation.

Les triglycérides issus de la circulation sanguine peuvent également provenir du foie. L'association de deux acides gras synthétisés dans le foie par lipogenèse *de novo* avec une molécule de glycérol permet de former un nouveau triglycéride. Ils sont ensuite libérés sous forme de VLDL dans la circulation sanguine. Il a été estimé que l'alimentation fournissait environ 80 g de lipides par jour et la lipogenèse hépatique, environ 1g (Large, 2004).

Les acides gras utilisés par les adipocytes pour la synthèse de triglycérides proviennent donc en grande majorité du plasma, dans lequel ils circulent sous forme d'acides gras non-estérifiés liés à l'albumine ou sous forme de triglycérides transportés sous forme de VLDL s'ils proviennent du foie ou de chylomicrons s'ils proviennent de l'alimentation. L'hydrolyse des triglycérides transportés sous forme de lipoprotéines est réalisée par la lipoprotéine lipase (LPL) et permet la libération de glycérol et d'acides gras. La LPL est synthétisée précocement lors de la différenciation adipocytaire, mais n'est activée que dans les adipocytes matures (Lafontan, 2008). Le récepteur au VLDL (VLDL-R) joue également un rôle important dans la fixation des lipoprotéines (VLDL et chylomicrons) : une déficience en VLDL-R conduit à une diminution de la masse adipeuse et une résistance à l'obésité induite par la diète chez la souris normale, ainsi qu'à une réduction de l'obésité chez la souris ob/ob.

Les LPL sont synthétisées et sécrétées par les adipocytes. Elles se fixent à la surface des cellules endothéliales des capillaires par interactions avec des glycosaminoglycanes. Les chylomicrons, possédant des domaines chargés positivement vont se fixer aux glycosaminoglycanes de la membrane chargés négativement. Une protéine, la glycoposphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1), localisée à la surface des cellules endothéliales des capillaires du tissu adipeux, du cœur et du muscle squelettique est également associée au processus d'accostage des chylomicrons (Figure 15) : une déficience en GPIHBP1 chez la souris conduit à une élévation des TG plasmatiques et une augmentation du nombre de chylomicrons. L'hydrolyse des triglycérides aboutit à la formation d'acides gras qui une fois libérés vont pénétrer dans les adipocytes par diffusion simple ou grâce à des transporteurs spécifiques : CD36 (Cluster of differentiation), Fatty Acid Translocase Protein ou encore Fatty Acid Binding Protein plasma membrane. Les acides gras, une fois entrés dans le cytoplasme, sont estérifiés en acyl-coenzyme A par l'acyl-coA synthase.

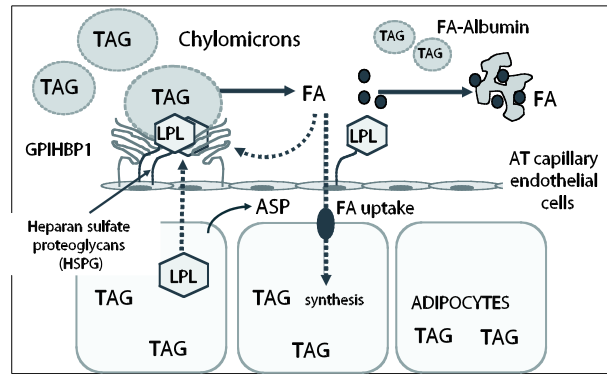


Figure 15. Captation des acides gras issus des chylomicrons.

La protéine GPIHBP1 présente à la surface des cellules endothéliales des capillaires permet l'accostage des chylomicrons. L'hydrolyse des triglycérides (TAG) par la lipoprotéine lipase (LPL) conduit ensuite à la libération d'acides gras. Ces derniers peuvent alors être utilisés pour la synthèse de TAG dans les adipocytes ou se lier à l'albumine et rejoindre la circulation sanguine (Lafontan, 2008).

3.1.2 Lipogenèse *de novo* dans l'adipocyte

Nous avons vu que les acides gras permettant la synthèse de TG dans le tissu adipeux provenaient majoritairement de la circulation sanguine. Cependant, une petite quantité d'acides gras est synthétisée directement dans le tissu adipeux : ils sont issus de la lipogenèse *de novo*.

Chez les mammifères, la lipogenèse *de novo* a lieu principalement dans le foie, le tissu adipeux et dans les glandes mammaires pendant la lactation. Cependant, elle est majoritaire dans le tissu adipeux chez le rat et les petits animaux lorsqu'ils sont soumis à une nourriture riche en carbohydrates et pauvre en lipides. La comparaison des contenus en ARNm montre une plus faible quantité d'ARNm de deux facteurs de transcription contrôlant les voies lipogéniques : sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1) et carbohydrate response element-binding protein (CREBP) (Lafontan, 2008).

La lipogenèse *de novo* nécessite la présence de molécules glucidiques. Dans les adipocytes, l'entrée du glucose via les transporteurs GLUT4 constitue l'une des étapes limitantes de ce processus. Une fois dans la cellule, le glucose est transformé en pyruvate. Celui-ci va ensuite être transformé en acétyl-CoA dans les mitochondries puis après transfert dans le cytoplasme, l'acétyl-CoA va être carboxylé par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et devenir du malonyl-CoA. La polymérisation du malonyl-CoA conduit à la formation d'Acyl-CoA (Lafontan, 2008). L'insuline régule ce processus en augmentant la captation du glucose et en modulant les concentrations intracellulaires en AMPc. De plus, les catécholamines inhibent la lipogenèse en augmentant les concentrations intracellulaires d'AMPc, ce qui conduit à l'inhibition de l'activité de l'ACC.

3.1.3 Mécanismes de synthèse des triglycérides

La synthèse des TG nécessite la présence de glycérol, qui va être transformé en glycérol-3P. Ce glycérol est produit principalement à partir des premières étapes de la glycolyse. Cette étape dépend donc largement de l'insuline, qui permet d'augmenter l'entrée de glucose dans la cellule.

3.2. La lipolyse

La lipolyse consiste en l'hydrolyse des triglycérides : elle permet la libération d'une molécule de glycérol et de trois molécules d'acides gras. Elle est régulée par les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) et les peptides natriurétiques qui l'activent, et l'insuline qui l'inhibe. Elle met notamment en jeu la lipase hormono-sensible (LHS) et l'Adipose triglyceride lipase, qui permettent la conversion de triglycérides en diacylglycérol et acide gras.

L'insuline et les catécholamines régulent l'activité de la LHS en modulant les concentrations intracellulaires en AMPc. Les catécholamines provoquent l'augmentation intracellulaire en AMPc, ce qui entraîne une activation de la Protéine Kinase A et donc une augmentation de la phosphorylation de la LHS, ainsi activée. L'insuline a un rôle inverse.

Les peptides natriurétiques sont sécrétés lors d'une activité physique. Il a été montré *in vivo* et *in vitro* que les peptides natriurétiques (Atrial natriuretic peptide et β -natriurétique peptide) étaient capables d'induire la lipolyse dans les adipocytes humains (Sengenès, 2000), indépendamment de la concentration en AMPc. L'administration d'Atrial natriuretic peptide ou l'augmentation physiologique de sa concentration plasmatique stimulent la mobilisation des lipides et l'action de ces peptides est indépendante des voies des catécholamines et de l'insuline. Les peptides natriurétiques participent donc principalement au contrôle de la lipolyse durant un exercice physique, par un mécanisme indépendant de l'AMPc (Lafontan, 2008).

La modulation de l'activité de la LHS et de l'Adipose triglyceride lipase (Zimmermann, 2004) implique également des protéines de liaison aux lipides, parmi lesquelles la protéine de transport des acides gras (Adipocyte lipid binding protein) et les périlipines. La protéine de transport des acides gras interagit avec la LHS et permet l'exportation vers l'extérieur de la cellule des acides gras issus de la lipolyse. Les périlipines empêchent la lipolyse en bloquant l'accès des lipases aux triglycérides. Leur phosphorylation entraîne un remodelage de la surface de la gouttelette lipidique qui permet l'accès de la LHS, ainsi que la libération d'une protéine modulant l'activité de l'Adipose triglyceride lipase (Lafontan, 2008). La lipolyse est différente suivant les tissus adipeux considérés : les adipocytes du tissu adipeux viscéral ont une activité lipolytique plus importante que ceux du tissu adipeux sous-cutané. L'hypothèse « portale » suggère ainsi que l'accumulation

intrahépatique d'acides gras est due aux acides gras libérés par le tissu adipeux viscéral et directement déversés dans le foie *via* la veine porte (Lafontan, 2008). Les différences de réponse à l'insuline et aux catécholamines entre le tissu adipeux viscéral et le tissu adipeux sous-cutané semblent être responsables de cette modulation de la lipolyse. La diminution de la capacité du récepteur à l'insuline à s'autophosphoryler et de l'efficacité de la transduction du signal par IRS-1 et PI3K a été mise en évidence dans les adipocytes du tissu adipeux viscéral (Zierath, 1998). Les catécholamines ont également un effet moins important sur la lipolyse dans les adipocytes sous-cutanés que dans les adipocytes viscéraux (Wajchenberg, 2000)

3.2.1 Rôle des PPAR dans le métabolisme adipocytaire

Les PPAR γ contrôlent l'expression de gènes impliqués dans les différentes fonctions adipocytaires : transport et métabolisme des lipides, production d'adipokines mais également signalisation de l'insuline (Lehrke, 2005). Il a été montré que plus de 5000 régions pouvaient fixer PPAR γ dans le génome de cellules 3T3-L1 différenciées. Les gènes cibles des PPAR γ sont impliqués dans différents processus de régulation du métabolisme lipidique : le transport des lipides *via* FABP4, la captation des acides gras, le recyclage intracellulaire des acides gras *via* PEPCCK (Phosphoénolpyruvate carboxykinase) et la lipolyse (Koppen, 2010).

Les ligands des PPAR sont encore mal connus mais les acides gras et leurs dérivés en sont des activateurs endogènes, bien que leur affinité pour PPAR γ soit faible. Le rôle exact de ces activateurs n'est cependant pas encore déterminé.

4. Fonction endocrine

Longtemps considéré comme un unique tissu de réserve, le tissu adipeux s'est révélé être un véritable organe endocrine. Les cellules adipeuses ainsi que les cellules du stroma vasculaire participent à la libération de molécules dont les modes d'action sont à la fois autocrine et paracrine. La production de ces molécules fait du tissu adipeux un acteur essentiel dans la régulation du métabolisme et de l'homéostasie énergétique (Rosen, 2006). Le terme d'adipokine a initialement été utilisé pour désigner les molécules synthétisées et sécrétées par les adipocytes. Par extension, il est souvent utilisé pour désigner les molécules sécrétées par le tissu adipeux en général (Trayhurn, 2004). Plusieurs dizaines d'adipokines sont connues actuellement ; nous nous intéresserons plus particulièrement à l'adiponectine et à la leptine.

4.1. Adiponectine

4.1.1 Structure

L'adiponectine (également appelée Acrp30, AdipoQ, apM1 ou GBP28) a été découverte simultanément par quatre équipes de recherche indépendantes durant les années

1990. Chez l'homme, le gène de l'adiponectine est situé sur le chromosome 3q27. L'adiponectine est une protéine de 247 acides aminés, incluant un domaine globulaire C-terminal et un domaine collagène N-terminal. Elle présente en outre une homologie structurale avec le facteur du complément 1q. L'adiponectine plasmatique est retrouvée sous forme de multimères, combinés via le domaine collagène pour former 3 principales formes circulantes (Figure 16) : une forme de haut poids moléculaire (12 à 18 protomères), une forme de poids moléculaire intermédiaire (hexamère), une forme de poids moléculaire faible (trimère). Une forme tronquée d'adiponectine, qui contient le domaine globulaire après clivage protéolytique est également présente dans le plasma en faible quantité.

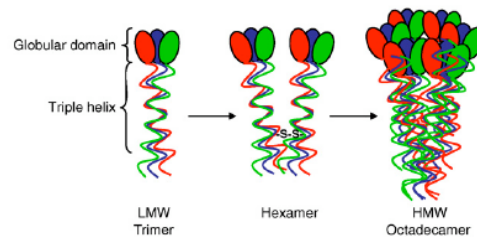


Figure 16. Différentes formes de l'adiponectine.

L'adiponectine circulante est retrouvée sous différentes formes : trimères de faible poids moléculaire (LMW), hexamères et octadécamères de haut poids moléculaire (HMW). Une forme globulaire est également détectée dans le plasma en faible quantité (Galic, 2010).

4.1.2 Récepteurs de l'adiponectine

Deux récepteurs à l'adiponectine (AdipoR) ont été décrits : AdipoR1 et AdipoR2. Ces deux protéines possèdent 7 domaines transmembranaires, avec une région N-terminale interne et une région C-terminale externe. L'expression d'AdipoR1 est ubiquitaire, avec une large proportion dans le muscle. AdipoR2 est principalement exprimé dans le foie. La présence d'AdipoR1 et AdipoR2 a également été démontrée dans le cœur (Ding, 2007). En se liant à ses récepteurs, l'adiponectine active plusieurs cascades de signalisation intracellulaires, qui aboutissent à la phosphorylation d'AMPK (AMP-activated protein kinase). Ceci conduit à une augmentation de l'oxydation des acides gras, une augmentation de la captation du glucose dans le muscle et une diminution de la gluconéogenèse dans le foie. Des études sur des animaux knockout ou présentant une surexpression des récepteurs à l'adiponectine ont montré que ces protéines jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme du glucose et des lipides, dans l'inflammation et dans le stress oxydatif. AdipoR1 agit sur l'insulino-sensibilité via l'activation de l'AMPK. D'autres études ont montré que l'activité physique régule positivement l'expression des récepteurs à l'insuline, ce qui pourrait expliquer en partie le rôle de l'adiponectine dans l'amélioration de l'insulino-sensibilité liée à l'exercice physique (Bluher, 2007).

4.1.3 Action de l'adiponectine

La concentration plasmatique en adiponectine varie entre 3 et 30 mg.L⁻¹ chez le sujet sain et cette protéine représente 0,01 % des protéines plasmatiques (Ouchi, 2011). L'expression des ARNm de l'adiponectine varie suivant la localisation du tissu adipeux : elle est moins importante dans le tissu adipeux viscéral que dans le tissu adipeux sous-cutané, à la fois chez le sujet sain et chez le sujet obèse (Lihn, 2004). Bien que l'adiponectine soit sécrétée presque exclusivement par les adipocytes, certaines études ont montré la capacité des cardiomyocytes humains et murins à la synthétiser et à la sécréter (Ding, 2007). *In vitro*, des études réalisées sur des cardiomyocytes de rats ont permis de montrer l'efficacité biologique de l'adiponectine produite par ces cardiomyocytes et de mettre en évidence son rôle protecteur sur des cellules soumises à une simulation d'ischémie-reperfusion (Wang, 2010). Une étude réalisée sur des myocytes de souris *in vitro* a montré également la production d'adiponectine par les cellules musculaires (Krause, 2008). Dans les adipocytes, l'expression de l'adiponectine est augmentée par les PPAR γ .

L'adiponectine est une des rares adipokines qui prévient le développement de l'insulino-résistance et de l'obésité. L'expression de l'adiponectine est diminuée chez les animaux obèses et insulino-résistants (Hu, 1996) et plusieurs études ont mis en évidence le lien entre hypoadiponectinémie et diabète, hypertension, athérosclérose et dysfonction endothéliale (Rasouli, 2008). La surexpression d'adiponectine dans le tissu adipeux conduit à l'amélioration de l'insulino-sensibilité systémique. A l'inverse, une mutation entraînant la perte de fonction sur un gène de l'adiponectine ou de ses récepteurs conduit à une diminution de la sensibilité à l'insuline (Nawrocki, 2006). Une étude réalisée sur 23 sujets caucasiens et 121 sujets indiens Pima montre une corrélation négative entre la concentration en adiponectine et le pourcentage de poids corporel, le ratio taille sur hanche et la concentration en insuline plasmatique à jeun (Weyer, 2001). L'adiponectine exerce également un effet vasculo-protecteur précoce dans l'athérogenèse en régulant l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules vasculaires endothéliales, la transformation des macrophages en cellules spumeuses et en modulant la prolifération des cellules musculaires lisses (Antuna-Puente, 2008). L'isoforme de l'adiponectine semble avoir une importance dans son rôle de protection contre le DT2 ou l'obésité : l'augmentation du ratio adiponectine de haut poids moléculaire/adiponectine totale est corrélée avec l'amélioration de la sensibilité à l'insuline suite à un traitement insulino-sensibilisateur chez l'homme ou chez la souris diabétique de type 2 (Pajvani, 2004). Ces résultats ont été confirmés par plusieurs autres études chez l'homme ou chez l'animal (Wang, 2008). En outre, le domaine globulaire de l'adiponectine serait capable d'augmenter le transport du glucose et l'oxydation des lipides dans le muscle squelettique via l'activation de l'AMPK et l'inhibition de l'acétyl-CoA carboxylase (Tomas 2002 ; Yamauchi, 2002). De nombreux travaux ont été réalisés sur les interactions entre l'adiponectine et le TNF- α . Des études réalisées *in vitro* ont montré la capacité de

l'adiponectine à diminuer la production de TNF- α et d'IL-6 par les macrophages (Ouchi, 2000). Ces résultats suggèrent que les propriétés anti-inflammatoires de l'adiponectine pourraient découler de son effet régulateur sur le TNF- α . L'expression de l'adiponectine chez l'homme est également modulée par le TNF- α et l'interleukine 6 (Bruun, 2003).

4.2. Leptine

4.2.1 Structure et sécrétion

La leptine, du grec *leptos* signifiant mince, a été découverte en 1994 chez des souris obèses ob/ob (Zhang, 1994). Cette protéine de 16 kDa, produit du gène ob, a longtemps été considérée comme « l'hormone de la satiété », puisqu'elle régule le métabolisme énergétique en augmentant la dépense énergétique et en diminuant la prise alimentaire. A l'inverse, une diminution du signal de la leptine augmente la prise énergétique et diminue la dépense énergétique. Lors de la découverte du gène de la leptine, l'hypothèse d'une cause génétique à l'obésité s'est fortement développée. Chez la souris, une mutation sur le gène de la leptine (souris ob/ob) ou de son récepteur (souris db/db) conduit au développement d'une obésité sévère. Un traitement à la leptine chez des souris ob/ob permet la réduction de la prise alimentaire, l'augmentation de la dépense énergétique et la diminution de la masse corporelle. Les rats hétérozygotes pour la mutation du gène du récepteur à la leptine présentent un phénotype intermédiaire entre les rats sauvages et les rats homozygotes pour cette mutation (Lago, 2007). Cependant, il est apparu rapidement que les mutations sur le gène de la leptine ou le gène du récepteur à la leptine étaient rares chez l'homme. La leptine est majoritairement sécrétée par le tissu adipeux, particulièrement par les adipocytes. Sa sécrétion dépend du tissu adipeux considéré : elle est plus élevée dans le tissu adipeux sous-cutané que dans le tissu adipeux viscéral (Montague, 1998).

4.2.2 Récepteurs à la leptine et signalisation intracellulaire

Les récepteurs à la leptine issus des gènes lepr chez l'homme font partie de la famille des récepteurs aux cytokines de classe 1. Ils sont présents dans différents organes parmi lesquels le foie, le muscle squelettique, le cœur, le pancréas ou encore le poumon. Ces récepteurs possèdent un domaine extracellulaire de liaison au ligand, un domaine transmembranaire simple et un domaine de signalisation cytoplasmique. L'épissage alternatif de lepr donne 6 isoformes du récepteur : une forme longue (ObRb ou LEP-Rb), une forme courte qui comprend 4 isoformes (ObRa, ObRc, ObRd et ObRf) et une forme circulante soluble (ObRe) (Vazquez-Vela, 2008). L'isoforme LEP-Rb, quasiment ubiquitaire possède un long domaine cytoplasmique d'environ 300 acides aminés qui contient plusieurs sites de fixation pour des protéines nécessaires à la transmission du signal (Fruhbeck, 2006). Les

formes courtes du récepteur ne contiennent que 30 à 40 acides aminés intracellulaires et jouent un rôle moindre dans la transduction du signal (Robertson, 2008).

La fixation de la leptine sur le domaine extracellulaire du récepteur ObRb conduit à l'activation de la tyrosine kinase Jak2 associée au récepteur (pour revue, Myers, 2010), ce qui induit une phosphorylation du récepteur sur plusieurs résidus tyrosine et de Jak2. L'activation de Jak2 conduit à sa phosphorylation et à celle de plusieurs résidus tyrosine de ObRb : Tyr₉₈₅, Tyr₁₀₇₇, Tyr₁₁₃₈. La phosphorylation de Tyr₁₁₃₈ active le facteur de transcription STAT3 : celui-ci se dimérise et est transloqué vers le noyau où il induit la transcription de gènes impliqués dans la régulation de la dépense énergétique et la régulation de la prise alimentaire en supprimant l'expression de gènes oréxigènes (Bates, 2003). STAT3 permet également la transcription de SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling-3), un inhibiteur de la signalisation intracellulaire à la leptine. SOCS3 se fixe aux protéines Jak phosphorylées ou interagit directement avec les tyrosines phosphorylées du récepteur à la leptine. SOCS3 permet donc un feedback négatif dans la signalisation à la leptine. L'activation de Tyr₁₀₇₇ conduit à l'activation du facteur de transcription STAT5. La phosphorylation de la Tyr₉₈₅ permet le recrutement de SHP2 qui contrôle l'activation de ERK, ainsi que celui de SOCS3, un inhibiteur de la signalisation via ObRb/Jak2 (Figure 17).

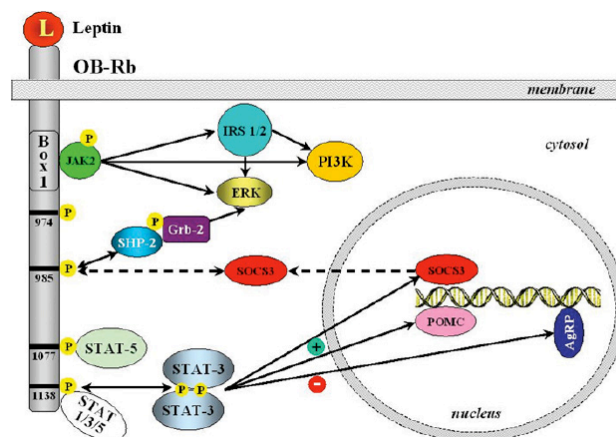


Figure 17. Signalisation à la leptine médiée par le récepteur ObRb.

Le récepteur à la leptine ObRb contient 4 résidus tyrosines impliqués dans la signalisation à la leptine. Le résidu tyrosine 1138 permet l'activation des facteurs de transcription STAT3 qui, une fois dimérisés sont transloqués dans le noyau. Ils activent alors l'expression de SOCS3 et de POMC (peptide anorexigénique) et inhibent celle d'AgRP (peptide oréxigénique). Les protéines SOCS3 sont impliquées dans l'inhibition du signal à la leptine.

4.2.3 Rôle de la leptine dans la régulation de l'homéostasie énergétique

La prise alimentaire, le stockage des réserves énergétiques et le niveau d'activité physique sont régulés par différents processus physiologiques et résultent de l'intégration de plusieurs signaux nerveux, hormonaux et métaboliques qui conduisent à des adaptations

comportementales et métaboliques. Le cerveau et particulièrement l'hypothalamus ont donc un rôle majeur dans cette régulation.

L'administration locale de leptine dans les régions hypothalamiques réduit le poids et la prise alimentaire chez la souris (Campfield, 1995). La communication entre le tissu adipeux et le cerveau se fait principalement via la sécrétion de leptine, bien que d'autres molécules sécrétées par le tissu adipeux participent à la régulation de la balance énergétique (adiponectine, resistine, TNF- α) (Trayhurn, 2004).

Le noyau arqué de l'hypothalamus contient deux populations agissant de façon antagoniste dans la régulation de la prise alimentaire. Les neurones stimulant la prise alimentaire sécrètent l'Agouti-related peptide et le Neuropeptide Y, deux neuropeptides orexigéniques. Les neurones à Pro-opio-mélanocortine (POMC) et à Cocain and amphetamine-regulated transcript (CART) sont responsables de l'activité anorexigénique de l'hypothalamus. Ces deux populations expriment le récepteur à la leptine. La leptine agit sur ces neurones de l'hypothalamus en inhibant les peptides orexigéniques et en stimulant les peptides anorexigéniques. Elle module ainsi la prise alimentaire en initiant un signal de satiété. L'administration de leptine supprime l'activité AMPK dans les noyaux paraventriculaires et arqués de l'hypothalamus (Minokoshi, 2002), ce qui confirme le rôle de l'AMPK dans la signalisation induite par la leptine. La leptine a également un effet sur le noyau du tractus solitaire du tronc cérébral pour contribuer au signal de satiété, avec les peptides gastriques GLP-1 et CCK (Cholecystokinin).

La leptine régule également la glycémie. Un traitement avec de faibles doses de leptine, administré à des souris déficientes pour le gène de la leptine ou celui de son récepteur, permet la restauration d'une glycémie normale. De même, la restauration sélective dans le noyau arqué de l'expression du récepteur à la leptine conduit à une diminution légère de l'obésité et à une normalisation de la glycémie. Les neurones POMC sont impliqués dans cette régulation et le VMH pourrait être également impliqué. Enfin, la leptine pourrait être impliquée via le système nerveux autonome dans la régulation de la production hépatique de glucose (Robertson, 2008).

4.2.4 Rôle de la leptine sur le métabolisme lipidique

Découverte pour son implication dans la régulation de la prise alimentaire, la leptine possède également des fonctions paracrines et autocrines et influe sur la synthèse et la dégradation des lipides. Son rôle dans la régulation du métabolisme énergétique a été démontré sur des adipocytes isolés de souris : un traitement à la leptine augmente la lipolyse dans les adipocytes des animaux sauvages ou déficients pour le gène de la leptine mais n'a pas d'effet sur les animaux déficients pour ce gène (Fruhbeck, 1997). Une étude réalisée

ultérieurement sur des adipocytes d'animaux pré-traités avec différentes concentrations de leptine a montré des résultats concordants (Fruhbeck, 1998).

Le contrôle du métabolisme lipidique par la leptine s'observe dans tous les tissus capables de stocker les triglycérides. La stimulation du système mélanocortine conduit à la lipolyse indépendamment de ses effets sur le comportement alimentaire, via le système nerveux sympathique (Marcelin, 2010). La leptine stimule l'oxydation des acides gras (Minokoshi, 2002) et la captation du glucose et elle régule l'accumulation lipidique dans le tissu adipeux (Maury, 2010). La leptine stimule directement la phosphorylation et l'activation de la sous unité catalytique α -2 de l'AMPK dans le muscle squelettique, augmentant la phosphorylation de l'acetyl-CoA carboxylase (ACC) et l'oxydation des acides gras (Zhang, 2010). Dans les adipocytes, la leptine inhibe la synthèse d'ACC, qui permet la conversion des carbohydrates en acides gras à chaîne longue et est impliquée dans la synthèse des triglycérides. Le leptine réduit également l'effet lipogénique de l'insuline : expérimentalement, l'ajout d'insuline dans le milieu de culture d'adipocytes déficients en leptine augmente la synthèse d'ACC, d'acides gras et de triglycérides de manière plus importante que l'ajout d'insuline dans le milieu de culture d'adipocytes produisant de la leptine (Bai, 1996 ; Walder, 1997). Dans le muscle squelettique, l'augmentation de la synthèse de TG et la diminution de l'oxydation induite par l'insuline sont atténuées par l'administration simultanée de leptine (Muio, 1999). La leptine semble également jouer un rôle via son action sur les PPAR γ qui régulent positivement les FABPs.

4.2.5 La leptine dans l'obésité et l'insulino-résistance

Chez l'homme comme chez le rongeur, les niveaux de leptine circulante sont corrélés avec la masse corporelle et la masse adipeuse, mais ils sont aussi dépendants du statut nutritionnel du sujet : la concentration en leptine décroît rapidement après le début du jeûne (Becker, 1995). Les niveaux plasmatiques en leptine suivent un rythme circadien, avec un maximum entre minuit et le début de matinée : les caractéristiques pulsatiles sont identiques chez les sujets obèses et minces mais l'amplitude des pics est plus importante chez les sujets obèses (Dardeno, 2010). La leptine augmente l'insulino-sensibilité en réduisant les lipides intra-musculaires, hépatiques et des cellules β -pancréatiques. Chez l'homme, la leptinémie est corrélée positivement avec l'insulinémie (Boden, 1997). L'importance de la leptine a également été montrée expérimentalement : des souris transgéniques déficientes pour le récepteur à la leptine dans le tissu adipeux présentent des anomalies métaboliques associées à l'obésité et/ou à l'insulino-résistance, parmi lesquelles une adiposité exacerbée, une hyperinsulinémie, une diminution de la tolérance au glucose. Elles sont également plus sensibles à un régime hyperlipidique et développent rapidement une obésité et une insulino-résistance sévères (Huan, 2003).

4.2.6 Résistance à la leptine

Chez l'homme, l'obésité est caractérisée par des taux élevés de leptine circulante : en dépit de ces concentrations importantes qui devraient réduire la prise alimentaire, les individus sont résistants à l'action de la leptine et leur masse corporelle reste élevée. Des injections de leptine recombinante à haute dose chez des patients obèses ont conduit à une diminution de la prise alimentaire mais n'ont pas eu d'effet sur la dépense énergétique (Westerterp-Plantenga, 2001). Ce phénomène de résistance à la leptine pourrait être lié à un défaut de fonctionnement de son récepteur. Il a été établi que le blocage du signal à la leptine dépend de l'activation de la phosphatase SOCS3 qui interfère avec la phosphorylation de Jak2. Cette protéine est fortement exprimée dans l'obésité induite par une nourriture riche en gras, ce qui pourrait expliquer la diminution de l'action de la leptine et l'apparition de la résistance à la leptine (Vazquez-Vela, 2008). D'autre part, chez le rat mâle, une diminution de la sensibilité à la leptine est associée à une diminution de l'expression du récepteur Ob-Rb dans les tissus adipeux mésentérique et rétropéritonéal (Priego, 2009).

4.3. Autres molécules secrétées

En plus de l'adiponectine et la leptine, des dizaines d'autres adipokines sécrétées par les adipocytes. Certaines sont sécrétées par les adipocytes, d'autres par les cellules de la fraction du stroma vasculaire, en particulier les macrophages. Le paragraphe suivant ne dresse pas une liste exhaustive des molécules sécrétées par le tissu adipeux, mais a pour but de donner une idée de la diversité de ces molécules.

Le TNF- α est synthétisé sous forme de protéine transmembranaire de 26 kDa, clivée par une métalloprotéase pour donner une molécule soluble de 17 kDa. Bien que les adipocytes isolés soient capables de produire du TNF- α , ce sont principalement les macrophages du tissu adipeux viscéral qui sécrètent le TNF- α dérivé du tissu adipeux. On observe une augmentation de la quantité d'ARNm du TNF- α dans le tissu adipeux d'animaux obèses ou diabétiques de type 2 (Hotamisligil, 1993). Chez l'homme, l'augmentation du TNF- α dans le plasma et dans le tissu adipeux des individus obèses est également observée ; une réduction de la masse corporelle d'individus obèses est associée à une diminution de l'expression de cette protéine. Des études visant à tester l'effet de la neutralisation du TNF- α chez des individus diabétiques de type 2 et obèses n'ont pas permis de mettre en évidence une amélioration de la tolérance au glucose ou de la sensibilité à l'insuline. En revanche, chez des individus n'ayant pas de traitement spécifique pour le diabète de type 2, le TNF- α améliore la sensibilité à l'insuline (Tam, 2007). L'expression du TNF- α est en outre diminuée par les PPAR γ . L'implication du TNF- α dans l'insulino-résistance sera discutée dans un chapitre ultérieur. Le TNF- α possède une activité lipolytique et diminue le recrutement et la différenciation des préadipocytes (Cawthorn, 2008).

L'**interleukine 6** (IL-6) est une protéine pro-inflammatoire dont un tiers des taux circulants provient du tissu adipeux. Dans ce tissu, elle est principalement sécrétée par les cellules de la fraction stromale et son expression est 2 à 3 fois plus importante dans le tissu adipeux viscéral que dans le tissu adipeux sous-cutané. La production de l'IL-6 par le tissu adipeux ainsi que ses niveaux circulants sont augmentés chez les individus obèses. L'augmentation de la production d'IL-6 est observée chez des souris nourries avec une nourriture riche en graisse et favorise l'apparition d'une insulino-résistance hépatique. Cependant, plusieurs études ont montré que l'augmentation des niveaux tissulaires et circulants d'IL-6 lors d'un exercice ont un effet insulino-sensibilisateur sur le muscle squelettique (Maury, 2010).

La **résistine** est également une protéine sécrétée par le tissu adipeux. Son rôle est cependant plus controversé. Chez la souris, la résistine est produite dans les adipocytes; chez l'homme, cette protéine est principalement exprimée par les macrophages et les monocytes et assez peu par les adipocytes (Ouchi, 2010). Sa production est augmentée avec l'apport de nourriture et avec l'obésité. Cette protéine est retrouvée sous deux formes : une forme trimérique, étroitement liée à l'apparition de l'insulino-résistance hépatique et une forme hexamérique, plus abondante (Patel, 2004). En grande concentration, elle induit une insulino-résistance hépatique importante et augmente la production de glucose chez le rongeur. Dans les adipocytes, la modulation du métabolisme du glucose par la résistine est liée à l'activation de SOCS3, inhibiteur du signal insulinique (Steppan, 2005) et pourrait inhiber l'effet de la leptine en modulant l'AMPK. Chez l'homme, la résistine pourrait avoir un rôle dans le développement de l'athérosclérose en jouant sur les cellules vasculaires endothéliales et sur l'homéostasie lipidique. En outre, la résistine agit sur les cellules endothéliales en activant l'expression des gènes codant VCAM1 et ICAM1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), augmentant ainsi l'adhésion des leucocytes.

La protéine **MCP-1** (Monocyte chemoattractant protein-1) est une chimiokine impliquée notamment dans le recrutement des monocytes au sein du tissu adipeux². Dans ce tissu, MCP-1 est principalement sécrétée par les cellules de la fraction du stroma vasculaire bien que les adipocytes en produisent une petite quantité. Son expression est plus importante dans le tissu adipeux viscéral que dans le tissu adipeux sous-cutané (Maury, 2010 ; Bruun, 2005). Les niveaux circulants et tissulaires de MCP-1 sont élevés chez les individus obèses. *In vitro*, la captation du glucose sous insuline est diminuée dans les adipocytes différenciés traités avec MCP-1 (Maury, 2010).

La protéine **RBP-4** (Retinol binding protein 4) est majoritairement sécrétée par le foie, mais elle est également sécrétée par les adipocytes et les macrophages. Chez les individus obèses ou insulino-résistants, sa sécrétion adipocytaire provient principalement du tissu

² Voir paragraphe V.2.

adipeux viscéral, ce qui en fait un marqueur de l'obésité abdominale (Ouchi, 2011). Chez l'homme, les concentrations en RBP-4 sont corrélées avec l'insulino-résistance mais également avec différents paramètres du syndrome métabolique : hypertension, hypercholestérolémie, faible taux de HDL et augmentation de l'IMC (Graham, 2006). Son expression est inversement corrélée avec celle des GLUT4 et l'injection de cette molécule à des souris saines réduit leur sensibilité à l'insuline et altère la signalisation insulinique dans le muscle squelettique (Yang, 2005).

La **visfatine** est exprimée par de nombreux types cellulaires. Récemment, son expression par le tissu adipeux, principalement viscéral, a été démontrée. On retrouve des taux circulants élevés en visfatine chez les individus obèses et diabétiques de type 2. L'expression de cette protéine est corrélée positivement avec les concentrations en IL-6, en C-reactive protein (CRP) et en HDL-cholestérol. Enfin, la visfatine induit la production de plusieurs molécules de l'inflammation (IL-6, TNF- α) par les monocytes CD14⁺ (Ouchi, 2011).

La **Vaspine** est une sérine protéase inhibitrice, produite par les adipocytes du tissu adipeux viscéral. L'administration de vaspine à des souris obèses permet l'amélioration de leur tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline (Lago, 2007). La vaspine diminue la production de résistine, leptine et TNF- α .

L'**omentine** et la **chemerine** sont deux adipokines récemment découvertes. L'omentine doit son nom à sa sécrétion par le tissu adipeux omental. Cette protéine est principalement sécrétée par les cellules de la fraction du stroma vasculaire (en particulier les macrophages). Ses concentrations circulantes sont diminuées chez les sujets diabétiques et intolérants au glucose. Elle augmente le transport du glucose stimulé par l'insuline dans les tissus adipeux sous-cutané et omental. *In vitro*, elle augmente la phosphorylation d'Akt dans les adipocytes humains (Yang, 2006). La chemerine est une protéine principalement exprimée dans le foie et dans le tissu adipeux dans lequel elle est principalement produite par les adipocytes. Elle est impliquée dans la différenciation adipocytaire et module l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du glucose et des lipides : glut4, fatty acid synthase et adiponectine (Goralski, 2007). *In vitro*, la chemerine augmente la captation du glucose stimulée par l'insuline et la phosphorylation d'IRS-1 (Takahashi, 2008). Son expression est diminuée dans le tissu adipeux épидidymal des souris ob/ob (Takahashi, 2008) mais son expression et celle de son récepteur sont augmentées en réponse à une alimentation riche en graisses chez la souris (Roh, 2007). Chez l'homme, les niveaux circulants en chemerine ne sont pas significativement différents entre les individus sains et les individus diabétiques de type 2 (Bozaoglu, 2007).

Plus récemment, la protéine **Sfrp5** a été caractérisée comme une adipokine anti-inflammatoire, dont la sécrétion est principalement adipocytaire. L'expression de cette

protéine est diminuée chez les souris ob/ob et chez les rats Zucker obèses et diabétiques. Les souris déficientes en Sfrp5 nourries avec un régime enrichi en lipides et en glucides présentent une intolérance au glucose sévère et une stéatose hépatique. Cette protéine jouerait un rôle protecteur contre le développement des perturbations associées au syndrome métabolique (Ouchi, 2010).

Le **tissu adipeux blanc** est non seulement le principal lieu de stockage de l'énergie dans l'organisme mais aussi un tissu doté d'une activité endocrine importante. Les **adipokines**, molécules sécrétées par le tissu adipeux, sont impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique, de la prise alimentaire, de la différenciation adipocytaire ou encore dans certains phénomènes inflammatoires. La croissance excessive du tissu adipeux conduit à une dérégulation de la production de ces molécules qui participe à l'apparition des perturbations métaboliques liées à l'obésité. Parmi les molécules sécrétées, nous retiendrons particulièrement l'**adiponectine** dont la sécrétion est fortement diminuée chez les individus obèses et la **leptine** dont la sécrétion est augmentée dans les mêmes conditions.

V. INFLAMMATION DU TISSU ADIPEUX, LIEN ENTRE L'INSULINO-RESISTANCE ET L'OBESITE

L'excès de masse adipeuse est associé à une augmentation des concentrations sanguines en CRP (Visser, 1999), molécule sécrétée en partie par le tissu adipeux (Ouchi, 2003), qui témoigne de l'inflammation de bas-grade caractéristique de l'obésité. Cette inflammation a des effets sur le tissu adipeux, mais aussi sur d'autres organes puisqu'elle contribue au développement de perturbations dans le foie, le pancréas, les muscles, le cerveau ou le système cardiovasculaire. La compréhension du développement de l'inflammation mais également de ses conséquences est donc d'un grand intérêt.

1. Dérégulation de la production d'adipokines

Comme nous venons de le voir, le tissu adipeux sécrète de nombreuses molécules, impliquées notamment dans la régulation de la prise alimentaire, de la dépense énergétique ou encore la croissance du tissu adipeux. Les changements morphologiques du tissu adipeux liés à l'obésité conduisent à la dérégulation de la sécrétion de ces molécules : le nombre d'adipocytes mais aussi leur taille sont directement reliés à l'expression et à la sécrétion des adipokines (Skurk, 2007). Le recrutement dans le tissu adipeux d'autres types cellulaires (comme les macrophages) sécrétant eux aussi des adipokines participe également à la dérégulation de la production d'adipokines (Permana, 2006).

La surexpression du TNF- α dans le tissu adipeux d'individus obèses et la diminution de l'expression de cette protéine lors d'une perte de poids a permis pour la première fois de montrer un lien entre inflammation, obésité et production d'adipokine (Kern, 1995). Le lien avec l'insulino-résistance a par la suite été suggéré par des études sur des souris *ob/ob* déficientes ou non en TNF- α et en récepteur au TNF- α : la neutralisation du signal TNF- α conduit à l'amélioration du signal insulinique dans le muscle squelettique et dans le tissu adipeux et à une augmentation de l'insulino-sensibilité (Uysal, 1997). Aujourd'hui, il apparaît que la quasi-totalité des adipokines est impliquée dans l'inflammation liée à l'augmentation de la masse adipeuse et joue un rôle dans le développement de l'insulino-résistance (Tilg, 2006), certaines molécules ayant un rôle « protecteur » et d'autres un rôle délétère. Parmi les molécules pro-inflammatoires impliquées dans l'inflammation chronique, on retrouve certaines interleukines : IL-6, IL-1 β , MCP-1 ou encore le TNF- α .

Le TNF- α est certainement la cytokine pro-inflammatoire pour laquelle le plus d'informations sont disponibles. Un traitement chronique au TNF- α diminue la captation du glucose stimulée par l'insuline dans le muscle squelettique de rats. Le rôle du TNF- α dans le développement de l'insulino-résistance semble être dû principalement à son action sur la signalisation insulinique. Le TNF- α diminue la phosphorylation (activée par l'insuline) du

résidu tyrosine du récepteur à l'insuline et d'IRS1 dans les muscles et le tissu adipeux. L'inhibition de la capacité de signalisation d'IRS est liée à l'activation de sérines kinases comme JNK ou inhibiteur of NF- κ B kinase (IKK) et à l'augmentation de l'expression de SOCS3. Le TNF- α réduit également l'oxydation des acides gras dans les hépatocytes et le muscle squelettique, via la suppression de l'AMPK : cette diminution de l'oxydation des acides gras est accompagnée d'une accumulation de diacylglycérols qui activent la protéine kinase C et inhibent la fonction d'IRS (Galic, 2010). Localement, le TNF- α inhibe la différenciation adipocytaire en agissant sur C/EBP et PPAR. Le TNF- α induit également l'apoptose adipocytaire (Goossens, 2008). Expérimentalement, le TNF- α augmente la lipolyse.

Les niveaux plasmatiques d'interleukine 6 sont également augmentés chez les sujets diabétiques de type 2 et les taux plasmatiques d'IL-6 sont corrélés positivement avec l'IMC et avec la concentration plasmatique en acides gras libres. Une perte de poids entraîne une diminution des niveaux d'IL-6 (Ouchi, 2011). L'IL-6 est impliquée dans l'inhibition du signal insulinique dans les hépatocytes et les adipocytes, puisqu'elle augmente l'expression de SOCS-3. Chez les souris, l'injection d'IL-6 diminue la capacité de l'insuline à supprimer la production de glucose par le foie. Cependant, la déficience en IL-6 augmente l'insulino-résistance hépatique et l'inflammation chez des souris nourries avec un régime enrichi en calories (Matthews, 2010). Des études récentes montrent que l'IL-6 peut augmenter la captation du glucose et l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique (Galic, 2010).

Bien que le rôle de la résistine soit controversé dans le développement de l'obésité et des maladies qui lui sont associées, cette molécule possède des propriétés pro-inflammatoires puisqu'elle active l'expression du TNF- α et de l'IL-6. Ces dernières peuvent elles-mêmes activer la transcription du gène de la résistine dans les cellules mononuclées humaines. Des études réalisées chez des souris n'exprimant pas la résistine endogène adipocytaire mais exprimant un transgène du gène de la résistine humaine dans les macrophages montrent que les propriétés pro-inflammatoires de la résistine dérivée des macrophages contribuent au développement de l'insulino-résistance *in vivo* (Qatanani, 2009).

Une étude réalisée sur des rats Sprague-Dawley montre que l'injection d'un agent pro-inflammatoire, la carraténine, induit une augmentation de la production de leptine (Gualillo, 2000), suggérant le rôle de l'inflammation dans la dérégulation de la sécrétion de leptine. La diminution des concentrations en adiponectine semble également jouer un rôle important dans le développement de l'inflammation de bas grade caractéristique de l'obésité. Les niveaux circulants d'adiponectine sont corrélés négativement avec les concentrations en CRP (Ouchi, 2003). La sécrétion différentielle des adipokines pourrait contribuer au développement de l'insulino-résistance en activant le relargage d'acides gras dans la circulation, en lien avec l'accumulation de lipides dans le muscle squelettique et dans le foie et ainsi contribuer à l'insulino-résistance.

Compte tenu des variations dans la production de ces molécules dans l'obésité, les dysfonctions métaboliques et l'inflammation du tissu adipeux semblent liées en partie à une dérégulation de l'équilibre entre la production d'adipokines pro et anti-inflammatoires.

2. Infiltration macrophagique

Parmi les différents types cellulaires présents dans le tissu adipeux, les macrophages, cellules de l'immunité, semblent particulièrement intéressants pour comprendre la physiopathologie de l'obésité. De nombreuses études ont fait état d'une infiltration macrophagique importante chez les individus ou les animaux obèses. Ainsi, le tissu adipeux de souris ob/ob présente des amas de macrophages par rapport à celui des souris sauvages C57Bl/6 (Shoelson, 2007). L'infiltration macrophagique est corrélée avec l'IMC et avec la taille des adipocytes présents dans le tissu adipeux sous-cutané (Weisberg, 2003). Le pourcentage de macrophages dans le tissu adipeux sain est d'environ 10 % et il peut atteindre 40 % dans le tissu adipeux d'individus obèses. Après une perte de poids, une diminution importante du nombre de macrophages dans le tissu adipeux est observée 3 mois après la pose d'un bypass gastrique (Cancello, 2005). Ces macrophages infiltrés sont organisés en agrégats, les « crown-like structure », entourant des adipocytes nécrotiques (Cinti, 2005).

Outre l'augmentation du nombre de macrophages dans le tissu adipeux, il a été observé que leur phénotype même était modifié dans l'obésité. Il a été montré chez la souris que les macrophages présents dans les tissus adipeux de souris nourries avec une alimentation riche en graisse étaient différents de ceux présents dans le tissu adipeux de souris nourries avec un régime normal (Lumeng, 2007). Deux types de macrophages peuvent en effet être observés dans le tissu adipeux : les macrophages de type M2 et les macrophages de type M1. Les macrophages M2, présents en faible quantité dans le tissu adipeux sain, possèdent des propriétés anti-inflammatoires et sécrètent notamment des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 (Maury, 2010). Les macrophages de type M1, ou macrophages activés, expriment la protéine CD11c et produisent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires. Ces derniers sont retrouvés en quantité importante dans le tissu adipeux de sujets obèses. Il a été montré que la modification du ratio M2/M1 était due à la migration et à l'activation de monocytes depuis la circulation sanguine vers les adipocytes nécrotiques et non à une conversion des macrophages M2 (présents dans le tissu sain en faible quantité) en macrophages M1.

Le recrutement et l'activation des monocytes circulants *via* plusieurs facteurs tels que le MCP-1, la leptine, l'hypoxie ou encore le stress des cellules endothéliales permettent l'entrée de ceux-ci au sein du tissu adipeux. Les monocytes se différencient ensuite en macrophages, qui une fois activés sécrètent à leur tour plusieurs molécules pro-inflammatoires susceptibles de participer au recrutement de nouveaux monocytes circulants. Ce recrutement de monocytes circulants apparaît comme primordial dans le développement de l'inflammation du tissu adipeux chez le sujet obèse. L'augmentation du TNF- α dans l'obésité serait due en partie à l'augmentation de l'infiltration des macrophages M1 (Weisberg, 2003). Les PPAR γ semblent avoir un rôle protecteur dans le développement de l'inflammation en stimulant l'expression de gènes, tels que l'IL-10, associés au phénotype macrophagique M2 (Tontonoz, 2008). Des expériences réalisées chez la souris obèse ont permis de diminuer l'insulino-résistance et de réduire l'inflammation locale et systémique en réalisant une ablation ciblée des macrophages CD11c positifs (Patsouris, 2008). D'autre part, les interactions entre macrophages et adipocytes semblent établir une sorte de « boucle » qui aggrave le phénomène inflammatoire (Figure 18) : les adipocytes hypertrophiés relâchent une quantité importante d'acides gras, capables *via* les récepteurs TLR4 (Toll-like receptor-4) d'activer les macrophages qui sécrètent alors de plus grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (Suganami, 2007).

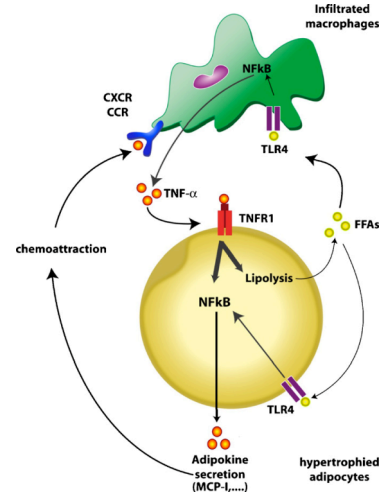


Figure 18. Activation croisée entre macrophage et adipocyte.

La dérégulation de la production des adipokines conduit au recrutement macrophagique. Le TNF- α sécrété par les macrophages infiltrés active dans les adipocytes NF- κ B. L'augmentation de la lipolyse conduit à la libération d'acides gras libres capables d'activer les macrophages *via* TLR4, augmentant ainsi la production de TNF- α (Maury, 2010).

3. Rôle des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales jouent un rôle important dans l'inflammation du tissu adipeux. Leur activation conduit à la production de différents facteurs impliqués dans le recrutement et l'activation des monocytes : molécules d'adhésion, chimiokines et cytokines (Sengenès, 2007). Il a été rapporté une augmentation des formes solubles d'ICAM-1 et VCAM-1 chez les adultes obèses et une diminution de ces facteurs lors d'une perte de poids (Maury, 2010). L'activation des cellules endothéliales pourrait résulter des molécules sécrétées par les macrophages et les adipocytes eux-mêmes. *In vitro*, l'incubation de cellules endothéliales dérivées du tissu adipeux avec des adipocytes matures conduit à une

augmentation de la production de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales ainsi qu'à une augmentation de la diapédèse des monocytes circulants (Curat, 2004).

4. Rôle de l'hypoxie

L'un des facteurs pouvant jouer un rôle clé dans le développement de la réponse inflammatoire dans le tissu adipeux d'individus obèses est l'hypoxie. Chez la souris obèse, il a été montré qu'il existait une diminution de la pression partielle en oxygène dans différents tissus adipeux mais que ce phénomène hypoxique n'était pas systémique (Ye, 2007). Chez l'homme, plusieurs études ont montré une diminution de la pression partielle en oxygène dans le tissu adipeux de sujets obèses (Pasarica, 2009). L'hypothèse selon laquelle la taille des adipocytes serait à l'origine de l'hypoxie (Trayhurn, 2008) semble être infirmée par des études montrant que l'hypoxie est détectée aussi bien dans des petits adipocytes que dans de larges adipocytes d'animaux obèses (Hosogai, 2007). Chez l'homme, il a été mis en évidence une corrélation négative entre la pression partielle en oxygène et la présence d'ARNm CD68, marqueurs des macrophages (Pasarica, 2009). L'expression de l'hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) est augmentée dans le tissu adipeux de sujets obèses comparativement aux sujets sains (Cancello, 2005). *In vitro*, l'augmentation de l'expression des ARNm de plusieurs molécules pro-inflammatoires dont l'IL-6 et le TNF- α a été rapportée à la fois dans les adipocytes et dans les macrophages (Ye, 2007).

5. Implication de la flore intestinale

Près de 2000 espèces de bactéries vivent dans le tractus digestif de l'être humain, soient environ 10^{12} à 10^{14} bactéries qui composent la flore intestinale. Le microbiote intestinal s'installe dès la naissance, la colonisation du tube digestif se faisant principalement lors de l'accouchement par voie basse puis par l'alimentation. Des études récentes montrent l'implication que pourrait avoir la flore intestinale dans le développement de l'obésité. La fermentation bactérienne modifie le rendement énergétique des aliments, puisqu'elle permet la décomposition des glucides non digestibles et des fibres alimentaires en gaz et en acides carboxyliques à chaîne courte absorbables par les muqueuses. Les souris axéniques (exemptes de germes) sont protégées de l'obésité par rapport aux souris colonisées avec une flore intestinale à la naissance (Backhed, 2004). La transplantation d'une flore intestinale de souris ob/ob ou de souris sauvage à des souris axéniques montre que les souris colonisées avec la flore intestinale de souris obèses présentent une augmentation de leur masse corporelle significativement plus importante que les souris colonisées avec la flore intestinale de souris sauvages (Turnbaugh, 2006). En outre, les populations bactériennes retrouvées dans le tractus digestif de souris ob/ob ou sauvages sont différentes (Ley, 2005). Le rôle des lipopolysaccharides (LPS) semble également être intéressant dans le développement de l'inflammation de bas grade retrouvée dans l'obésité. Le LPS est produit de façon permanente

dans les intestins suite à la lyse des bactéries gram -. Il est ensuite absorbé et transporté dans l'organisme via les lipoprotéines. Une augmentation du LPS circulant est observée chez les individus obèses ou diabétiques de type 2, caractérisant ainsi une endotoxémie métabolique (Creely, 2007). Il existe en outre une corrélation entre l'endotoxémie et un apport en énergie riche en lipides : les souris nourries avec une nourriture riche en lipides et dans une moindre mesure celles nourries avec un régime riche en carbohydrates montrent une élévation de leur concentration plasmatique en LPS. En outre, la présence de lipides dans le bol alimentaire facilite le transport des LPS de la lumière intestinale vers la circulation sanguine (Amar, 2008). L'injection de LPS à des souris sauvages provoque une augmentation de leur masse corporelle et adipeuse, de l'insulino-résistance et de l'expression de gènes codant des adipokines inflammatoires (Cani, 2007 ; Leuwer, 2009). L'action du LPS passe par l'activation des récepteurs de l'immunité TLR4 (Toll-like receptor 4) : la liaison du LPS au complexe CD14/TLR4 stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α . Une étude récente a également mis en évidence une augmentation de la régulation des gènes des TLR dans le tissu adipeux épидidymal de souris nourries avec un régime induisant l'obésité (Kim, 2011). Le LPS pourrait ainsi participer au phénomène inflammatoire de bas grade et à l'infiltration macrophagique caractéristiques de l'obésité.

Les mécanismes impliqués dans l'**inflammation chronique de bas grade** caractéristique de l'obésité sont résumés Figure 19.

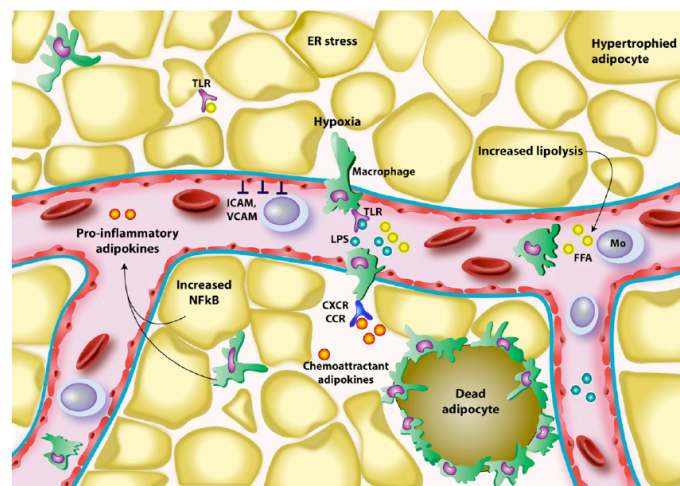


Figure 19. Mécanismes potentiels du développement de l'inflammation du tissu adipeux dans l'obésité.

L'hypertrophie adipocytaire conduit à la sécrétion de molécules pro-inflammatoires via NF- κ B notamment. Certaines de ces molécules participent au recrutement des monocytes circulants (MO) au sein du tissu adipeux où ils sont activés. La production de molécules pro-inflammatoires est alors augmentée. La majorité des macrophages s'agrègent sous forme de crown-like-structure (voir texte) autour des adipocytes nécrotiques. L'hypoxie participerait également au recrutement de macrophages. L'augmentation des lipopolysaccharides (LPS) observée dans l'obésité et ainsi que l'augmentation des acides gras circulants (FFA) participent à l'inflammation en activant les récepteurs de l'immunité TLR présents à la surface des macrophages et des adipocytes. CCR et CXCR désignent les récepteurs aux chémokines (Maury, 2010).

VI. MODELES ANIMAUX POUR L'ETUDE DE L'OBESITE ET DE L'INSULINO-RESISTANCE

L'étude de pathologies nécessite souvent la mise en place de modèles animaux développant des symptômes se rapprochant le plus possible de ceux retrouvés chez l'homme. Dans cette optique, de nombreux modèles animaux du syndrome métabolique ont été développés. Ils sont utilisés à la fois pour la compréhension générale de ces mécanismes ou des désordres métaboliques qui leur sont associés, mais aussi pour tester l'efficacité de traitements potentiels contre ces maladies. Les principales caractéristiques du syndrome métabolique sont l'obésité, l'insulino-résistance ou le diabète de type 2, l'hypertriglycéridémie, l'hypertension et un faible taux de HDL. En outre, le développement de maladies cardiovasculaires est fréquemment associé au syndrome métabolique. Tous ces paramètres sont donc recherchés dans les modèles animaux utilisés pour l'étude de ce syndrome.

De nombreuses études sont réalisées chez les rongeurs car ceux-ci présentent un grand nombre de gènes d'intérêt similaires à ceux retrouvés chez l'homme et sont des animaux faciles à élever en animalerie. Nous détaillerons donc ici quelques modèles de rongeurs fréquemment utilisés dans l'étude du syndrome métabolique en distinguant les modèles génétiques des modèles obtenus par « induction » des pathologies étudiées.

1. Modèles génétiques

De nombreux modèles génétiques de rongeurs diabétiques ou obèses sont utilisés en laboratoire. La majorité de ces modèles présente des mutations apparues spontanément et sont utilisés depuis des dizaines d'années. Leur caractérisation, plus récente, a été possible grâce aux progrès de la génétique.

1.1. Souris ob/ob

Décrites dans les années 1970, les souris ob/ob (C57BL/6J-ob/ob) sont porteuses d'une mutation autosomique récessive sur le gène de la leptine (Friedman, 1991 ; Zhang, 1994). Elles sont obèses, hyperinsulinémiques et hyperglycémiques dès leur 4^{ème} semaine de vie (Dubuc, 1976) et développent une diminution de la tolérance au glucose et des stéatoses hépatiques après 12 semaines. Elles développent également des pathologies cardiaques au bout d'une vingtaine de semaines. Elles ne constituent pas un modèle complet du syndrome métabolique, puisqu'elles ne développent pas de dyslipidémie même après 36 semaines et elles montrent une réduction de leur pression sanguine (Panchal, 2011).

1.2. Souris db/db

Les souris db/db (C57BL/KsJ-db/db) possèdent une mutation autosomique récessive sur le gène du récepteur à la leptine (Chen, 1996). Leur masse corporelle est plus importante que celle des souris contrôles dès leur 6^{ème} semaine suivant la naissance. Dès 8 semaines, elles présentent une élévation de leur glycémie et une augmentation des concentrations plasmatiques en triglycérides, cholestérol total et acides gras non estérifiés. Le ratio HDL/LDL est quant à lui diminué. Elles présentent également une hyperinsulinémie et une diminution de la tolérance au glucose dès 12 semaines. Ces souris développent par la suite une dysfonction endothéliale et une stéatose hépatique.

1.3. Rats Zucker (fa/fa) et Diabetic Zucker fatty (ZDF)

Le rat Zucker (fa/fa) est porteur d'une mutation sur le gène du récepteur à la leptine. Leurs contrôles homozygotes (+/+) et hétérozygotes (fa/+) sont minces et normoglycémiques. Les animaux homozygotes pour l'allèle fa développent spontanément une obésité sévère entre leur 3^{ème} et leur 5^{ème} semaine de vie et à 14 semaines, les lipides représentent près de 40 % de la composition corporelle (Zucker, 1963). Les rats (fa/fa) présentent des concentrations en leptine circulante élevées (Pico, 2002) et une hyperphagie dès les premiers jours de vie qui peut être expliquée par la modification de l'expression de plusieurs peptides orexigéniques (Beck, 2000). Ces animaux développent à terme une résistance à l'insuline, une altération modérée de la tolérance au glucose, une dyslipidémie et une hyperinsulinémie (Aleixandre de Artiñano, 2009).

La lignée de rats Zucker diabétiques, ou Diabetic Zucker fatty (ZDF), a été clairement établie en 1985 et développée comme modèle génétique en 1991. Le caractère « diabétique » est apparu dans une colonie non-consanguine de rats Zucker Fatty porteuse de la mutation fa. Ces animaux développent rapidement une hyperinsulinémie et une hypertriglycéridémie. Entre la 7^{ème} et la 12^{ème} semaine de vie, l'apparition d'une hyperglycémie résulte d'une insulino-résistance suivie d'un défaut d'insulino-sécrétion (Etgen, 2000) et à 12 semaines, les animaux mâles ZDF sont tous diabétiques (Chen, 2005). Une étude visant à caractériser l'insulino-résistance chez des rats ZDF *fa/fa* et leurs contrôles (+/+) ou (+/-) minces âgés de 10 semaines a été réalisée. Cette étude a montré une diminution de la synthèse de glycogène dans le muscle squelettique et une accumulation accrue de triglycérides dans le foie, le muscle squelettique et le cœur des animaux obèses après 10 semaines de régime. Le clamp euglycémique hyperinsulinémique a permis de mettre en évidence une insulino-résistance systémique chez les rats ZDF. L'étude de la captation du glucose sous insuline a montré une diminution de la sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique mais pas dans le cœur ni dans le tissu adipeux (Leonard, 2005). Une altération de la captation du glucose dans le cœur a cependant été observée à 19 semaines (Shoghi, 2008). En outre, les rats ZDF présentent une

élévation de certains marqueurs de l'inflammation caractéristiques de l'obésité comme le TNF- α ou l'IL-1 β . Enfin, ces animaux développent une dysfonction endothéliale et une hypertension modérée.

1.4. Autres modèles d'obésité génétique

Les rats OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) sont parfois utilisés comme modèle de diabète de type 2 ou d'obésité. Ces rats sont déficients en récepteurs de CCK-1 : ils présentent une insensibilité aux actions de cette protéine, qui se traduit principalement par une absence d'inhibition de la prise alimentaire en réponse à l'ingestion de lipides. Les rats OLETF présentent à l'âge de 20 semaines un poids 30 à 40 % supérieur à celui de leurs contrôles, les rats minces Long-Evans Tokushima Otsuka. Ils développent à terme une hyperglycémie et une diminution de leur tolérance au glucose. Ils sont également atteints de dysfonctions cardiaques multiples. Des accumulations de triglycérides dans le foie ont également été observées (Moran, 2006).

Les rats Goto-Kakizaki sont parfois utilisés pour étudier le syndrome métabolique. Ces animaux non-obèses développent une hyperglycémie précoce associée à une diminution de la tolérance au glucose. L'insulino-résistance et le défaut de sécrétion d'insuline caractéristiques du diabète de type 2 sont également présents chez ces animaux (Rees, 2005). Ils développent à 20 semaines plusieurs anomalies cardiovasculaires (Panchal, 2010)

Le *Psammomys obesus*, ou rat des sables, se nourrit principalement de végétaux à l'état sauvage. En laboratoire, sous nourriture standard, ces animaux deviennent obèses, insulino-résistants et hyperglycémiques. Comme dans le DT2 chez l'homme, on retrouve une augmentation de la proinsuline circulante. Ce modèle animal est surtout utilisé pour étudier les effets de l'alimentation et de l'exercice sur le diabète de type 2 (Rees, 2005).

Enfin, un grand nombre de souris transgéniques ou knockout ont été développées ces dernières années. Les mutations portent en général sur des gènes codant des protéines impliquées dans la régulation du métabolisme, telles que les GLUT4, les récepteurs à l'insuline ou encore les protéines IRS. Ces animaux développent une insulino-résistance plus ou moins sévère associée à certains facteurs du syndrome métabolique (Chen, 2005).

2. Induction du Syndrome métabolique

2.1. Agents chimiques

L'utilisation de la streptozotocine, molécule qui induit une nécrose des cellules β pancréatiques chez les rongeurs est fréquente et permet de mimer le diabète de type 1. Cependant, une injection d'une faible dose de streptozotocine chez de jeunes rats conduit au

développement d'une hyperglycémie modérée à l'âge adulte ou d'une insulino-résistance associée à une augmentation plasmatique de certaines protéines de l'inflammation.

Le rat SHR (Spontaneously Hypertensive Rat) est spontanément hypertendu et développe une obésité abdominale. L'injection de streptozotocine à des rats SHR âgés de 2 jours conduit à l'apparition d'une hyperglycémie et d'une insulino-résistance précoces (Chen, 2005).

Chez le jeune rat sain, l'injection de streptozotocine combinée à une alimentation riche en lipides ou en fructose conduit à l'augmentation des glycémie, insulinémie et triglycéridémie plasmatiques et au développement d'une insulino-résistance. L'apparition de ces symptômes dépend alors de la dose de streptozotocine injectée, de la durée du régime et de l'âge des animaux au début du protocole (Panchal, 2011). Si ce modèle peut-être utilisé dans des études sur le diabète de type 2, il n'est pas utilisable pour des études sur l'obésité, les animaux ne présentant pas d'altération particulière de la masse adipeuse.

2.2. Régimes alimentaires

L'induction de l'obésité ou de l'insulino-résistance par intervention nutritionnelle permet de se rapprocher des pathologies humaines. La plupart des régimes utilisés sont hypercaloriques et enrichis en lipides, en glucides ou en lipides et glucides. Ils varient donc par la nature des nutriments apportés, mais également par le pourcentage de calories apportées par ces différents nutriments : par exemple, un régime High-Fat 50 % est un régime dont 50 % des calories sont apportées par les lipides. Nous détaillerons ici les effets des régimes alimentaires données aux rats uniquement, bien qu'ils soient également très utilisés chez la souris.

2.2.1 Régimes enrichis en glucides

Depuis les années 1960, le fructose a remplacé une grande partie du sucrose, constitué d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose, dans la fabrication d'aliments industriels aux Etats-Unis. La majorité du fructose utilisé provient du sirop de maïs à haute teneur en fructose (ou HFCS pour High Fructose Corn Syrup). Le HFCS est principalement utilisé dans les sodas, mais il entre aussi dans la composition de jus de fruits, de pains, de gâteaux ou de confitures. Près de 10 % des calories ingérées quotidiennement proviendraient du fructose et 75 % à 82 % proviendraient d'additifs sucrants et non de fructose naturel (Bocarsly, 2010). Différents types de HFCS existent, ayant chacun des « pouvoirs sucrants » différents : le HFCS-55 contient ainsi 55 % de fructose et 42 % de glucose et le HFCS-42 contient 42 % de fructose et de 53 % glucose (Melanson, 2008).

L'utilisation du fructose chez le rat induit une insulino-résistance, une diminution de la tolérance au glucose et une dyslipidémie (Tran, 2009). Cependant, les études divergent en ce

qui concerne l'induction de l'obésité (Panchal, 2011). Le régime fructose induit également le développement de pathologies cardiovasculaires ainsi que l'infiltration de cellules caractéristiques de l'inflammation (macrophages, lymphocytes). Le fructose conduit à l'augmentation des acides gras libres, de la leptine et de l'adiponectine plasmatique et il diminue la sensibilité à l'insuline (Alzamendi, 2009 ; Melanson, 2008). Le développement d'une résistance à la leptine a aussi été observé (Shapiro, 2008). Une alimentation riche en fructose conduit à l'apparition d'une hyperinsulinémie, d'une hypertriglycéridémie, d'une hypercholestérolémie, d'une hypertension et au développement de l'insulino-résistance chez des rats Sprague-Dawley (Oron-Herman, 2008). Contrairement au glucose, le fructose n'induit pas la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas : en effet, les transporteurs du fructose (GLUT5) ne sont pas présents dans ces cellules (Bray, 2004). L'ingestion de HFCS par rapport au sucrose réduit les concentrations circulantes en insuline et en leptine (Teff, 2004). Le fructose serait un moins bon inducteur des mécanismes de la satiété que le glucose/sucrose.

L'utilisation de régimes enrichis en sucrose (HS pour High-sucrose) est également envisageable : le sucrose contient du fructose et des études ont montré que l'utilisation du fructose ou du sucrose présenterait des effets similaires sur le développement du syndrome métabolique (Melanson, 2008). Les rats consommant du sucrose rajouté à l'eau de boisson montrent une augmentation de la lipogenèse, une augmentation des concentrations plasmatiques en glucose, insuline, leptine, acides gras libres et triglycérides, ainsi qu'une diminution de la tolérance au glucose (Coelho, 2010). D'autres études ont montré le développement d'une insulino-résistance sans changement de la glycémie et de l'insulinémie plasmatique à jeun, mais une augmentation de ces deux paramètres en période post-prandiale (Santure, 2002). Chez le rat, un régime HS 64 % ne conduit pas à une différence de poids 80 jours après le début du régime (Soria, 2002). Des études réalisées chez la souris montrent qu'après 55 semaines de régime, les souris ne présentent pas d'altération de la masse corporelle mais présentent une hyperglycémie 10 minutes après administration de glucose. Cette hyperglycémie est résorbée après injection intrapéritonéale de glucose, suggérant une réduction de la sécrétion d'insuline mais pas d'altération de la sensibilité des tissus à l'insuline (Sumiyoshi, 2006). La réduction de la quantité de sucrose dans le régime de rats nourris depuis 30 semaines avec un régime HS permet d'observer une réduction de l'adiposité viscérale et de la sécrétion d'insuline par les cellules β suite à une stimulation par le glucose (Fortino, 2007).

2.2.2 Régimes enrichis en lipides

Une des première description de l'utilisation d'un régime hyperlipidique pour induire l'obésité date de la fin des années 1950 (Masek, 1959). Aujourd'hui, un grand nombre de protocoles basés sur la modification du régime alimentaire dans le but d'étudier le syndrome

métabolique utilisent des régimes enrichis en graisses, également appelés régimes High-Fat (HF). La grande variabilité dans les protocoles expérimentaux rend la comparaison entre les différentes études délicate. Classiquement, ces régimes HF contiennent un pourcentage de calories apportées par les lipides compris entre 35 % et 60 %. L'origine des lipides utilisés peut être animale (lard, huile de poisson...) ou végétale (huile d'olive, huile de coco...). Cette diversité dans la composition des régimes permet d'obtenir des modèles animaux variés, qui développent plus ou moins rapidement et avec plus ou moins de sévérité les principaux symptômes du syndrome métabolique. L'utilisation des lipides de natures différentes permet également d'étudier l'effet de lipides saturés ou insaturés sur la santé. Les régimes hyperlipidiques contenant des acides gras polyinsaturés (contenus par exemple dans l'huile de poisson) auraient ainsi un effet protecteur contre l'insulino-résistance et le développement de l'obésité (Storlien, 2000 ; Buettner, 2006). Les régimes hyperlipidiques fabriqués à base de lard sont les plus obésogènes (Buettner, 2006). Chez le rongeur nourri avec un régime hyperlipidique, on observe une hyperphagie qui tend à diminuer au bout de 4 à 5 semaines. Si l'hyperphagie est souvent observée durant le développement de l'obésité, elle n'est cependant pas systématique (West, 1998). Des rats nourris pendant plusieurs semaines avec un régime High-Fat 60 % ont un poids significativement plus important que les animaux contrôle, et ce dès la deuxième semaine de régime. Après 6 semaines de régime, ils présentent une élévation de l'insulinémie, de la glycémie, de la leptinémie et de la quantité d'acides gras non estérifiés. En outre, leur masse adipeuse est également plus élevée (Sutherland, 2008). Afin de déterminer plus précisément l'effet de différents lipides sur le métabolisme, une étude a été réalisée sur des rats Wistar mâles. L'utilisation de nourriture High-Fat 42 % (huile d'olive, lard ou huile de coco), conduit à l'augmentation de leur masse corporelle et à l'accumulation de triglycérides dans le foie. Les animaux nourris avec le régime HF-Lard sont ceux qui prennent le plus de poids et ils présentent une augmentation de l'insulinémie et une diminution de l'adiponectinémie. Les régimes HF-Lard et HF-Huile d'olive conduisent également à une diminution de l'insulino-sensibilité (Buettner, 2006). D'autres études montrent que l'utilisation de régimes enrichis en huile de coco ou en beurre n'induit pas d'obésité, mais entraîne une augmentation de la masse adipeuse après 14 semaines de régime (Romestaing, 2007).

2.2.3 Régimes enrichis en graisses et en sucres

Les modifications des comportements alimentaires dans les pays occidentaux jouent un rôle important dans le développement des maladies associées au syndrome métabolique. Expérimentalement, l'utilisation de régimes enrichis en lipides et en glucides permet de s'approcher au plus près des nouvelles habitudes nutritionnelles des pays industrialisés. Leur composition varie considérablement selon les études : 20 à 60 % des calories peuvent être apportées par les lipides et 10 à 60 %, par les glucides. Ces derniers peuvent être administrés

dans la nourriture ou dans l'eau de boisson. Généralement, l'utilisation de ce type de régimes conduit au développement d'une obésité associée à une accumulation de graisse viscérale. Les concentrations plasmatiques en glucose, insuline, leptine, triglycérides et cholestérol sont également augmentées. Ce modèle permet également de faire apparaître une diminution de la tolérance au glucose, une insulino-résistance et une inflammation de bas grade caractéristique de l'obésité. Une stéatose hépatique et des problèmes cardiovasculaires ont également été observées (Panchal, 2011).

On distingue deux catégories de régimes enrichis en graisses et en sucres : les régimes hyperlipidiques-hyperglucidiques standardisés et les régimes Cafétéria.

Les régimes High-Fat/High Sucrose (HF/HS) ou High-Fat/High Fructose, parfois appelés régimes « Western », sont des régimes hypercaloriques dans lesquels la majorité des calories sont apportées par les lipides et les glucides. Ils sont fabriqués de manière industrielle et présentent l'avantage d'être standardisés dans leur composition en vitamines et en minéraux. Cependant, les pourcentages de calories apportées par les lipides et les glucides varient aussi selon les études. Un régime HF/HS 45 %/41 % conduit à une augmentation rapide de la masse corporelle : une différence significative est observée dès le 10^{ème} jour de régime. Elle est associée à une augmentation de la quantité de certains tissus adipeux et à un contenu général en lipides significativement plus important, sans modification de la glycémie et de l'insulinémie après 5 semaines de régime (Adechian, 2009).

Le régime Cafétéria est composé d'aliments consommés quotidiennement par l'homme (aliments « de supermarché »). Ce régime permet de reproduire l'alimentation occidentale : il est hypercalorique avec une haute teneur en sel et un faible apport en fibres. Les glucides proviennent du sucrose ou du fructose et les lipides peuvent provenir des graisses animales et végétales. La plupart des régimes Cafétéria sont riches en lipides et en glucides, mais certaines études utilisent des régimes Cafétéria uniquement riches en glucides (Brandt, 2010). En général, une portion de nourriture standard est associée aux aliments du commerce. La variété des aliments choisis permet d'augmenter la palatabilité du régime et provoquer l'hyperphagie des animaux (Shafat, 2009); un seul aliment ne permet pas d'induire l'hyperphagie (LeMagen, 1974). Cependant, la mesure réelle de la prise alimentaire est complexe : suivant le mode de présentation de leur nourriture, les animaux peuvent trier les aliments et il faut en outre prendre en considération l'évaporation de l'eau contenue dans les aliments. Plusieurs études considèrent que les animaux mangent la même quantité de chaque aliment présenté (Shafat, 2009) et ne tiennent pas compte de la perte hydrique.

Décrit pour la première fois en 1976, le régime Cafétéria induit une hyperphagie et une augmentation de l'énergie absorbée (Sclafani, 1976). Il conduit à une prise de poids rapide. L'effet précoce d'un régime cafétéria a été étudié : des rats mâles et femelles présentent une hyperphagie et une augmentation significative de la masse adipeuse après 15

jours de régime. Une diminution de la production d'adiponectine a également été observée. Chez les femelles, la masse corporelle et la glycémie à jeun sont augmentées (Ribot, 2008). Le régime Cafétéria conduit également au développement excessif du tissu adipeux et à une diminution de la tolérance au glucose (Kretschmer, 2005).

Une étude comparant l'effet d'un régime High-Fat Lard 45 % par rapport à l'effet d'un régime Cafétéria chez des rats mâles a permis de mettre en évidence une masse corporelle plus importante chez les animaux nourris avec le régime Cafétéria. Au bout de 7 semaines de régime, les animaux du groupe Cafétéria présentent une hyperinsulinémie, une intolérance au glucose et une insulino-résistance par rapport aux animaux du groupe HF-Lard. L'infiltration macrophagique caractéristique de l'obésité observée dans le tissu adipeux est également plus marquée chez les animaux du groupe Cafétéria par rapport aux animaux nourris avec le régime Lard (Sampey, 2011).

2.2.4 Résistance à l'obésité

Des études ont montré chez le rat comme chez la souris que l'effet d'un régime hypercalorique sur l'apparition de l'obésité dépendait de la souche de l'animal (West, 1998). Une variabilité importante dans la réponse à l'obésité induite par un régime existe également au sein d'une même souche. Une étude a ainsi montré que les rats de souche Sprague-Dawley issus de lignée non-consanguine présentent une sensibilité au régime différente : la moitié des animaux développent une obésité en réponse à une alimentation modérément riche en graisse (Levin, 1987).

Plusieurs publications ont fait état de recherches visant à déterminer une façon précoce de classer les animaux sensibles ou résistants à l'obésité induite par un régime alimentaire. Chez des rats mâles nourris depuis la naissance avec un régime HF, le gain de poids entre leur 30^{ème} et 35^{ème} jour présente une bonne corrélation avec l'adiposité à 80 jours. Il est de 8 à 10 g par jour pour les rats sensibles à l'obésité et de 5 à 7 g par jour pour les rats résistants. Les groupes formés sur cette base permettent de mettre en évidence une différence significative entre les animaux sensibles ou résistants à l'obésité : masse corporelle, masse adipeuse, prise énergétique, leptinémie à 35 jours. La mise en place de l'obésité chez les animaux sensibles semble passer par une diminution de la capacité du muscle à oxyder les lipides et une augmentation de l'expression et de la production d'un peptide oréxigénique, la galanine, et une diminution de la production de peptides anorexigéniques (Leibowitz, 2007). Des expérimentations proches menées chez des rats adultes ont permis de montrer une bonne corrélation entre la prise de poids quotidienne moyenne durant les 5 premiers jours de régime et l'accumulation de tissus adipeux au terme de 6 semaines de régime. Une fois encore, les animaux sensibles à l'induction de l'obésité présentent une insulinémie, une glycémie, une leptinémie et une triglycéridémie plus importante que les animaux résistants à l'obésité ; en outre, l'expression de la galanine est augmentée. Enfin, une diminution du transport des

lipides et de leur oxydation dans le muscle squelettique est également mise en évidence chez les animaux sensibles à l'obésité (Dourmashkin, 2006). Les causes de cette résistance à l'induction de l'obésité sont complexes et probablement multi-géniques. Cependant, une diminution de l'activité physique spontanée après le début d'un régime hyperlipidique (HF-Lard) est observée chez les rats sensibles à l'induction de l'obésité mais pas chez les animaux résistants à l'obésité (Novak, 2006).

Des lignées de rats sensibles ou résistants à l'obésité ont part ailleurs été créées. La sélection et le croisement sur plusieurs générations de rats Sprague-Dawley ayant pris le plus de poids ou au contraire le moins de poids après introduction d'un régime High-Fat ont permis d'obtenir deux populations de rats : la première sensible à l'obésité et la seconde résistante (Levin, 1997). Les animaux résistants au régime ne présentent pas l'augmentation de la masse corporelle, de l'insulino-résistance, de la dyslipidémie, de l'hyperinsulinémie et de l'hyperleptinémie attendues (Panchal, 2011). Ces modèles permettent donc d'envisager l'étude des différences entre les animaux sensibles ou résistants à l'obésité.

L'utilisation de modèles animaux se rapprochant au mieux de la pathologie humaine est nécessaire pour comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'obésité et le diabète de type 2. Les **modèles « génétiques »** doivent être distingués des modèles **« induits »**. Les premiers (rats Zucker, souris ob/ob) présentent l'avantage de développer une obésité et/ou une insulino-résistance de manière certaine et rapide. Les seconds sont plus représentatifs de l'épidémie d'obésité observée chez l'homme : ils peuvent en effet permettre de mimer les conséquences de l'alimentation hypercalorique de nos sociétés. Les régimes enrichis en acides gras saturés (ex. Lard) ou enrichis en lipides et en glucides (ex. Cafétéria) sont les plus efficaces pour l'induction de l'obésité.

VII. METHODES DE MESURE DE L'INSULINO-RESISTANCE

Chez l'homme, il existe de nombreuses méthodes de mesure de l'insulino-résistance, la plupart étant basées sur la mesure des concentrations plasmatiques à jeun de l'insuline et/ou du glucose, ou lors de tests dynamiques nécessitant une administration préalable de glucose et/ou d'insuline. Toutes ces méthodes permettent l'estimation de la sensibilité à l'insuline générale. Trois grandes catégories de méthodes de mesure peuvent être distinguées : les méthodes directes, basées sur l'injection d'insuline et de glucose exogène, les méthodes indirectes, qui regroupent des tests dynamiques et nécessitant souvent une analyse des résultats par modélisation mathématique et enfin, les méthodes basées sur les concentrations plasmatiques en insuline et en glucose, permettant le calcul d'index reflétant la sensibilité à l'insuline des individus. Certaines de ces techniques de mesures de l'insulino-résistance sont utilisées chez l'animal.

1. Clamp euglycémique hyperinsulinémique

Le clamp euglycémique hyperinsulinémique (DeFronzo, 1979) est la méthode de référence de mesure de la sensibilité à l'insuline. Cette méthode consiste à infuser de l'insuline exogène à débit constant afin de provoquer une hyperinsulinémie qui va inhiber la production hépatique de glucose et augmenter le transport du glucose dans les tissus insulino-sensibles. La glycémie est « clampée » à sa valeur mesurée à jeun (avant le début du protocole), c'est-à-dire qu'elle est maintenue constante grâce à une infusion variable de glucose exogène. L'estimation de la sensibilité à l'insuline est possible, généralement au bout d'1 à 2 heures environ, lorsque l'état d'équilibre est atteint, c'est-à-dire lorsque l'intégralité du glucose perfusé est assimilée par les tissus insulino-sensibles. Le Glucose Infusion Rate (GIR) est alors calculé : il correspond à la quantité de glucose perfusée pour maintenir la glycémie constante. Il reflète également le taux de disparition du glucose sous insuline. En résumé, plus la quantité de glucose à perfuser pour maintenir l'euglycémie est faible, moins les organes insulino-sensibles captent le glucose et plus le sujet est considéré comme insulino-résistant. Le GIR reflète l'effet périphérique de l'insuline sur la captation du glucose, principalement musculaire, puisque le muscle squelettique est l'organe insulino-sensible le plus important de l'organisme. Si cette technique est la méthode la plus fiable pour évaluer l'insulino-sensibilité, elle n'est pas réalisée dans des conditions physiologiques. En outre, elle présente l'inconvénient de reposer sur un protocole extrêmement lourd, qui nécessite de nombreux prélèvements sanguins et une grande habitude de manipulation pour être fiable. Elle n'est donc pas utilisée en routine clinique et ne peut s'inscrire dans le cadre d'études épidémiologiques visant à mesurer l'insulino-sensibilité sur des grandes cohortes de patients. Enfin, pour comparer les GIR mesurés, ces derniers doivent être obtenus pour des doses

similaires d'insuline perfusées et ces doses diffèrent souvent en fonction des études. Chez l'animal, cette technique est régulièrement utilisée, mais en raison de la lourdeur du protocole, qui nécessite une pose de cathéters, elle est difficilement utilisable de manière chronique.

2. Test de tolérance au glucose

L' OGTT (Oral Glucose Tolérance Test ou Hyperglycémie Provoquée par voie Orale, en français) est un test simple, utilisé en routine clinique. Ce test permet d'évaluer la capacité de l'organisme à faire diminuer la glycémie après une charge en glucose. En pratique, le test consiste à suivre pendant 120 minutes les concentrations plasmatiques en glucose et en insuline après une charge orale en glucose. L'OGTT fournit des informations sur la tolérance au glucose, mais pas sur la sensibilité à l'insuline, qui sont deux concepts distincts. Plusieurs index, basés sur la méthode de l'OGTT, ont été développés. Deux index, assez bien corrélés avec le clamp euglycémique hyperinsulinémique, sont utilisés en routine clinique. Le premier repose sur l'utilisation des valeurs moyennes de glycémie et d'insulinémie à jeun et au cours du test (Matsuda, 1999). Le second nécessite moins de valeurs de glycémie et d'insulinémie mais tient compte de l'Indice de Masse Corporelle (Stumvoll, 2000). Plus récemment, l'index ISI_{0,120} (pour Insulin Sensitivity Index) a été calculé en utilisant la masse corporelle, les valeurs d'insulinémie et de glycémie à jeun et après 2 heures d'OGTT. Cet index présente une bonne valeur prédictive pour la survenue du diabète de type 2 (Gutt, 2000). Il présente une bonne corrélation avec le clamp euglycémique hyperinsulinémique en tenant compte de l'élimination urinaire du glucose au cours du test (Soonthornpun, 2003). Enfin, une méthode de modélisation permet d'évaluer la sensibilité et la sécrétion d'insuline à partir d'un OGTT réalisé sur 2 ou 3 heures (Mari, 2001). Ces tests présentent l'intérêt d'être simples à mettre en œuvre et leur aspect dynamique reflète en théorie les boucles d'homéostasie glucidique et insulinémique. Cependant, ces méthodes ne sont pas très adaptées aux sujets diabétiques, leur faible sécrétion d'insuline ne permettant pas d'évaluer l'action de l'insuline sur la capacité de captation du glucose (Pacini, 2003). Chez l'animal, l'OGTT est fréquemment utilisé car il est simple à mettre en œuvre. L'analyse des résultats se fait par l'étude de l'aire sous la courbe (glycémie en fonction du temps). D'autre part, il existe chez l'animal deux variantes de ce test, l'ipGTT et l'ivGTT, qui consistent à injecter directement la solution de glucose par voie intrapéritonéale et intraveineuse respectivement. La glycémie est en générale suivie pendant les 2 heures suivant la charge en glucose.

3. Index HOMA

Le HOMA (Homeostasis Model Assessment) est l'index le plus utilisé pour caractériser les anomalies de la sensibilité à l'insuline et de la sécrétion d'insuline. Il est obtenu à partir des concentrations plasmatiques à jeun d'insuline (I_0) et de glucose (G_0). Il s'agit d'un modèle mathématique basé sur les réponses quantitatives des différents organes

impliqués dans l'homéostasie du glucose. L'index HOMA est donné par la formule $IR_{HOMA} = (I_0 \times G_0)/22,5$. La corrélation entre les valeurs du HOMA et les résultats obtenus par le clamp euglycémique hyperinsulinémique n'est pas très élevée ($r = 0,34-0,40$) (Muniyappa, 2009), mais ceci peut être en partie expliqué par le fait que l'Index HOMA et le clamp euglycémique hyperinsulinémique ne font pas référence aux mêmes domaines de la sensibilité à l'insuline. A jeun, l'effet de l'insuline plasmatique est plus important sur l'inhibition de la production hépatique de glucose que sur son utilisation périphérique : l'index HOMA reflète donc surtout l'insulino-résistance hépatique (Tripathy, 2004). Cependant, il est difficile d'utiliser cet index pour obtenir des valeurs quantitatives au niveau individuel car il présente de grandes variabilités. L'absence de standardisation du dosage de l'insuline rend les comparaisons entre les différentes études ayant recours à l'index HOMA difficiles et il n'existe pas de seuil d'insulino-résistance défini. Chez l'animal, les mêmes problèmes se posent mais l'obtention de cet index étant très facile, de nombreuses études l'utilisent.

L'index Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKY) est également basé sur les concentrations plasmatiques à jeun d'insuline (I_0) et de glucose (G_0). Il est calculé par la formule : $IR_{QUICKY} = 1/(\text{Log } I_0 + \text{Log } G_0)$. Cependant, les problèmes posés par la standardisation du dosage de l'insuline restent les mêmes avec l'utilisation de cet index. Il est très peu utilisé pour les études chez l'animal.

4. Autres tests

D'autres index existent, tels que l'Insulin Tolerance Test (ITT) ou le MINMOD (Minimal Model). Ces deux index sont des méthodes indirectes. L'ITT est réalisé par une injection de 0,1 UI/kg d'insuline qui permet de calculer un indice à partir de la diminution de la glycémie au cours des 15 ou 30 premières minutes post-injection. Ce test présente le risque de provoquer une hypoglycémie susceptible d'induire une contre-régulation hormonale qui peut être responsable d'une diminution transitoire de la sensibilité à l'insuline. Il est assez peu utilisé chez le rongeur. Le MINMOD repose quant à lui sur une hyperglycémie provoquée par voie veineuse associée à une modélisation mathématique des cinétiques de la glycémie et de l'insulinémie suivies par 28 prélèvements sanguins sur 180 minutes (Bergman, 1979). Ce modèle fournit des informations sur la sensibilité à l'insuline des tissus ainsi que sur l'effet du glucose sur sa propre disparition, indépendamment de toute élévation de l'insulinémie. Cet index est parfois utilisé chez l'homme, mais il n'est pas utilisé chez le rat.

Chez l'homme comme chez l'animal, de nombreuses méthodes de mesure de l'insulino-résistance existent, mais aucune ne fait consensus car ces méthodes sont soit peu sensibles soit peu reproductibles. La méthode de référence, le **clamp euglycémique hyperinsulinémique** est longue à mettre en œuvre et est difficilement utilisable de façon chronique chez l'animal. En outre, les méthodes développées *in vivo* permettent uniquement une évaluation de la **sensibilité à l'insuline générale**.

VIII. TRACEURS DU TRANSPORT DU GLUCOSE

Le clamp euglycémique hyperinsulinémique est la méthode de référence pour évaluer la sensibilité globale d'un individu à l'insuline, mais cette sensibilité pouvant être différente d'un organe à l'autre, une mesure du transport du glucose dans différents organes est d'un intérêt majeur. Différentes méthodes utilisant la résonance magnétique nucléaire spectroscopique (SRMN), la dilution de traceurs radioactifs ou la tomographie par émission de positons (TEP) ont été développées. Le laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques (INSERM U1039) a mis en place une technique de mesure *in vivo* du transport du glucose utilisant la TEMP (Tomographie par Emission Mono Photonique) ou SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography).

1. La SRMN

La SRMN permet de mesurer la concentration locale de certains métabolites de manière non invasive. Cette technique est basée sur les propriétés de résonance des atomes ^1H et ^{13}C lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique. Les noyaux atomiques possèdent un moment cinétique (ou « spin ») intrinsèque qui peut prendre différentes orientations en fonction du champ magnétique dans lequel le noyau est placé. La réponse des noyaux atomiques placés dans un champ magnétique intense peut être enregistrée et permet l'obtention d'informations sous forme de spectre. Le champ magnétique étant modulé localement par l'environnement électronique du noyau, les noyaux résonnent à des fréquences différentes. Chaque raie du spectre obtenu correspond donc à un environnement moléculaire particulier et l'amplitude des raies reflète le nombre de molécules ayant réagi de façon similaire. La SRMN permet de suivre la formation/dégradation d'une molécule d'intérêt. Elle a particulièrement été utilisée pour l'étude du métabolisme du glycogène dans le muscle squelettique (Roden, 1999) : la synthèse du glycogène est alors suivie après perfusion de glucose marqué en position 1 au ^{13}C . Cette technique permettait de mettre en évidence un défaut de synthèse du glycogène chez les sujets diabétiques. Le traitement des données s'avère en revanche complexe.

2. La technique de dilution des multiples traceurs

La technique de dilution des multiples traceurs est basée sur l'injection de plusieurs traceurs à l'entrée d'un organe d'intérêt et sur l'étude de leur ressortie. L'évaluation de la sensibilité à l'insuline est réalisée par l'étude du métabolisme du glucose, suite à la perfusion d'un ou plusieurs traceurs seuls ou en présence d'insuline. La co-injection d'un marqueur vasculaire (qui ne traverse pas l'endothélium des capillaires), d'un marqueur extracellulaire (qui ne pénètre pas dans la cellule mais reste dans le milieu interstitiel), d'un marqueur du

transport du glucose et de glucose est nécessaire pour réaliser une étude complète. Pour l'étude du transport du glucose, seuls un marqueur extracellulaire et un marqueur du transport du glucose sont utilisés. Les deux traceurs extracellulaires les plus utilisés sont le [^3H]-L-glucose et le [^3H]-D-mannitol, le transport du glucose étant évalué par le [^{14}C]-3-O-méthyl-D-glucose (3-OMG), traceur de référence. Le 3-OMG présente un comportement d'entrée dans la cellule similaire à celui du glucose *in vitro* et *in vivo* (Carruthers, 1990) : il entre dans la cellule par les transporteurs du glucose mais n'est pas phosphorylé par l'hexokinase et ressort donc librement de la cellule. Le 3-OMG trace donc uniquement l'étape de transport du glucose. Cependant, le ^{14}C n'étant pas détectable par voie externe du fait de sa faible énergie, les mesures ne peuvent se faire qu'au niveau sanguin. L'analyse des cinétiques du 3-OMG nécessite l'utilisation d'un modèle mathématique compartimental. Cette technique permet donc d'obtenir de manière fiable des paramètres cinétiques de transport du glucose *in vivo*, mais l'analyse des résultats est là encore relativement complexe (Cobelli, 1989). En France, l'utilisation du ^{14}C chez l'homme est interdite en raison de sa période importante (5730 ans). En laboratoire, des problèmes pratiques de gestion des déchets peuvent également se poser si l'on souhaite réaliser des études multiples.

3. Le 2DG

Le 2-déoxy-D-glucose (2DG) marqué au ^{14}C est parfois utilisé *in vivo* chez l'animal pour évaluer l'insulino-résistance par organe. De la même manière que le glucose, le 2DG est transporté à l'intérieur de la cellule par diffusion facilitée via les GLUTs et est ensuite phosphorylé en position 6 par l'hexokinase pour donner le 2DG-6-P : il est alors piégé dans la cellule. Le ^{14}C -2DG est injecté sous clamp euglycémique hyperinsulinémique jusqu'à l'obtention d'une concentration plasmatique constante de traceur. Les organes d'intérêt sont ensuite disséqués et l'accumulation du ^{14}C -2-DG-6P dans ces organes est évaluée. En condition idéale, le ratio de la radioactivité du 2DG tissu sur plasma est un index direct de l'effet relatif du transport et de la phosphorylation du glucose. En réalité, le niveau d'utilisation du glucose, représenté par l'index Rg' , est calculé à partir de la concentration en glucose sanguin à 45 minutes, de la quantité de 2DG accumulée dans l'organe en 45 min et de l'activité spécifique plasmatique du 2DG sur 45 minutes (Kraegen, 1985). Cependant, cette technique est relativement longue à mettre en œuvre et l'utilisation du ^{14}C -2DG est impossible de manière chronique chez l'animal, puisque le prélèvement des organes est nécessaire à l'analyse des données.

4. La tomographie par émission de positons

La tomographie par émission de positons, repose sur les propriétés physiques des atomes radioactifs émetteurs de rayonnements β^+ ou positons. La désintégration du noyau vers un état stable conduit à l'émission d'un positon, de masse égale à celle d'un électron,

mais chargé positivement. Une fois émis, le positon parcourt quelques millimètres dans les tissus jusqu'à la perte de toute son énergie cinétique. L'interaction du positon avec un électron du milieu, phénomène appelé annihilation, conduit à la formation de deux photons gamma de 511 keV, émis à 180 degrés l'un de l'autre. Le principe de l'imagerie TEP repose sur la détection simultanée des deux photons et la détermination du lieu de la réaction d'annihilation.

Le traceur communément utilisé pour l'étude du transport du glucose en TEP est le [^{18}F]-2-fluoro-2-déoxy-D-glucose (FDG), un analogue du 2-déoxy-D-glucose. Une fois phosphorylé pour former le fluoro-2-DG-6-phosphate, il est piégé dans la cellule et s'y accumule, permettant la visualisation du tissu l'ayant capté par imagerie TEP. La résolution spatiale de la TEP permet d'observer un grand nombre de régions d'intérêt de petit volume dans lesquelles l'homogénéité du métabolisme est bonne. L'analyse des données repose sur l'utilisation d'un modèle mathématique à trois compartiments (Figure 20). Cependant, l'activité perçue par la caméra provient à la fois du [^{18}F]-FDG et du [^{18}F]-FDG-6-phosphate : le [^{18}F]-FDG ne permet donc pas l'évaluation du transport pur du glucose.

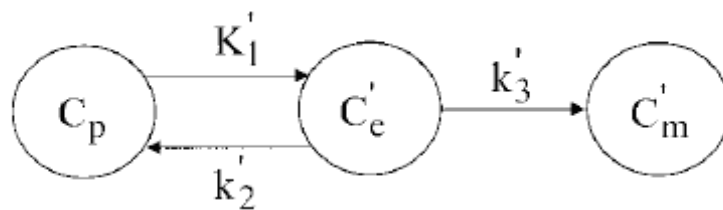


Figure 20. Modélisation à trois compartiments du transport et du métabolisme du FDG.

C_p représente le compartiment plasmatique, C_e représente le compartiment intracellulaire et C_m la concentration en FDG phosphorylé. Les constantes cinétiques du traceur K_1' , k_2' et k_3' permettent de quantifier les échanges du traceur entre les différents compartiments. (Bertoldo, 2001).

Le 3-OMG est également utilisable *in vivo* en TEP lorsqu'il est marqué au carbone 11. Le 3-OMG a notamment été utilisé pour l'étude du transport du glucose dans le muscle squelettique chez l'homme (Bertoldo, 2005). Un modèle à trois compartiments a été développé afin de pouvoir analyser les données et modéliser le transport du glucose (Figure 21). Son utilisation est cependant limitée par la courte période (20 minutes) du ^{11}C .

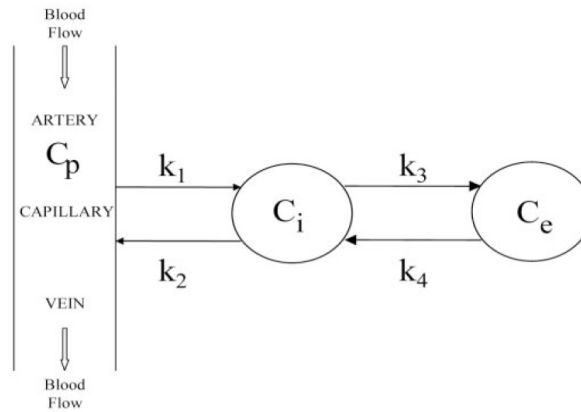


Figure 21. Modélisation à trois compartiments du 3-OMG dans le muscle squelettique.

C_p représente le compartiment plasmatique, C_i représente le compartiment interstitiel et C_e le compartiment intracellulaire. Les constantes cinétiques du traceur k_1 , k_2 , k_3 et k_4 permettent de quantifier les échanges du traceur entre les différents compartiments (Bertoldo, 2005).

5. Le 6-déoxy-6-iodo-D-glucose (6DIG)

L'équipe Radiopharmaceutiques Biocliniques a travaillé sur l'élaboration de plusieurs analogues du glucose marqués avec des émetteurs gamma purs tels que l'iode 123, dans le but de développer un traceur pur du transport du glucose *in vivo*. L'iode 123 est détectable par imagerie SPECT et sa demi-vie de 13,3 heures en fait un isotope facilement utilisable en routine clinique.

Plusieurs analogues du glucose marqués en position 1, 2, 3 (Koumanov, 1996) et 4, 5 et 6 (Perret, 2004) ont été synthétisés. Le devenir biologique de ces molécules a été étudié *in vitro* sur modèles cellulaires, *ex vivo* sur cœur isolé et perfusé de rat et *in vivo* chez la souris. Aucune des molécules marquées en positions 1, 2, 3, 4 et 5 n'interagissait avec le transporteur du glucose. Trois molécules iodées en position 6, dont le 6DIG, ont en revanche montré des résultats intéressants et ont fait l'objet d'un dépôt de brevet avec Cis Bio International (Bignan, 1993).

Le 6DIG a initialement été synthétisé afin de diagnostiquer les tumeurs cérébrales, sans être caractérisé comme un traceur du transport du glucose et n'a pas donné de résultat intéressant en biodistribution chez la souris (Wassenaar, 1973). Des études biologiques réalisées au laboratoire ont permis de montrer que le 6DIG présente un comportement similaire au 3OMG : le 6DIG a donc été validé comme traceur pur du transport du glucose (Koumanov, 1995 ; Henry, 1997a). Des études effectuées sur des érythrocytes humains en suspension et sur des cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture primaire ont permis d'étudier le comportement du traceur : celui-ci entre dans les cellules par les transporteurs du glucose, mais contrairement au glucose, il n'est pas phosphorylé par l'hexokinase et il peut ressortir de la cellule par ces mêmes transporteurs. Le transport du 6DIG est en outre stimulé en présence d'insuline : des études réalisées sur des adipocytes de rats en suspension montrent

une augmentation d'un facteur 10 du V_{\max} du traceur en présence d'insuline alors que son K_m reste inchangé. Les études réalisées sur adipocytes provenant de souris obèses et de rats diabétiques montrent une altération du transport du 6DIG sous insuline (Henry, 1997b).

Afin de mieux comprendre le comportement du traceur *in vivo*, des biodistributions ont été réalisées après injection du traceur seul ou en présence insuline sur des souris présentant une anomalie du transport du glucose et génétiquement diabétiques (C57BL/Ks/Rj-*db/db*) : ces biodistributions montrent une augmentation significative du transport du 6DIG dans les tissus insulino-sensibles en présence d'insuline chez les animaux contrôle mais pas chez les animaux diabétiques (Perret, 2003). Afin de confirmer ces résultats, une étude en condition contrôlée, sous clamp euglycémique hyperinsulinémique a été réalisée sur des rats sains et sur des rats rendus insulino-résistants par un régime riche en fructose. Le régime riche en fructose provoque en effet une insulino-résistance modéré, une hyperinsulinémie, une hypertension et une hypertriglycémie (Faure, 1999). Cette étude a permis de montrer une augmentation plus importante du transport du 6DIG dans les organes insulino-sensibles en présence d'insuline chez les rats contrôles par rapport aux rats nourris avec un régime fructose et de montrer que le cœur était l'organe le plus discriminant pour apprécier les anomalies de transport du glucose chez les sujets insulino-résistants (Perret, 2007).

Les études de biodistributions ont permis de déterminer les caractéristiques générales des cinétiques de transport du 6DIG dans différents organes. La plupart des organes étudiés présentent une cinétique décroissante, suivant une double exponentielle décroissante. Seuls le muscle squelettique et le cerveau présentent une cinétique différente : le traceur s'accumule rapidement dans ces organes jusqu'à atteindre un plateau. Des études menées sur le muscle soléaire isolé de rat ont permis de montrer que le 6DIG n'était pas modifié dans le muscle. Il a également été observé que le comportement du 6DIG dans cet organe était similaire à celui du 3-OMG (Lavergne, 2003, DEA). Toutes ces études ont donc permis de montrer qu'il est possible, avec le 6DIG, de mettre en évidence des variations du transport du glucose *in vivo*.

5.1. Mesure de l'insulino-résistance cardiaque avec le 6DIG.

5.1.1 Faisabilité de la méthode *in vivo*

Un protocole de mesure de l'insulino-résistance cardiaque avec le 6DIG par détection externe de la radioactivité a par la suite été mis en place chez le rat. Brièvement, ce protocole consistait à suivre les cinétiques sanguines et cardiaques du traceur à l'aide d'une sonde NaI. Deux acquisitions de la radioactivité de 45 minutes, consécutives à deux injections de 6DIG étaient réalisées. La première injection de 6DIG était réalisée seule, la seconde injection de 6DIG était précédée de l'injection d'un bolus d'insuline (3UI/kg). Les données biologiques recueillies étaient ensuite transposées dans un modèle mathématique à trois compartiments. Ce modèle mathématique permet de prendre en compte plusieurs données biologiques telles

que la cinétique du traceur dans l'organe et la cinétique du traceur dans le sang ; il permet d'estimer les constantes cinétiques de transfert $k(i,j)$ entre chaque compartiment (Figure 22). La constante $k(2,1)$ permet d'évaluer l'entrée du traceur dans le muscle cardiaque. Le rapport $k(2,1)$ mesurée en condition insuline sur $k(2,1)$ mesurée en condition basale permet de déterminer un index R d'insulino-résistance cardiaque.

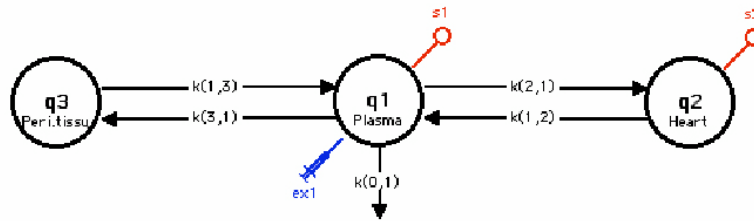


Figure 22. Modèle mathématique à trois compartiments pour la mesure de l'insulino-résistance cardiaque avec le 6DIG.

q1 représente le compartiment plasmatique, q2 le compartiment cardiaque et q3 le compartiment regroupant les tissus périphériques. Les constantes cinétiques $k(i,j)$ sont déterminées entre chaque compartiment. $k(0,1)$ représente la fuite, principalement urinaire, du traceur.

La première étude, effectuée sur des animaux nourris avec un régime riche en fructose (insulino-résistance modérée), des rats Zucker obèses (insulino-résistance sévère), des rats ZDF diabétiques ainsi que sur leurs contrôles respectifs, a permis de montrer que les index d'insulino-résistance calculés pour les animaux du groupe Contrôle sont significativement plus élevés que ceux calculés pour des rats malades, reflétant également des degrés variables d'insulino-résistance (Briat, 2007). Cette étude a donc permis de montrer pour la première fois la faisabilité de la mesure de l'insulino-résistance cardiaque *in vivo* avec le 6DIG.

5.1.2 Validation de la méthode par imagerie scintigraphique

La généralisation des γ -caméras dédiées au petit animal rendu possible l'adaptation du protocole à l'imagerie scintigraphique. Le protocole expérimental est proche du précédent mais le temps d'acquisition a été réduit à 20 minutes pour chaque condition (basale et insuline). D'autre part, la quantité d'insuline injectée est passée de 3UI/kg à 2,5UI/kg pour s'approcher de modèles plus physiologiques. La radioactivité cardiaque est acquise au moyen d'une γ -caméra et des prélèvements sanguins réguliers sont réalisés pour établir la cinétique sanguine du traceur.

Des études de reproductibilité et de sensibilité de la méthode de mesure de l'insulino-résistance cardiaque ont été réalisées (Thèse de J.Vollaire, 2010). L'étude de reproductibilité a pour objectif de vérifier que la méthode permet d'obtenir des index similaires lorsque la mesure est répétée à quelques jours d'intervalle. Les index d'insulino-résistance obtenus à 7 jours d'intervalle sur des rats sains ont permis de montrer une bonne reproductibilité de la méthode. L'étude de sensibilité a pour but de vérifier que la méthode permet de mettre en

évidence une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez des animaux traités avec un insulino-sensibilisateur. Le protocole de sensibilité a été effectué sur des rats Zucker obèses et insulino-résistants, traités avec un insulino-sensibilisateur, la rosiglitazone, ou du sérum physiologique (animaux « placebo » contrôles) pendant 7 jours. Avant traitement, les index d'insulino-résistance cardiaques sont proches de 1, ce qui témoigne d'une insulino-résistance. Après 7 jours de traitement (J7), les index d'insulino-résistance cardiaque sont statistiquement plus élevés ($p < 0,05$) chez les animaux traités avec la rosiglitazone et restent proches de 1 chez les rats contrôles. Cette augmentation de l'index d'insulino-résistance à J7 permet de mettre en évidence l'amélioration de la sensibilité à l'insuline liée au traitement avec un antidiabétique oral. Afin de permettre le transfert de la méthode en routine clinique chez l'homme et son utilisation de cette méthode pour des études répétées chez l'animal, il était nécessaire de modifier le protocole de manière à s'affranchir des prélèvements sanguins. Un descripteur empirique basé sur une analyse graphique des courbes d'activité cardiaque a été développé. Ce descripteur devait répondre aux deux conditions suivantes : permettre de discriminer une population saine d'une population malade d'une part et présenter une bonne corrélation avec l'index obtenu grâce au modèle mathématique. Les valeurs de ce descripteur empirique sont corrélées significativement ($r = 0,57$; $p = 0,01$) aux valeurs d'index calculées chez un même animal. Par ailleurs, l'utilisation du descripteur empirique pour estimer l'insulino-résistance est une méthode sensible et reproductible sur les animaux étudiés. Le clamp euglycémique hyperinsulinémique étant la méthode de référence de mesure de l'insulino-résistance *in vivo*, les index et les descripteurs empiriques ont été comparés aux valeurs du GIR obtenues sur les mêmes animaux. L'index d'insulino-résistance cardiaque obtenu par modélisation mathématique est bien corrélé au GIR ($r=0,68$; $p=0,02$). Le descripteur empirique ne l'est pas ($r=0,51$; $p=0,10$), bien que la corrélation entre l'index d'insulino-résistance et le descripteur empirique soit bonne ($r=0,74$; $p=0,01$). Ces résultats peuvent s'expliquer par la grande hétérogénéité des valeurs du descripteur empirique (coefficient de variation des données estimé à 66 %). La modélisation mathématique, permettant de calculer l'index cardiaque prenant en compte les échanges sanguins du traceur, est quant à elle plus précise.

Dans ce protocole, l'acquisition de la radioactivité dans le cœur se fait grâce à une γ -caméra. Afin d'obtenir les cinétiques cardiaques utilisées pour calculer l'index ou le descripteur empirique, un traitement d'images est nécessaire : il consiste à placer une zone d'intérêt de taille fixe sur l'image, de manière à délimiter le muscle cardiaque. Les données spécifiques à la zone d'intérêt tracée sont ensuite extraites et la cinétique du traceur est obtenue. Une fois les cinétiques obtenues, le calcul de l'index est le plus possible normalisé. L'étape du placement de la région d'intérêt est donc déterminante dans le processus de traitement des données. Une étude de reproductibilité de la méthode a été effectuée avec deux

observateurs différents, sur une série d'animaux sains et sur une série d'animaux insulino-résistants, et montre une reproductibilité moyenne (test de Kappa).

5.2. Mesure de l'insulino-résistance dans le muscle squelettique avec le 6DIG

Le muscle squelettique est l'organe insulino-sensible le plus important de l'organisme puisque 80 % de la captation du glucose sous insuline a lieu dans le muscle squelettique. Le développement d'une technique permettant d'estimer l'insulino-résistance dans cet organe précis présente donc un grand intérêt, en recherche fondamentale comme en clinique. Une méthode de mesure de l'insulino-résistance dans le muscle squelettique avec le 6DIG a été développée au laboratoire. Dans le muscle squelettique, la cinétique du traceur est différente de celle observée dans le cœur puisque dans cet organe, le 6DIG s'accumule jusqu'à atteindre un plateau. Une première étape a consisté au développement d'un modèle mathématique permettant l'analyse des résultats obtenus (Thèse de J.Vollaire, 2010). Le modèle mathématique a été adapté à partir du modèle proposé pour l'étude du transport du 3OMG dans le muscle squelettique (Bertoldo, 2005). Ce nouveau modèle comprend trois compartiments (Figure 23) : un compartiment plasmatique (C_p), un compartiment interstitiel (C_i) et un compartiment intracellulaire (C_e). Ce modèle utilise la cinétique tissulaire du traceur, obtenue en plaçant une sonde NaI sur le quadriceps de l'animal, ainsi que la cinétique sanguine, obtenue par prélèvements sanguins.

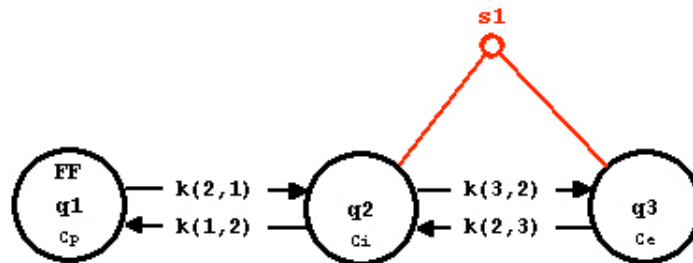


Figure 23. Modèle mathématique à trois compartiments pour la mesure de l'insulino-résistance musculaire avec le 6DIG.

C_p représente le compartiment plasmatique, C_i le compartiment interstitiel et C_e le compartiment intracellulaire. Les constantes cinétiques $k(i,j)$ sont déterminées entre chaque compartiment.

Ce modèle a été validé sur des données obtenues sur des rats sains à partir d'acquisitions de la radioactivité pendant 180 minutes en présence ou non d'insuline. La constante de transfert $k(3,2)$ calculée à 90 minutes est significativement plus élevée sous insuline qu'en condition basale. Un index d'insulino-résistance musculaire a été proposé : il correspond au ratio de la constante $k(3,2)$ sous insuline et $k(3,2)$ en condition basale. Il était ensuite nécessaire de comparer les index d'insulino-résistance musculaire obtenus avec le 6DIG avec les GIR calculés à partir des données fournies par le clamp euglycémique

hyperinsulinémique. Cette étude a donc été réalisée sur des rats sains, la durée des acquisitions ayant été réduite à 90 minutes pour chaque condition. Les résultats ont montré une bonne corrélation entre les index d'insulino-résistance musculaire et les GIR ($r=0,71$, $p=0,002$).

La durée des acquisitions de la radioactivité nécessaire à l'obtention des index d'insulino-résistance musculaire étant importante (90 minutes pour chaque condition), un descripteur empirique basé sur l'analyse graphique des courbes des vingt premières minutes d'acquisition pour chaque condition a été développé. Le descripteur empirique a été calculé à partir des données obtenues pour le calcul des index et du GIR et ces trois techniques ont été comparées entre elles. L'analyse des résultats montre que le descripteur empirique est bien corrélé aux valeurs d'index d'insulino-résistance musculaire ($r = 0,66$; $p = 0,04$) mais qu'il n'est pas significativement corrélé au GIR, malgré un bon coefficient de Pearson ($r = 0,60$; $p = 0,07$) (Thèse de J.Vollaire, 2010). Les conditions expérimentales du protocole nécessitant l'anesthésie de l'animal, une diminution de l'apport sanguin au muscle squelettique et une diminution de la disponibilité du traceur au niveau cellulaire peuvent se produire (Kraegen, 1990).

Une étude de reproductibilité et de sensibilité a été menée sur animal éveillé. Le protocole expérimental consiste en deux injections de 6DIG, en condition basale et sous insuline, chacune d'elle étant suivie d'une acquisition de la radioactivité par γ -caméra et non par sonde NaI. Les descripteurs empiriques obtenus ont permis de montrer une bonne reproductibilité ($p = 0,24$ entre les mesures à J0 et à J7) et une bonne sensibilité ($p = 0,04$ entre les mesures à J0 et à J7) de la méthode. Cependant, la mesure de l'insulino-résistance musculaire réalisée chez le rat éveillé présente l'inconvénient de ne pas pouvoir être réalisable conjointement avec la mesure de l'insulino-résistance cardiaque, l'anesthésie étant nécessaire pour effectuer cette dernière.

L'étude du transport ou du métabolisme du glucose vise à mettre en évidence une altération de l'effet de l'insuline, caractéristique de l'insulino-résistance. Des méthodes, basées sur la SRM ou sur l'injection de traceurs radioactifs, permettent d'étudier ces phénomènes. Le laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques a développé un analogue iodé du glucose, le **6DIG**, permettant l'évaluation de **l'insulino-résistance cardiaque et musculaire en imagerie nucléaire**. Cette technique non invasive permet de réaliser des mesures répétées de l'insulino-résistance par organe chez l'animal et est actuellement en phase d'études cliniques chez l'homme.

Travail Expérimental

1ère partie : mise en place du modèle expérimental

I. MATERIEL ET METHODES

1. Animaux et régimes alimentaires

Les rats mâles de souche Sprague-Dawley, normoglycémiques et normoinsulinémiques, sont fournis par la société Harlan (France) et sont gardés en animalerie standard (cycle jour/nuit de 12h/12h). Avant le début des expérimentations, les animaux, regroupés à raison de 4 rats par cage, sont nourris *ad libitum* avec un régime standard A04 (SAFE, France).

Les régimes alimentaires utilisés dans cette étude sont fournis par la société SAFE (France), à l'exception du régime Cafétéria qui est préparé au laboratoire à partir de nourriture achetée en supermarché. Le régime commercialisé par SAFE en tant que régime contrôle des régimes High-Fat ou High-Sucrose est le régime témoin 210. Le régime A04, avec lequel les rats de l'animalerie sont nourris habituellement, a également été utilisé dans certaines séries d'expériences. Ces régimes présentent des apports caloriques différents (Tableau 4).

	Standard A04	Témoin 210	High- Fat Lard	High- Fat Coco	Sucrose	Cafétéria
Kcal/kg	2900	3440	4890	4890	3430	3520
Lipides (%)	9	13	61	61	13	46
Carbohydrates (%)	68	64	20	20	64	38
Protéines (%)	23	22	19	19	23	16

Tableau 4. Apports caloriques des différents régimes alimentaires utilisés.

Les régimes High-Fat Lard et High-Fat Coco sont des régimes hyperlipidiques dont environ 60 % des calories sont apportées par les lipides. Le régime High-Sucrose est enrichi en saccharose et 64 % des calories sont apportées par les glucides. Enfin, le régime Cafétéria, dont les apports caloriques proviennent pour 46 % des lipides et pour 38 % des glucides en moyenne, est un régime constitué en grande partie de produits de consommation courante chez l'homme. Les apports énergétiques des aliments utilisés pour réaliser le régime Cafétéria sont présentés ci-dessous (Tableau 5).

Aliments	Lipides (%)	Glucides (%)	Protéines (%)
Charcuteries			
Cervelas	26	3	12
Jambon blanc	3	0,4	21
Rillettes	37	0,2	14
Pâté de foie	28	3,8	10,5
Terrine de campagne	24	2	18
Fromages			
Babybel ®	24	0,2	21,5
Emmental	29	0	28
Fromage à raclette	27	0	24
Gâteaux, pains, sucreries, fruits secs			
Cacahuètes	54,6	17,8	23,1
Chamallows	0	80	3
Chocolat en poudre	3,1	80	4,5
Cookies au chocolat	26	63	6,5
Dattes	0,3	77	5
Figues sèches	1	70	3,5
Gaufres liégeoises	21	55	6
Pain de mie	4	52	8
Palets bretons	31	57	7,3
Quatre quart	22	50	6
Sprits	32,4	56,1	4,9
Tonimalt ®	2,2	81	7,2

Tableau 5. Apports caloriques des aliments de base du régime Cafétéria.

La préparation du régime Cafétéria est réalisée trois fois par semaine : les aliments frais sont mixés et quelques grammes de nourriture standard sont ajoutés sous forme de poudre ou sous forme de croquettes. Les aliments utilisés pour préparer chaque régime ont été choisis à l'avance et sont répartis de telle sorte que les pourcentages de lipides, glucides et protéines varient peu d'un régime à l'autre (Tableau 6).

Régime 1	Régime 2	Régime 2b	Régime 3	Régime 4	Régime 5
3620 kCal/kg	3250 kCal/kg	3350 kCal/kg	3560 kCal/kg	3640 kCal/kg	3720 kCal/kg
Rillettes 20g	Pâté de foie 30g	Pâté de foie 30g	Terrine 30g	Cervelas 15g	Jambon blanc 30g
Emmental 30g	Babybel 30g	Babybel 30g	Raclette 20g	Emmental 60g	Cacahuètes 20g
Gaufres 30g	Quatre-quart 30g	Quatre-quart 30g	Cookies 30g	Pain de mie 25g	Sprits 30g
Chamallows 20g	Figues 20g	Tonimalt 20g	Dattes 15g	Palets bretons 30g	Chocolat en poudre 15g
Croquettes A04 30g	Croquettes A04 30g	Croquettes A04 30g	Croquettes A04 30g	Croquettes A04 30g	Croquettes A04 30g

Tableau 6. Composition des régimes Cafétéria.

2. Protocole expérimental

Au début des expérimentations, les rats sont répartis aléatoirement entre les différents groupes de régimes et sont placés en cage individuelle afin d'éviter les compétitions entre animaux face à la nourriture. Ils sont nourris *ad libitum* et la nourriture proposée est changée régulièrement afin qu'elle reste fraîche. La prise de poids ainsi que les prises alimentaires et hydriques de chaque rat sont mesurées trois fois par semaine.

En fin d'expérimentation, les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de Pentobarbital Sodique (54,7 mg.mL⁻¹) à raison de 100 mL/100g, soit 54,7 mg.kg⁻¹. Le cœur, les tissus adipeux épидидymal, rétropéritonéal, périrénal, abdominal et brun sont prélevés et pesés. Une partie du tissu adipeux sous-cutané, située entre la dernière côte et la patte de l'animal est également prélevée et pesée.

Trois études distinctes présentant chacune des caractéristiques différentes ont été réalisées au cours de ce travail.

1^{ère} étude (E1)

35 rats mâles Sprague-Dawley âgés de 7 semaines sont répartis en 5 groupes : un groupe nourri avec le régime HF-Lard (groupe « Lard »), un groupe nourri avec le régime HF-Coco (groupe « Coco »), un groupe nourri le régime High-Sucrose (groupe « Sucrose »), un groupe nourri avec le régime Cafétéria « régime 1 »³ (groupe « Cafétéria») et un groupe nourri avec le régime témoin 210 (groupe « Contrôle»). La durée de l'étude est de 9 mois.

2^{ème} étude (E2)

12 rats mâles Sprague-Dawley âgés de 7 semaines sont répartis en 3 groupes : un groupe nourri avec le régime enrichi en graisse de porc commercialisé par SAFE (groupe « Lard»), un groupe nourri avec un régime cafétéria varié (groupe « Cafétéria ») et un groupe, servant de groupe Contrôle, nourri avec le régime témoin 210. Le régime Cafétéria utilisé dans cette étude était plus diversifié que celui utilisé dans l'étude E1. Les régimes Cafétéria 1, 2, 3, 4 et 5 sont proposés en alternance tous les 2 ou 3 jours aux animaux : chaque régime est donc donné au moins une fois dans un laps de temps de deux semaines. La durée de l'étude est de 7 semaines.

3^{ème} étude (E3)

10 rats mâles Sprague-Dawley âgés de 9 semaines sont répartis en 2 groupes : un groupe est nourri avec un régime Cafétéria (groupe « Cafétéria »), les régimes Cafétéria 2, 3, 4 et 5 étant donnés en alternance aux animaux et un groupe « Contrôle » reçoit le régime standard A04. La durée de l'étude est de 12 semaines.

³ Voir Tableau 6

3. Expression des résultats et analyses statistiques.

Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type. Une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs a été utilisée pour mettre en évidence l'interaction entre l'effet du temps et celui du régime. Une ANOVA simple a été utilisée pour comparer les 3 groupes entre eux à différents temps. Enfin, un test *post hoc* Fischer PLSD nous a permis de déterminer les interactions entre les groupes. La comparaison des groupes à différents temps a été effectuée par des tests *t* de Student (valeurs non appariées) lorsque deux groupes seulement étaient comparés. La limite de significativité est fixée à 5 % ($p < 0,05$). Toutes les analyses ont été réalisées grâce au logiciel StatView (StatView, ASA institute inc. Version 5.0.1, Cary Caroline du nord USA).

II. RESULTATS

1. Première étude

La masse corporelle des rats a été évaluée tout au long du régime (Figure 24). Au début du régime, les animaux âgés de 7 semaines pesaient en moyenne 209 ± 19 g. Après 9 mois de régime, les animaux Contrôle, Cafétéria, Lard, Coco et Sucrose pesaient respectivement 515 ± 45 g, 550 ± 34 g, 602 ± 64 g, 555 ± 48 g et 554 ± 43 g. Seule la masse corporelle des animaux du groupe Lard augmente significativement par rapport à celle des animaux du groupe Contrôle, et ce à partir du 265^{ème} jour de régime (soit 8,5 mois après le début du régime). Le poids des animaux Contrôle a ainsi augmenté de 146 % entre le début et la fin du régime et celui des animaux Lard de 188 %.

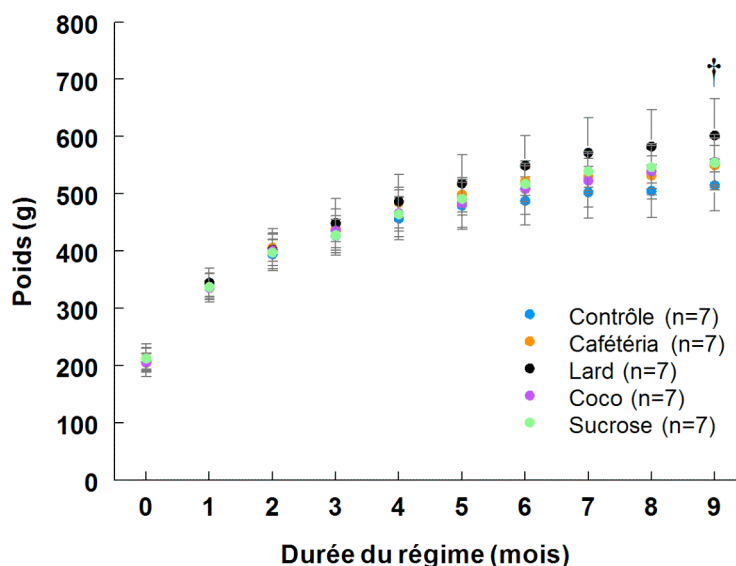


Figure 24. Evolution de la masse corporelle des animaux durant E1.

Les rats sont âgés de 7 semaines en début d'expérience. Moyennes \pm ET. † $p < 0,01$, Contrôle vs. Lard

La quantité de tissu adipeux a été évaluée après 9 mois de régime, en fin de protocole (Figure 25). Les rats des groupes Lard et Coco présentent un pourcentage de tissu adipeux rapporté au poids de l'animal significativement plus important que les rats du groupe Contrôle, pour les tissus adipeux épидидymal, sous-cutané, rétro-péritonéal et abdominal. Ainsi, le rapport tissu adipeux sous-cutané sur poids de l'animal est 1,8 et 1,4 fois plus important chez les animaux des groupes Lard et Coco respectivement par rapport au groupe Contrôle. Les animaux du groupe Coco présentent un rapport tissu adipeux périrénal/poids de l'animal significativement plus important que les animaux nourris avec un régime Contrôle. Enfin, les animaux du groupe Lard ont en moyenne un rapport tissu adipeux brun sur poids de l'animal supérieur à celui des animaux du groupe Contrôle.

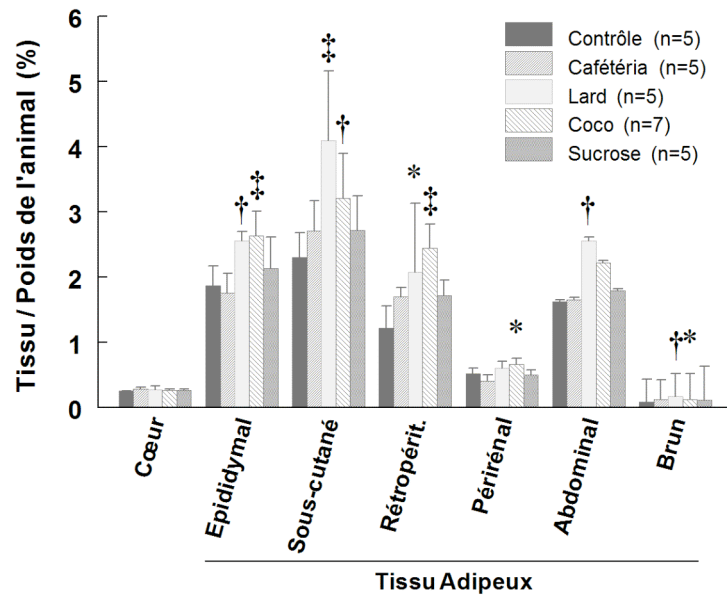


Figure 25. Tissu adipeux en fin de régime (E1).

Quantité de tissu rapportée au poids de l'animal (%) des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard après 9 mois de régime. Rétropérit. : rétropéritonéal. Moyennes \pm ET. * $p < 0,05$, † $p < 0,01$ et ‡ $p < 0,001$: vs. Contrôle

2. Seconde étude

Au début du régime, les animaux âgés de 7 semaines pesaient en moyenne 227 ± 6 g. Leur poids n'était pas significativement différent d'un groupe à l'autre. L'évolution du poids des animaux lors de l'étude E2 est présentée Figure 26.

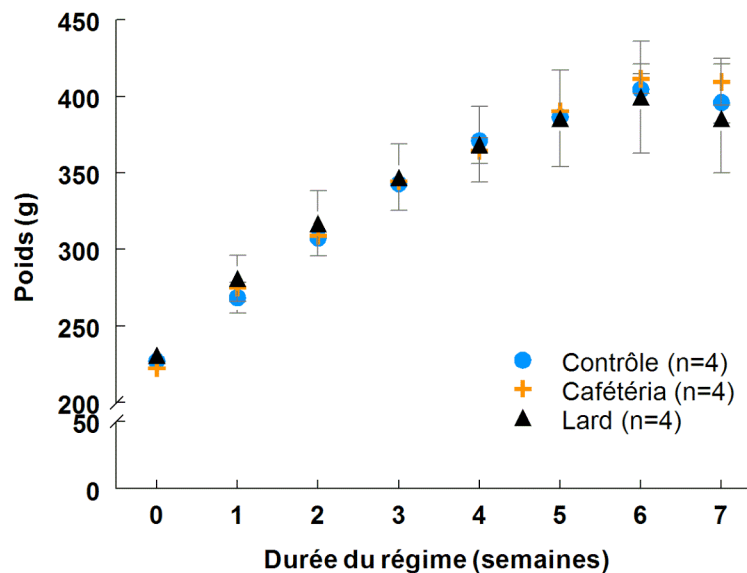


Figure 26. Evolution de la masse corporelle des animaux durant E2.

Les rats sont âgés de 7 semaines en début d'expérience. Moyennes \pm ET.

La prise de poids est régulière et l'analyse statistique des données montre que l'évolution des courbes de poids est la même, quel que soit le régime consommé par les animaux. En outre, après 7 semaines de régime, les poids moyens des animaux des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard étaient respectivement de 396 ± 13 g, 409 ± 15 g et 385 ± 36 g et n'étaient donc pas significativement différents. De même, la mesure *post-mortem* de la quantité de tissu adipeux ne montre pas de différence significative entre le groupe Contrôle et les groupes Lard et Cafétéria. Le poids du cœur est également identique pour les différents groupes d'animaux (Figure 27).

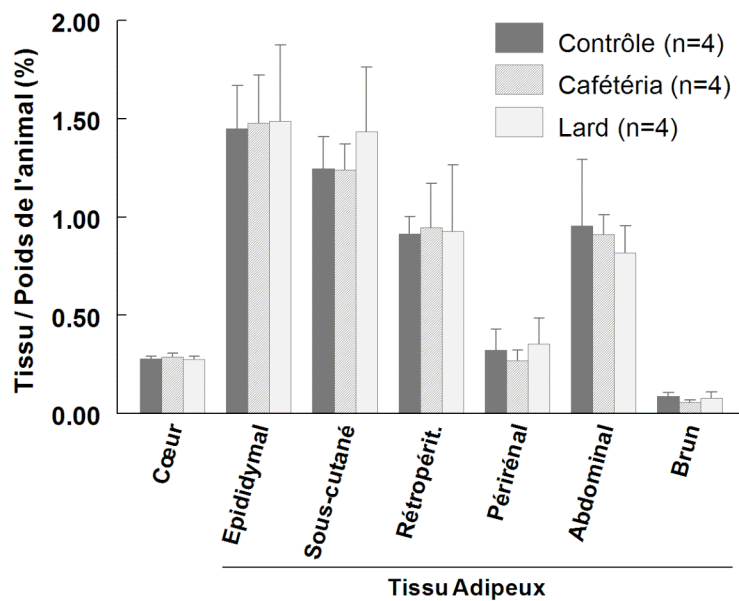


Figure 27. Tissu adipeux en fin de régime (E2).

Quantité de tissu rapportée au poids de l'animal (%) des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard après 7 semaines de régime. Rétropérit. : rétropéritonéal. Moyennes \pm ET

3. Troisième étude

Au début de cette troisième étude, les animaux étaient âgés de 9 semaines et leur poids moyen était de 282 ± 9 g. Dès la quatrième semaine de régime, le poids des animaux du groupe Cafétéria est supérieure à celui des animaux nourris avec un régime standard et cette différence devient statistiquement différente dès la 9^{ème} semaine de régime et est observable jusqu'à la fin de l'étude (Figure 28). Ainsi, après 12 semaines de régime, le poids des animaux Contrôle est en moyenne de 426 ± 27 g contre 488 ± 33 g pour les animaux du groupe Cafétéria, soit des pourcentages d'augmentation respectifs de 51 % et 73 % entre le début et la fin du régime.

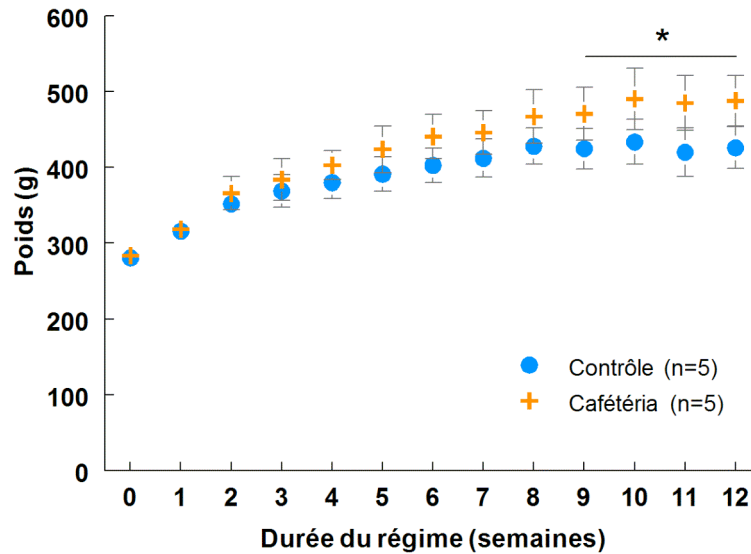


Figure 28. Evolution de la masse corporelle des animaux durant E3.

Les rats sont âgés de 9 semaines au début de l'expérience. Le groupe Contrôle est nourri avec le régime standard.
* $p < 0,05$: Contrôle vs. Cafétéria. Moyennes \pm ET.

La prise alimentaire des animaux a été évaluée pendant toute la durée de l'étude. Les résultats observés sont représentés Figure 29. La prise alimentaire, exprimée en kcal.jour^{-1} est plus importante chez les rats consommant le régime Cafétéria. Les animaux du groupe Contrôle consomment en moyenne $66 \pm 4 \text{ kcal.jour}^{-1}$ alors que les animaux du groupe Cafétéria consomment en moyenne $85 \pm 5 \text{ kcal.jour}^{-1}$ ($p < 0,05$).

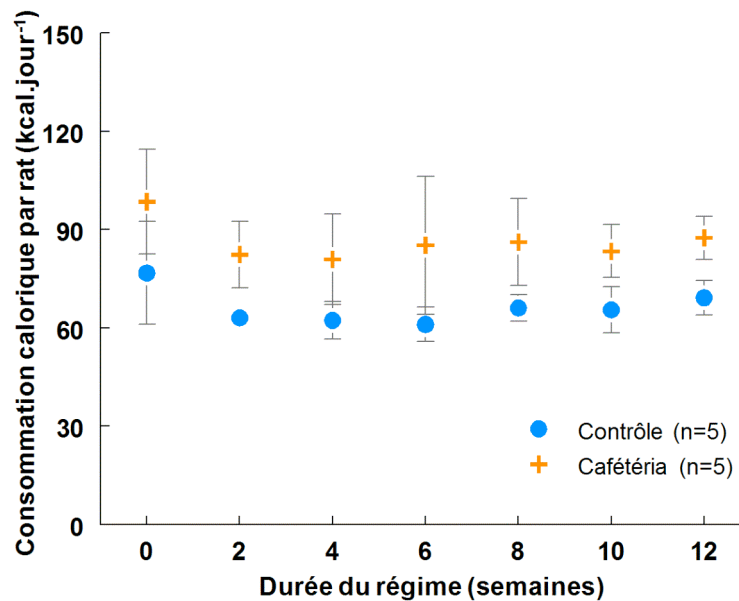


Figure 29. Prise alimentaire des rats

Contrôle et Cafétéria durant les 12 semaines de régime (E3). Moyennes exprimées en $\text{kcal.jour}^{-1} \pm \text{ET}$

Les prélèvements de différents tissus adipeux en fin de protocole (Figure 30) ont permis d'établir des différences significatives entre les adiposités des animaux nourris avec un régime Cafétéria par rapport à ceux du groupe Contrôle. Après 12 semaines de régime, le tissu adipeux épидидymal représente $0,84 \pm 0,08$ % du poids des animaux du groupe Contrôle et $1,46 \pm 0,042$ % du poids des animaux du groupe Cafétéria ($p = 0,01$). Le pourcentage de tissu adipeux sous-cutané est également plus important chez les animaux du groupe Cafétéria que chez les animaux du groupe Contrôle ($2,08 \pm 0,43$ % vs. $1,26 \pm 0,14$ %, $p < 0,01$). Les autres tissus adipeux étudiés ne présentent pas de différence significative entre les groupes.

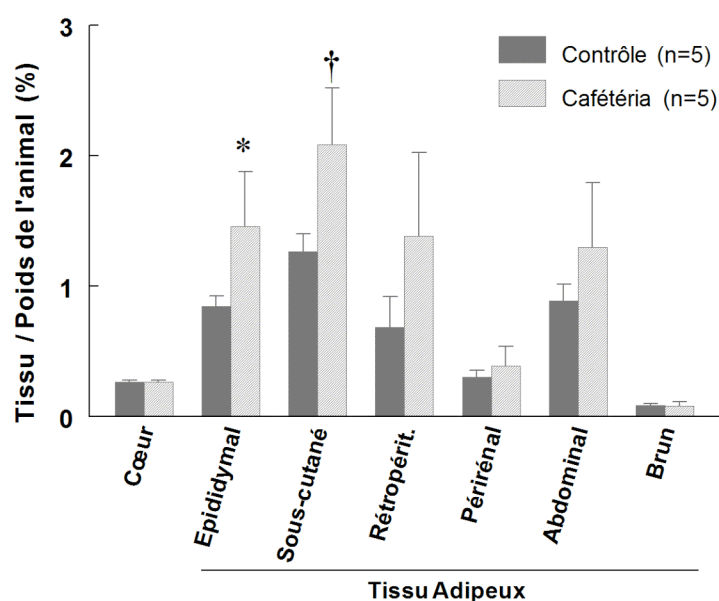


Figure 30. Tissu adipeux en fin de régime (E3).

Quantité de tissu rapportée au poids de l'animal (%) des groupes Contrôle et Cafétéria après 12 semaines de régime. Moyennes \pm ET. * $p < 0,05$, † $p < 0,01$: vs. Contrôle.

III. DISCUSSION

Pour étudier l'effet de l'obésité sur le développement d'une éventuelle insulino-résistance, il était nécessaire de disposer d'un modèle expérimental d'induction de l'obésité fiable et reproductible. Le protocole de mesure de l'insulino-résistance avec le 6DIG ayant été développé chez le rat et de nombreuses publications de la littérature portant sur cette espèce, c'est ce modèle animal qui a été choisi pour cette étude. Afin d'être le plus proche possible des caractéristiques de l'obésité retrouvées chez l'homme dans les sociétés industrialisées, les animaux présentant une obésité génétique, tels que les rats Zucker, n'ont pas été choisis pour l'étude. De même, les méthodes de gavage de l'animal ont été exclues et les animaux ont été laissés libres de leur prise alimentaire : seule la composition des régimes a donc varié d'un groupe à l'autre. L'utilisation de rats mâles a permis de minimiser les perturbations du métabolisme liées aux variations hormonales retrouvées chez les animaux femelles. Dans la littérature, la souche, le sexe, l'âge des rats en début de régime ainsi que les propriétés

énergétiques des régimes utilisés sont très variables d'une étude à l'autre. Il est donc difficile de les comparer réellement. De même, il est difficile de reproduire à l'identique un régime déjà décrit. Plusieurs régimes alimentaires ont été testés, afin d'induire différents degrés d'obésité. Plusieurs séries d'expérimentation ont donc été nécessaires pour obtenir un modèle expérimental répondant à nos exigences.

L'obésité est définie par l'OMS comme une « accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé ». Chez l'homme, on distingue plusieurs formes d'obésité, n'ayant pas toutes les mêmes conséquences pathologiques : la simple mesure de la masse corporelle ne peut suffire à définir un individu comme obèse ou mince. Le calcul de l'indice de masse corporelle (IMC), qui tient compte à la fois de la masse corporelle et de la taille de l'individu, permet d'estimer de manière simple et relativement efficace le surpoids ou l'obésité chez l'adulte. D'autres mesures, plus précises, permettent d'évaluer la masse adipeuse, plus prédictive de l'apparition des pathologies liées à l'obésité. On pourra par exemple citer l'impédancemétrie, la mesure des plis cutanés ou encore des techniques d'imagerie telles que le scanner ou l'IRM. Chez l'animal, il n'existe pas de méthode simple pour évaluer l'obésité. L'équivalent de l'IMC, l'index de Lee, nécessite la mesure de la longueur naso-anale de l'animal. Or, il a été montré que cette mesure pouvait varier selon l'état de relâchement dans lequel se trouve l'animal anesthésié et que cet index n'était pas fiable (Stephens, 1980). D'autre part, les appareils types « scanners » dédiés au petit animal ne sont pas facilement disponibles. Au cours de notre première étude (E1) consacrée à la mise en place du modèle animal, nous avons cherché à quantifier la masse adipeuse sous-cutanée et viscérale en utilisant des images scanners obtenues à partir d'un scanner dédié à l'homme. Cependant, les images n'ont pas permis de valider une méthode de mesure quantitative de la masse adipeuse chez les animaux : en effet, les résultats issus de l'analyse des images scanners permettaient de conclure à l'existence de différences significatives entre les groupes d'animaux qui pourtant n'apparaissaient pas dans l'étude *post-mortem* du pourcentage de graisse corporelle. Récemment, plusieurs publications ont démontré la faisabilité d'une mesure de la masse adipeuse chez le rat anesthésié. Ces techniques sont basées sur l'utilisation de la micro Computed Tomography (μ CT) (Judex, 2010 ; Granton, 2010). De nombreuses études se basent uniquement sur le poids des animaux pour considérer qu'un animal est obèse. Dans ce travail, nous avons donc utilisé la masse corporelle, complétée par la mesure de la quantité de tissu adipeux à la fin de chaque expérience, pour estimer l'obésité des animaux.

Le modèle expérimental mis en place pour étudier les liens entre l'insulino-résistance et l'obésité devait répondre à plusieurs conditions : il devait permettre de mettre en évidence une différence de poids significative et une augmentation du pourcentage du tissu adipeux, afin d'être certain que la différence de poids observée était liée au moins en partie à une accumulation excessive de graisse chez les animaux.

Dans nos différentes études, la prise de poids des animaux était globalement régulière, hormis quelques accidents transitoires liés à l'arrivée de nouveaux animaux dans l'animalerie. La pesée de la prise alimentaire, trois fois par semaine, a permis de s'assurer qu'aucune des alimentations proposées n'était rejetée par les animaux. De la même façon, la prise hydrique a été vérifiée régulièrement, de grandes variations dans la prise hydrique étant souvent associées à des variations de la masse corporelle.

Dans un premier temps, l'évolution de la masse corporelle ainsi que la proportion de tissu adipeux en fin de protocole ont été évaluées pour cinq régimes : un régime riche en acides gras saturés (régime HF-Lard), un régime riche en acides gras saturés et insaturés (régime HF-Coco), un régime riche en glucides (régime H-Sucrose) et enfin un régime dans lequel les apports glucidiques et lipidiques sont également répartis (régime Cafétéria). L'utilisation de régimes alimentaires différents permettait d'envisager l'apparition de degrés variables d'obésité chez les animaux en fonction du régime alimentaire proposé. Les premiers résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence une augmentation rapide de la masse corporelle des animaux, qu'ils soient nourris avec un régime riche en lipides et en glucides ou un régime enrichi en acides gras saturés. Seuls les animaux du groupe Lard présentaient en moyenne une masse corporelle plus importante que les animaux du groupe Contrôle mais après plus de 8 mois de régime. Les paramètres retenus pour ce régime ne permettaient pas le développement rapide de l'obésité. Une autre étude a donc été envisagée, avec trois groupes d'animaux : Contrôle, Cafeteria et Lard. Lors de la première étude, le régime Cafétéria était composé de 4 aliments uniquement : rillettes, emmental, gaufres industrielles et guimauve. L'hypothèse d'une habitude au régime a été envisagée : des publications font en effet état de l'importance d'une grande diversité alimentaire pour induire l'hyperphagie dans le cas d'un régime Cafétéria (LeMagen, 1974, Shafat, 2009). Un nouveau régime Cafétéria, plus diversifié, a été mis en place afin d'alterner plusieurs régimes types, dont la composition a été déterminée à l'avance. L'appétence, c'est-à-dire la consommation spontanée d'un régime par l'animal, et la palatabilité du régime (c'est-à-dire le fait que les aliments soient agréables à manger) ont été vérifiées sur quelques animaux témoins avant le début de l'étude. Les différents aliments utilisés pour la préparation du régime Cafétéria ont été répartis de manière à ce que les apports énergétiques soient similaires entre les menus. A l'issue de la deuxième expérience, aucune différence de masse corporelle n'est cependant observée entre les groupes Contrôle, Cafétéria et Lard.

Au vu des résultats obtenus lors de ces deux expériences, plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer ces résultats. Individuellement, les animaux ne réagissent pas tous de la même façon lorsqu'ils sont soumis à un régime hypercalorique, certains présentant notamment une adaptation au régime : la résistance à l'obésité est un phénomène fréquemment décrit (Bessesen, 2008). Certains auteurs sélectionnent les animaux « résistants » et les excluent de la suite des expérimentations (Leibowitz, 2007). Cependant,

cette technique nécessite d'une part de définir précisément le seuil d'exclusion des animaux et d'autre part de pouvoir commencer les études sur un grand nombre d'animaux. Des publications ont montré l'importance de l'âge auquel les régimes alimentaires étaient initiés pour permettre de mettre en évidence une prise de poids/obésité importante des animaux. Des animaux Sprague-Dawley nourris avec un régime hyperénergétique une semaine après le sevrage ne présentent pas de différence de poids significative après 40 jours de régime, bien que leur masse adipeuse soit plus élevée et qu'ils présentent certaines caractéristiques du syndrome métabolique (Mercer, 2008). Inversement, des auteurs ont suggéré que les faibles perturbations métaboliques observées chez des animaux Wistar nourris avec un régime High-Fat 45 % pouvaient être attribuées au fait que le régime avait débuté chez des animaux trop âgés (9-10 semaines) (Sampey, 2011). Nous avons choisi de commencer nos expérimentations ultérieures sur des animaux plus âgés. Nous nous sommes également aperçus que les courbes de masse corporelle des animaux Contrôle étaient légèrement supérieures aux courbes moyennes fournies par la société Harlan. La composition du régime utilisé pour les rats Contrôle (Régime 210) était légèrement différente du régime utilisé couramment dans les animaleries (Régime A04). Le régime 210 (régime « témoin ») est en effet plus riche en lipides que le régime standard A04 (respectivement 13 % et 9 % des calories sont apportées par les graisses). Le régime 210 est commercialisé en tant que régime « témoin » des régimes HF-Lard et HF-Coco : sa composition est telle que les apports en acides aminés sont identiques entre les régimes High-Fat et le régime « Contrôle ». Cependant, sa composition lipidique en fait un régime particulier. Nous avons donc choisi de nourrir nos animaux Contrôle avec un régime standard A04 dans les protocoles suivants.

Une nouvelle série d'expérimentation a donc été réalisée sur des rats plus âgés (9 semaines au lieu de 7 semaines) et le régime 210 des rats du groupe Contrôle a été remplacé par le régime A04 standard. Cette série nous a permis de mettre en évidence une augmentation significative de la masse corporelle des animaux du groupe Cafétéria dès la 9^{ème} semaine de régime. De plus, l'augmentation significative du pourcentage de masse des tissus adipeux épидidymal et sous-cutané a permis de confirmer que l'augmentation de la masse corporelle était due, au moins en partie, à un développement anormal du tissu adipeux chez les animaux nourris avec un régime enrichi en lipides et en glucides. L'analyse de la prise alimentaire montre une consommation de calories plus importante dans le groupe Cafétéria par rapport au groupe Contrôle. La prise de poids relativement rapide permet d'envisager des études longitudinales de l'évolution de l'insulino-résistance, c'est-à-dire une étude au moment où la différence de poids entre les animaux Contrôle et les animaux des groupes High-Fat est faible et une autre lors de laquelle la différence de poids est plus importante.

Les mesures régulières de la prise alimentaire nous ont permis d'observer que certaines associations d'aliments du régime Cafétéria n'étaient plus supportées par les animaux : en effet, nous avons observé une perte de masse corporelle brutale et simultanée

chez tous les animaux Cafétéria, alors que leur prise alimentaire était identique. Ces mêmes aliments proposés une nouvelle fois quelques jours plus tard aux mêmes animaux avaient les mêmes conséquences. De façon surprenante, ces mêmes aliments proposés simultanément à d'autres rats de l'animalerie n'induisaient pas de perte de poids. Nous n'avons pas réussi à trouver d'explication à cette observation. Certains régimes ont donc été modifiés par la suite. Ce problème a également eu lieu dans les expériences suivantes pour l'un des menus proposé aux animaux.

Suite à ces premiers résultats, nous avons choisi pour mener à bien nos études sur le développement de l'insulino-résistance de soumettre à des régimes Cafeteria et High-Fat Lard des rats mâles âgés de 8 semaines

2^{ème} partie : Etude du développement de l'obésité et de l'insulino-résistance avec le 6DIG

I. MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1.1. Animaux et régimes alimentaires

Les expériences sont menées sur des rats mâles Sprague-Dawley (Harlan, France), normoglycémiques et normoinsulinémiques, âgés de 8 semaines à leur arrivée au laboratoire. Les animaux sont gardés en animalerie standard (cycle jour/nuit de 12h/12h) et sont laissés une semaine en stabulation avant le début des manipulations.

Les régimes High-Fat Lard et A04 utilisés pour les expériences sont fournis par la société SAFE (France). Le régime Cafétéria est préparé au laboratoire⁴.

1.2. Le 6DIG

Le [¹²⁷I]-6-Déoxy-6-Iodo-D-Glucose ou 6DIG (Figure 31) est fourni par la société ERAS Labo (St Nazaire les Eymes, France). Il est synthétisé à partir du 6-déoxy-6-iodo-1,2,3,4-tetra-O-acétyl-β-D-glucopyranose par désacétylation (Bignan, 1993). Le radiomarquage, réalisé au laboratoire, consiste en un échange isotopique ¹²⁵I/¹²⁷I (Mathieu, 1982).

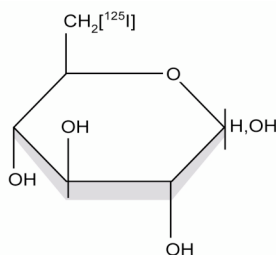


Figure 31. Le [¹²⁵I]-6-déoxy-6-iodo-D-glucose ou 6DIG.

⁴ La composition des différents régimes est détaillée en première partie de ce travail, p. 91 et suivantes.

Lorsqu'il est utilisé à des fins expérimentales, le 6DIG est marqué à l'iode 125 (T1/2 = 59,9 jours) plutôt qu'à l'iode 123 (T1/2 = 13,2 heures), élément utilisé en clinique, afin de limiter le nombre de radiomarquages.

Cinq milligrammes d'analogie iodé (¹²⁷I-6DIG) sont solubilisés dans 1mL d'acétone. 4 µL d'une solution de 1mg.mL⁻¹ Na¹²⁷I et 1,85.10⁸ Becquerel (5 mCi) de solution Na¹²⁵I (dans NaOH 2,02 M) sont ajoutés. Le mélange est incubé à 95°C pendant 60 minutes. Après refroidissement à 70°C, l'acétone est éliminée par évaporation sous vide. Le 6DIG est ensuite récupéré dans 3mL de NaCl (0,9 %) et purifié sur une résine anionique AG1-X8 Bio Rad). Cette résine permet l'échange réversible des anions ¹²⁵I⁻ libres (15 à 20 % de l'activité mesurée en fin de marquage) : la pureté radiochimique de la solution est alors évaluée par chromatographie liquide haute performance (CHLP, Shimadzu, phase solide RP18, éluant : eau, débit : 7 ml.min⁻¹) à plus de 95 %.

La stabilité de la molécule est également vérifiée par CHLP après chaque radiomarquage. On observe sur le chromatogramme un premier pic correspondant aux résidus d'iode 125 libres et deux pics plus importants, correspondant aux anomères α et β du 6DIG dont l'élution se fait à deux vitesses différentes. Le 6DIG marqué reste stable au moins 60 jours *in vitro* dans le NaCl (Figure 32). La stabilité *in vivo* dans le sang et les urines a été également étudiée en fin de protocole (Figure 33 : la proportion d'iode libre à 45 minutes est d'environ 5 % dans les urines et d'environ 11 % dans le sang, signe d'une faible desiodation de la molécule, mais le 6DIG n'est pas modifié 45 minutes après son injection *in vivo* (Thèse de J.Vollaire, 2010).

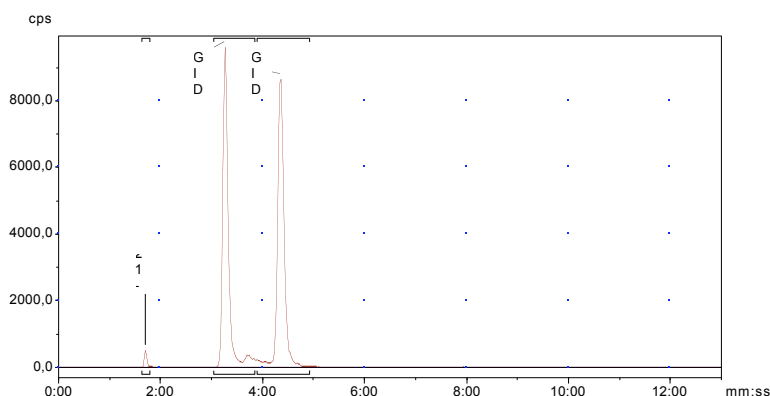


Figure 32. Stabilité du 6DIG 60 jours après marquage

Stabilité effectuée sur colonne : C18 waters spherisorbe 5µm ODS2, éluant : H₂O pure. La durée de 60 jours est à peu près égale à une période de l'iode 125. (Thèse de J.Vollaire, 2010)

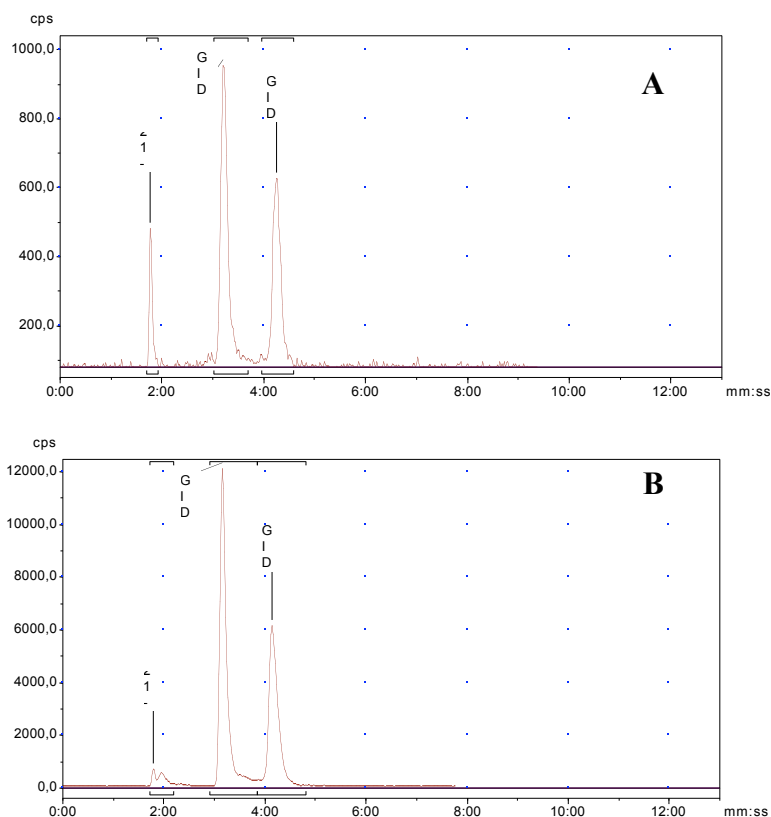


Figure 33. Etude *in vivo* du métabolisme du 6DIG chez le rat Wistar.

Les prélèvements sanguins (A) et urinaires (B) ont été réalisés 45 minutes après l'injection du traceur. Le sérum a été purifié par ultracentrifugation (Etude CLHP colonne C18, phase mobile aqueuse). (Thèse de J.Vollaire, 2010)

1.3. Acquisition de la radioactivité

Dans le cœur, la radioactivité est détectée par imagerie planaire grâce à une gamma-caméra dédiée à l'imagerie du petit animal (γ -caméra, Biospace Lab, France), dont la résolution intrinsèque est de 2 mm et le champ de vue de 10 cm (Figure 34). Elle est équipée d'un collimateur spécifique à l'iode 125. L'acquisition des données se fait en temps réel par le logiciel γ -acquisition également fourni par Biospace Lab.

Dans le muscle squelettique, la radioactivité est détectée au moyen d'une sonde NaI (P14, Bicon Corp., USA), couplée à un analyseur multicanaux fonctionnant en multi-échelles (SM512, Novelec, France) (Figure 34). La zone de détection est délimitée par un collimateur (3 cm de diamètre), fabriqué dans une plaque de plomb de 5 mm d'épaisseur. Ce système permet de garder une zone de détection identique entre les animaux. L'échantillonnage temporel de la mesure est de 10 secondes.

La mesure de l'activité injectée à l'animal se fait dans une chambre d'ionisation (CRC15R Capintec, Ariès, France).

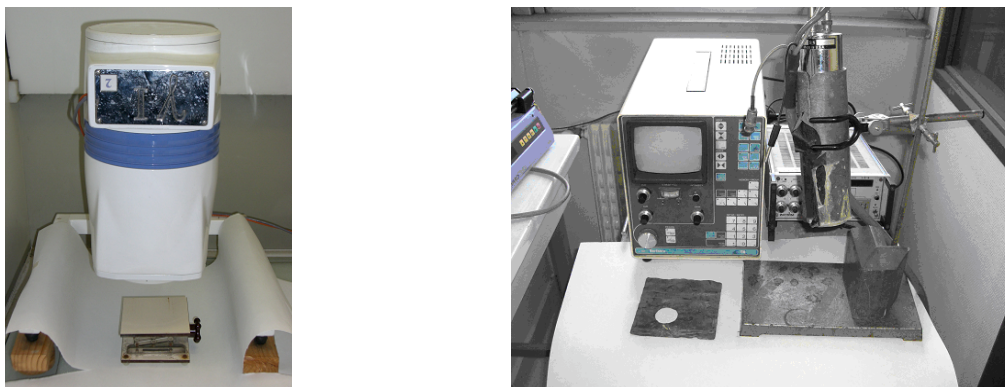


Figure 34. Gamma-caméra et sonde NaI utilisées pour détecter la radioactivité.

2. Méthodes

2.1. Animaux et régimes

32 rats mâles Sprague-Dawley ont été séparés en 3 groupes nourris *ad libitum* avec différents régimes. Un groupe est nourri avec le régime High-Fat Lard, un groupe est nourri avec un régime Cafétéria et un troisième groupe est nourri avec un régime standard A04. Chaque groupe est ensuite divisé en deux sous-groupes : la moitié des rats permettra la mesure de l'insulino-résistance (groupe 6DIG) et l'autre moitié (groupe Dosage) permettra d'étudier l'effet des différents régimes alimentaires sur certains paramètres sanguins (Figure 35).

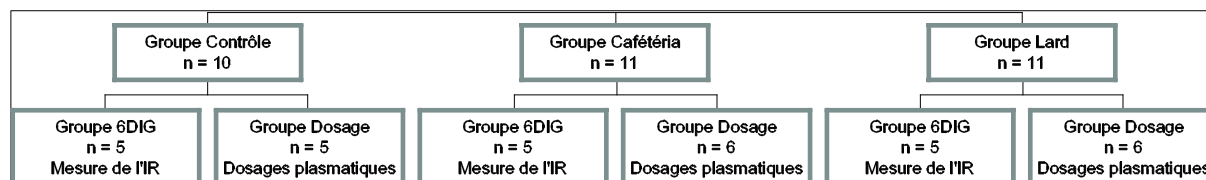


Figure 35. Répartition des animaux entre les différents groupes expérimentaux.

Les mesures de l'insulino-résistance sont effectuées sur les animaux du groupe « 6DIG ». Le groupe « Dosage » subira des prises de sang régulières afin de mesurer certains paramètres d'intérêts.

Le poids des rats et leur consommation calorique ont été mesurés trois fois par semaine. Les rats Cafétéria sont nourris en alternance tous les 2-3 jours avec l'un des régimes (2 à 5) présentés dans le Tableau 6.

2.2. Prélèvements et analyses biologiques

2.2.1 Prélèvements sanguins

Des prélèvements sanguins sont réalisés en début de régime (J0), et après 1, 2 et 3 mois de régime (Figure 36) afin de permettre le dosage et le suivi au cours du temps de

différentes molécules d'intérêt : glucose, insuline, cholestérol, triglycérides et de deux adipokines (la leptine et l'adiponectine).

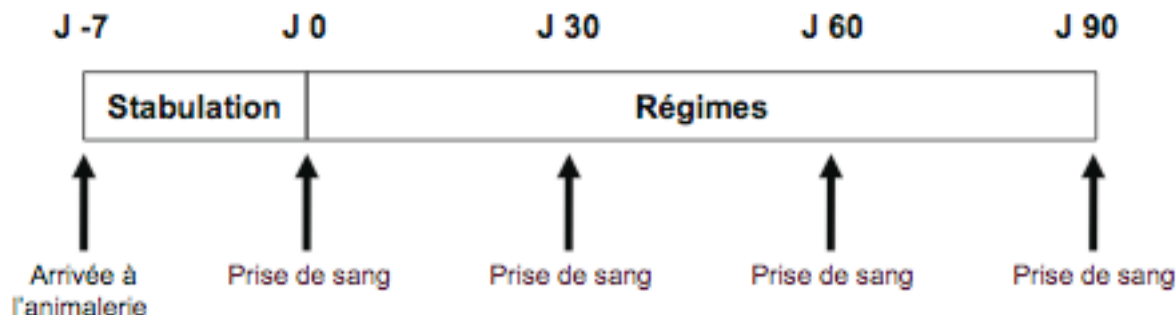


Figure 36. Protocole général de l'étude des paramètres sanguins d'intérêt.

Les dosages plasmatiques sont réalisés tous les mois. En fin de protocole, les animaux sont euthanasiés afin de procéder à des prélèvements tissulaires.

Les rats sont mis à jeun environ 10 heures avant le début de l'expérience. Pendant toute la durée du prélèvement sanguin, les rats sont enveloppés dans un tissu et maintenus par un expérimentateur, dans un environnement calme. Un cathéter à ailette 24G (BD Insyte-N) préalablement hépariné est alors placé dans une veine caudale. Le sang est récolté dans des tubes Eppendorf également héparinés. Après 15 min à 4°C, les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 3000g à 4°C puis aliquotés (100 µL) et congelés à -90°C jusqu'au jour de l'analyse biologique.

En fin de protocole, différents tissus adipeux sont prélevés et pesés : épидидymal, rétropéritonéal, péirirénal, sous-cutané, abdominal. Le cœur et le tissu adipeux brun interscapulaire, une partie du foie et du muscle squelettique sont également prélevés.

2.2.2 Dosages plasmatiques

L'insuline, l'adiponectine et la leptine sont dosées par RadioImmunoAssay (RIA). Le radioélément utilisé dans les kits RIA est l'iode 125. Le comptage de la radioactivité se fait à l'aide d'un compteur gamma (Cobra II auto-gamma, Packard). Les kits de dosage sont fournis par Linco Research Inc. (Etats-Unis). Les dosages de l'adiponectine sont réalisés sur 5 µL de plasma et les dosages de la leptine et de l'insuline sont réalisés sur 50 µL de plasma.

Les dosages du cholestérol, des triglycérides et de la glycémie sont réalisés sur 100 µL de plasma par un automate (Equipment Modular Roche Diagnostics) au Département de Biologie Intégré du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble (Dr Anne-Sophie Gauchez).

2.2.3 Extraction et dosage des triglycérides ectopiques

2.2.3.1 Extraction des triglycérides intramusculaires

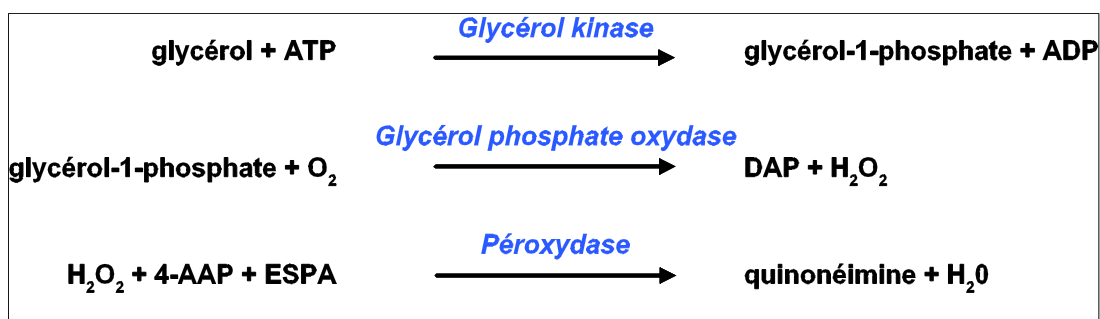
L'extraction des triglycérides intramusculaires est réalisée selon la méthode de Folch (Folch, 1957). Environ 100 mg de muscle quadriceps sont pesés et écrasés au potter manuel, dans un mortier en porcelaine. La préparation, additionnée de 2 mL d'un mélange dichlorométhane/méthanol (2:1) est incubée 1h30 à température ambiante. Les échantillons sont centrifugés pendant 10 min à 3000g et la phase liquide est récupérée. Après ajout de 0,4 mL de NaCl 0,9 %, la solution est centrifugée pendant 10 min à 1000g. La phase supérieure est alors éliminée par aspiration et la phase inférieure est éliminée par évaporation (environ 1h à 50°C). Les triglycérides sont ensuite remis en suspension dans 60 µL de tertbutanol et 40 µL d'un mélange de triton X-114/méthanol (2:1).

2.2.3.2 Extraction des triglycérides hépatiques

Les triglycérides hépatiques sont extraits selon la méthode décrite par Xu *et al.* (2006). Environ 100 mg de foie sont pesés et écrasés au potter manuel puis sont recouverts par 1 mL d'éthanol. La solution est ensuite homogénéisée au vortex pendant 2 min, puis centrifugée 10 min à 14000g. Le surnageant contenant les triglycérides est utilisé pour réaliser le dosage.

2.2.3.3 Méthode de dosage des triglycérides

La méthode de dosage des triglycérides est équivalente pour le dosage des triglycérides intramusculaires et hépatiques. Il s'agit d'une méthode enzymatique qui repose sur le dosage du glycérol issu de l'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase, selon les réactions suivantes :



DAP : dihydroxyacetone phosphate; AAP : 4-aminoantipyrine; ESPA : 4 aminoantipyrine and sodium N-ethyl-N-(3-sulfopropyl) m-anisidine.

L'ajout de glycérol kinase, de glycérol phosphate oxydase et de peroxydase produit une suite de réactions enzymatiques couplées qui conduit à la formation de quinoémine, un colorant qui absorbe la lumière à 540 nm. L'absorbance à cette longueur d'onde est donc directement proportionnelle à la concentration de glycérol.

Le dosage est réalisé avec le kit GPO-TG (Glycerol Phosphate Oxidase-Triglyceride) commercialisé par Sigma-Aldrich (France). Le dosage est effectué sur 10 µL d'eau, de Glycerol Standard ou d'échantillons, ajoutés à 800 µL de Free Glycerol Reagent. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, l'absorbance initiale (AI) à 540 nm est mesurée. 200 µL de Triglyceride Reagent sont alors ajoutés dans chaque cuve, et après une nouvelle incubation de 15 min à température ambiante, l'absorbance finale (AF) est lue à 540 nm.

Le calcul de la concentration se fait via la formule (Flamment, 2009) :

$$[\text{TG}] = [\text{standard}] \times \frac{\text{AF}_{\text{échantillon}} - (\text{AI}_{\text{échantillon}} \times F)}{\text{AF}_{\text{standard}} - (\text{AI}_{\text{blanc}} \times F)} \times f_{\text{dilution}} \times \frac{V_{\text{homogénat}}}{q_{\text{tissu}}}$$

[standard] : concentration du standard = 0,26 mg/mL

AI : absorbance initiale correspondant au glycérol présent avant hydrolyse des triglycérides

AF : absorbance finale correspondant au glycérol présent après hydrolyse des triglycérides

F : facteur permettant de rapporter l'AI mesurée dans 0,8 mL à l'AF mesurée dans 1 mL.

F = 0,81/1,01 = 0,8

f_{dilution} : facteur de dilution de l'échantillon dans le milieu réactionnel. f_{dilution} = 100

V_{homogénat} : volume de l'homogénat = 1 mL

q_{tissu} : quantité de tissu (hépatique ou musculaire) en g

2.3. Mesure de l'insulino-résistance

2.3.1 Protocole général

La mesure de l'insulino-résistance avec le 6DIG est réalisée 3 fois pendant l'expérience. La première mesure a lieu avant le début du régime, la seconde après 60 jours de régime et la dernière après 90 jours de régime (Figure 37). La période entre les acquisitions est suffisamment importante pour éliminer l'activité résiduelle due au 6DIG injecté lors des mesures précédentes. Entre les différentes acquisitions, les animaux sont reconduits à l'animalerie dans une armoire ventilée plombée.

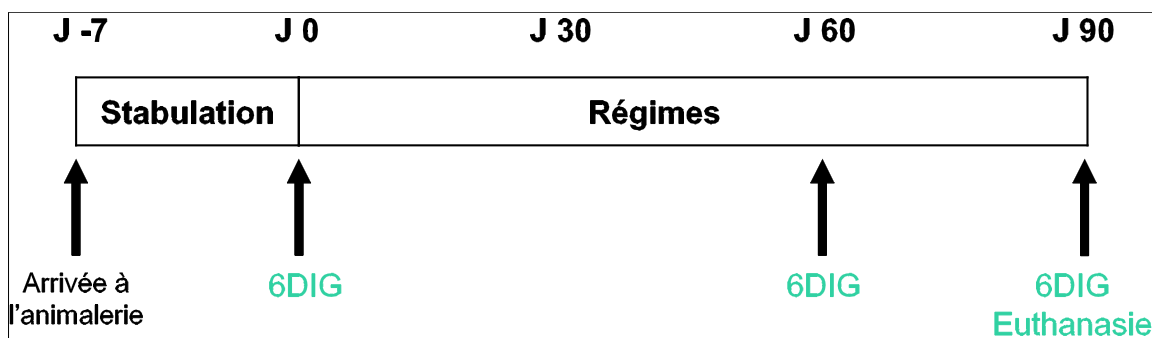


Figure 37. Protocole général de l'étude de l'insulino-résistance.

Trois mesures de l'insulino-résistance sont réalisées avec le 6DIG. En fin de protocole, les animaux sont euthanasiés afin de procéder à des prélèvements tissulaires.

2.3.2 Préparation des animaux

Les rats sont mis à jeun environ 10h avant le début de l'expérience. Le jour de la mesure, un cathéter à ailettes 22G (BD Insyte-N) est placé dans une veine latérale de la queue du rat vigile, afin de permettre les injections de 6DIG et d'insuline. Un prélèvement sanguin est immédiatement réalisé pour la mesure de l'insulinémie et de la glycémie de l'animal. Le rat est ensuite anesthésié par une injection intra-péritonéale de Pentobarbital Sodique ($54,7 \text{ mg.mL}^{-1}$) à raison de $100 \mu\text{L}/100 \text{ g}$ soit $54,7 \text{ mg.kg}^{-1}$. La chambre du cathéter est alors coupée et le conduit du cathéter est raccordé à un cathéter en polyuréthane (référence 800/100/200, Portex, Kent, UK) d'une vingtaine de centimètres de long, préalablement rempli de sérum physiologique hépariné (Heparine Choay, Sanofi Aventis, 5 %, soit 25000 UI dans 100 mL). Ce dispositif permet de faciliter les manipulations lors de l'expérience (Figure 38).



Figure 38. Pose du cathéter dans la veine caudale.

Montage est réalisé pour permettre les injections en voie intraveineuse.

L'extrémité de la queue de l'animal est légèrement coupée à l'aide d'un scalpel afin de pouvoir réaliser les prélèvements sanguins nécessaires à la mesure de la glycémie durant l'expérience. En fin de protocole, le cathéter est retiré de la queue de l'animal et un pansement est appliqué sur la plaie afin de permettre une cicatrisation rapide de la queue. Un nouveau cathéter est mis en place à chaque nouvelle mesure de l'insulino-résistance.

2.3.3 Protocole d'acquisition de la radioactivité

L'animal est installé sous la γ -caméra afin d'imager le myocarde, la cage thoracique étant placée au plus près du collimateur. Une sonde NaI est placée au-dessus du quadriceps de la patte postérieure droite de l'animal (Figure 39).



Figure 39. Acquisition de la radioactivité cardiaque et musculaire

Le rat est positionné de telle façon que sa cage thoracique se situe sous la γ -caméra et sa patte postérieure droite sous la sonde NaI, afin de mesurer simultanément le transport du glucose dans le cœur et dans le muscle squelettique.

Les injections de traceur sont effectuées sur une période d'une minute à l'aide d'un pousse-seringues (Harvard Pump 11 Plus, Harvard Apparatus) : une première injection de 6DIG d'environ 9,25 MBq est réalisée. La deuxième injection de 6DIG (9,25 MBq également) est réalisée 5 minutes après l'injection d'un bolus d'insuline de 2,5 UI.kg⁻¹ (Actrapid, 100 UI.ml⁻¹ Novo Nordisk, France). Chaque injection est suivie d'une période d'acquisition de la radioactivité cardiaque et musculaire de 20 minutes (Figure 40). Deux mesures de glycémie sur sang total sont réalisées avant et après l'injection d'insuline avec un analyseur de glycémie (ACCU-CHEK performa, Roche, France).

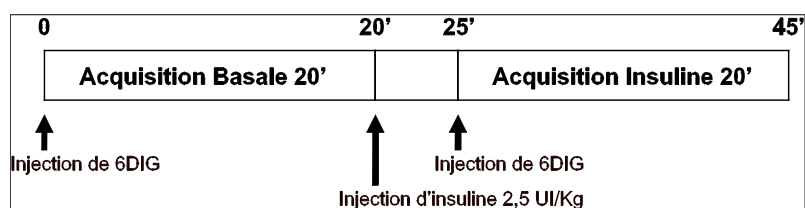


Figure 40. Protocole de mesure de l'insulino-résistance avec le 6DIG

Ce protocole d'acquisition est réalisé à chaque mesure de l'insulino-résistance (J0, J60, J90). A l'issue de la dernière mesure (J90), le rat est sacrifié par une injection létale de 1 mL de Pentobarbital Sodique par voie intraveineuse. Le cœur, les tissus adipeux épидидymal, sous-cutané, rétro-péritonéal, périrénal, abdominal et brun sont prélevés et pesés.

2.3.4 Analyse des résultats

2.3.4.1 Analyse des cinétiques cardiaques du 6DIG

L'acquisition de la radioactivité avec la gamma-caméra permet l'obtention d'une image scintigraphique. Les données sont traitées par analyse factorielle grâce au logiciel Pixies. Une analyse factorielle à 3 compartiments permet de mieux délimiter le cœur et de tracer une région d'intérêt sur celui-ci. La Figure 41 donne un exemple de cinétique du 6DIG dans le myocarde. La cinétique cardiaque du traceur peut-être ajustée par une fonction « double exponentielle ».

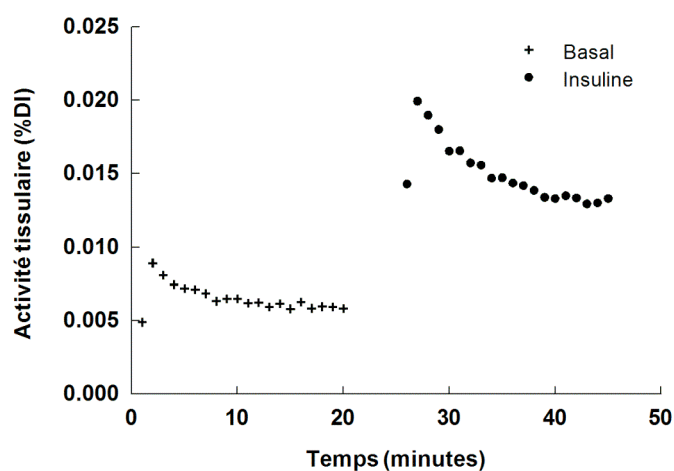


Figure 41. Exemple de cinétiques cardiaques obtenues avec le 6DIG.

Les données extraites de la région d'intérêt sont exprimées en coups par minutes et rapportées à la dose injectée. Les données obtenues lors de l'acquisition de la radioactivité sous insuline doivent être corrigées de la radioactivité résiduelle due à l'injection réalisée pour l'acquisition basale. La courbe obtenue en condition basale est donc extrapolée entre 26 et 45 minutes à l'aide du module « numerical » du logiciel SAAMII. Les données ainsi extrapolées sont soustraites aux données obtenues sous insuline.

Un descripteur empirique cardiaque permettant d'estimer l'insulino-résistance dans le myocarde d'un animal a été développé et testé sur des rats sains Wistar et obèses Zucker *fatty* (Thèse de J.Vollaire, 2010). Le descripteur empirique cardiaque est calculé selon la formule :

$$DE = \frac{[A0 - A1]^{insuline}}{[A0 - A1]^{basal}}$$

Où A0 représente l'ordonnée à l'origine de la fonction mono-exponentielle d'équation $y_a(t) = A0 \cdot \exp(-a1 \cdot t)$, calculée entre le pic d'activité tissulaire et $t = 10$ minutes, et A1 représente l'ordonnée à l'origine de la fonction linéaire d'équation $y_a(t) = a1 \cdot t + A1$, calculée entre 10 et 15 minutes (Figure 42). Les valeurs de A0 et de A1 sont calculées en conditions basale et sous insuline. Les paramètres A0 et A1 sont calculés grâce au module « numerical » du logiciel SAAMII.

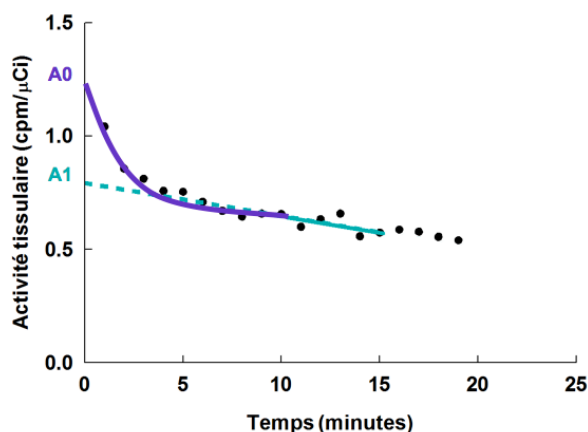


Figure 42. Calcul du descripteur empirique à partir de la cinétique cardiaque par analyse graphique.

2.3.4.2 Analyse des cinétiques musculaires du 6DIG

De la même façon que pour le cœur, un descripteur empirique basé sur l'analyse graphique des courbes de la cinétique musculaire du 6DIG a été développé. L'acquisition de la radioactivité musculaire avec la sonde NaI permet d'obtenir des valeurs numériques exprimées en coups par 10 secondes, sur une zone d'intérêt délimitée par une plaque de plomb. Afin de pouvoir calculer le descripteur empirique, les données sont normalisées en coups par minute par millilitre ($\text{cpm} \cdot \text{mL}^{-1}$) grâce à une gamme étalon effectuée au préalable avec des activités connues diluées dans 1 mL.

La formule suivante permet le calcul du descripteur empirique musculaire :

$$DE = \frac{[a1]^{insuline} \times [a2]^{insuline}}{[p]^{basal}}$$

Où a1 représente la pente de la droite d'équation $y_a(t) = a1 \cdot t + A1$, calculée entre 1 et 5 minutes sur la courbe d'acquisition sous insuline, a2 représente la pente de la droite d'équation $y_a(t) = a2 \cdot t + A2$, calculée entre 5 et 10 minutes, également lors de l'acquisition sous insuline, et p représente la valeur du plateau moyen calculé entre 15 et 20 minutes sur la courbe lors de l'acquisition basale (Figure 43). Les pentes a1 et a2 sont calculées avec le logiciel Excel.

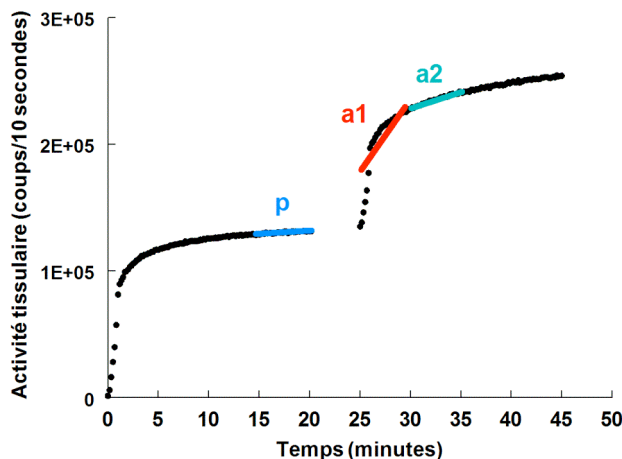


Figure 43. Calcul du descripteur empirique à partir de la cinétique musculaire.

2.4. Expression des résultats et analyses statistiques.

Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type. Une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs a été utilisée pour mettre en évidence l'interaction entre l'effet du temps et celui du régime. Une ANOVA simple a été utilisée pour comparer les 3 groupes entre eux à différents temps. Enfin, un test *post hoc* Fischer PLSD nous a permis de déterminer les interactions entre les groupes. La comparaison des groupes à différents temps a été effectuée par des tests *t* de Student (valeurs non appariées) lorsque deux groupes seulement étaient comparés. La limite de significativité est fixée à 5 % ($p < 0,05$). Toutes les analyses ont été réalisées grâce au logiciel StatView (StatView, ASA institute inc. Version 5.0.1, Cary Caroline du nord USA).

II. RESULTATS

1. Effets du régime sur la croissance, la prise alimentaire et la masse adipeuse des animaux.

L'évolution de la masse corporelle des animaux est présentée ci-dessous (Figure 44). Au début du régime, les animaux pèsent en moyenne 307 ± 2 g et les différents groupes ne présentent aucune différence significative de masse corporelle. Dès la troisième semaine de régime, les animaux du groupe Cafétéria présentent une masse corporelle significativement plus importante que les animaux du groupe Contrôle ($p < 0,05$). Cette différence n'est plus observable entre les semaines 6 et 7 suivant le début du régime, mais elle redevient significative de la 8^{ème} semaine à la fin du régime. La différence entre les deux groupes augmente avec le temps : ainsi, les rats du groupe Cafétéria ont une masse corporelle 5% plus élevée que les animaux du groupe Contrôle après 5 semaines de régime et 10% plus élevée après 14 semaines de régime. Les rats du groupe Lard présentent également une masse corporelle plus importante que les rats du groupe Contrôle. Cette différence de masse corporelle est significative dès la 3^{ème} semaine de régime ($p < 0,05$), puis entre la septième et la neuvième semaine ($p < 0,05$) et enfin de la onzième semaine jusqu'à la fin du régime ($p < 0,05$). Au terme des 14 semaines de régime, les animaux nourris avec des régimes hypercaloriques présentent une masse corporelle significativement supérieure aux animaux nourris avec un régime Contrôle. En effet, les rats du groupe Cafétéria et Lard pèsent respectivement 537 ± 30 g et 516 ± 39 g en fin de régime contre 484 ± 27 g pour les rats contrôles.

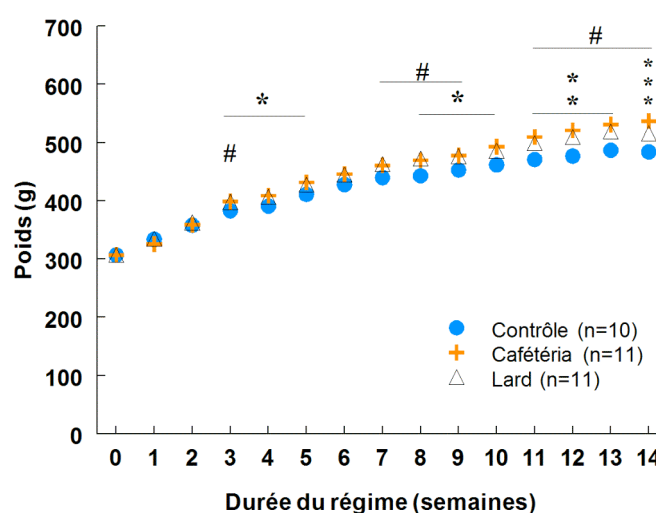


Figure 44. Evolution de la prise de poids des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard.

Moyennes exprimées en grammes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$: Cafétéria vs. Contrôle, # $p < 0,05$: Lard vs. Contrôle. Les écart-types n'ont pas été présentés dans un souci de lisibilité. Certains sont reportés dans le texte.

La consommation calorique des animaux nourris avec des régimes hypercaloriques est plus importante que celle des animaux nourris avec le régime Contrôle (Figure 45). La consommation calorique moyenne durant les 14 semaines de régime des animaux des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard est respectivement de $65 \pm 3 \text{ kcal.jour}^{-1}$, $93 \pm 13 \text{ kcal.jour}^{-1}$ et $100 \pm 25 \text{ kcal.jour}^{-1}$, ce qui représente environ 43 % et 54 % d'énergie supplémentaire ingérée chaque jour pour les groupes Cafétéria et Lard par rapport aux animaux du groupe Contrôle.

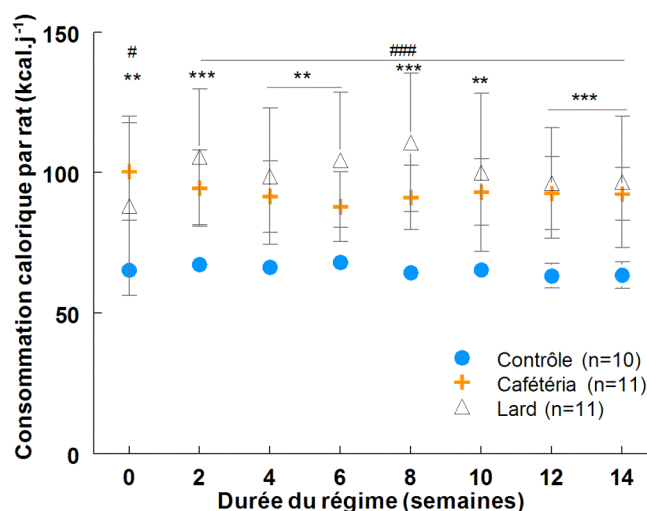


Figure 45. Evolution de la consommation calorique des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard.

Moyennes exprimées en $\text{kcal.j}^{-1} \pm \text{ET}$. ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$: Cafétéria vs. Contrôle, # $p < 0,05$ et ### $p < 0,001$: Lard vs. Contrôle.

Après 14 semaines de régime, le pourcentage des différents tissus adipeux blancs prélevés est significativement plus élevé chez les animaux des groupes Cafétéria et Lard par rapport à ceux du groupe Contrôle (Figure 46). La quantité de tissu adipeux épидидymal est augmentée de 86 % chez les animaux nourris avec le régime Cafétéria et de 92 % chez ceux nourris avec le régime Lard par rapport aux animaux du groupe Contrôle. Les autres tissus adipeux présentent un pourcentage d'augmentation moins important que le tissu adipeux épидидymal, mais ils restent élevés chez les animaux nourris avec des régimes hypercaloriques par rapport aux animaux nourris avec le régime Contrôle. Le rapport du poids du cœur sur le poids de l'animal est significativement plus faible dans le groupe Cafétéria comparé au groupe Contrôle ($0,23 \pm 0,01 \%$ vs. $0,25 \pm 0,01 \%$). Cette différence n'est pas observée entre les groupes Contrôle et Lard ($0,25 \pm 0,01 \%$ vs. $0,24 \pm 0,01 \%$). Enfin, le pourcentage de tissu adipeux brun n'est pas significativement différent entre les trois groupes.

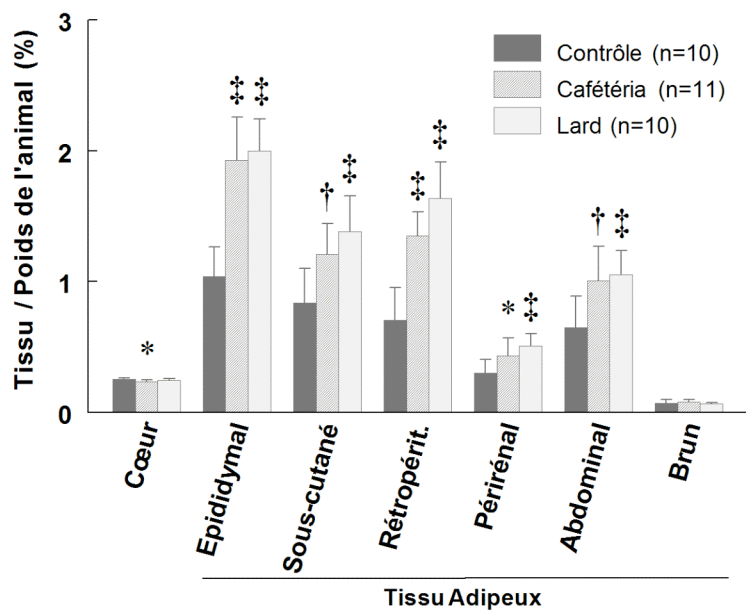


Figure 46. Tissu adipeux en fin de régime.

Pourcentage de tissu (cœur et tissus adipeux) rapporté au poids de l'animal des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard en fin de régime. Rétropérit. : rétropéritonéal. Moyennes \pm ET. * $p < 0,05$, † $p < 0,01$ et ‡ $p < 0,001$: vs. Contrôle.

2. Effets du régime sur différents paramètres d'intérêt.

2.1. Glycémie et insuliniémie plasmatiques

La Figure 47 représente les valeurs de la glycémie (A) et de l'insuliniémie (B) des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard avant le début du régime, ainsi qu'après 1, 2 et 3 mois de régime.

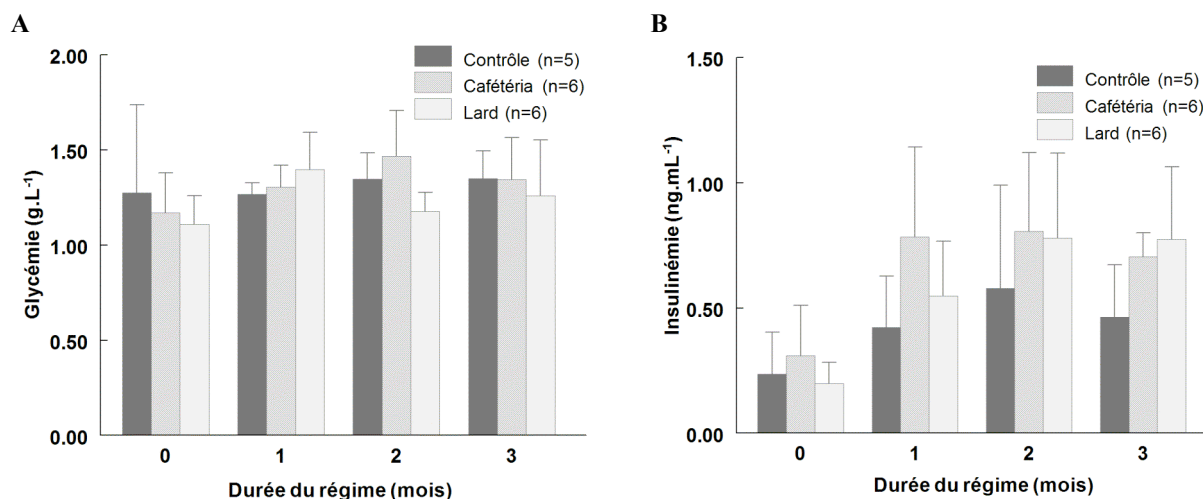


Figure 47. Evolution de la glycémie et de l'insuliniémie plasmatiques.

Glycémie (A) et insuliniémie (B) plasmatiques des animaux nourris avec un régime Contrôle, Cafétéria ou Lard, au début du régime et après 1, 2 et 3 mois de régime. Moyennes exprimées en $g.L^{-1} \pm ET$ et en $ng.mL^{-1} \pm ET$.

La glycémie à jeun des animaux des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard ne varie pas entre le début et la fin du régime. Elle est en moyenne de $1,31 \pm 0,20 \text{ g.L}^{-1}$, $1,32 \pm 0,20 \text{ g.L}^{-1}$ et $1,23 \pm 0,18 \text{ g.L}^{-1}$ respectivement et n'est pas significativement différente entre les groupes d'animaux. A jeun, l'insulinémie moyenne des rats des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard est respectivement de $0,24 \pm 0,17 \text{ ng.mL}^{-1}$, $0,31 \pm 0,20 \text{ ng.mL}^{-1}$ et $0,20 \pm 0,08 \text{ ng.mL}^{-1}$ en début de régime. Après 3 mois de régime, l'insulinémie est en moyenne de $0,46 \pm 0,21 \text{ ng.mL}^{-1}$, $0,70 \pm 0,10 \text{ ng.mL}^{-1}$ et $0,77 \pm 0,29 \text{ ng.mL}^{-1}$, ce qui correspond à un pourcentage d'augmentation respectivement de 92 %, 126 % et 285 %. La tendance à l'augmentation de l'insulinémie observée entre les groupes Cafétéria et Lard vs. Contrôle n'est cependant pas significative.

2.2. Cholestérol et triglycérides plasmatiques

Les concentrations plasmatiques en cholestérol total (HDL + LDL) et en triglycérides sont présentées Figure 48. En moyenne, la concentration en cholestérol en début de régime est de $0,97 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}$. Après 1 et 2 mois de régime, elle est significativement plus élevée chez les animaux du groupe Lard ($p < 0,05$) par rapport aux animaux du groupe Contrôle : $1,09 \pm 0,13 \text{ g.L}^{-1}$ vs. $0,95 \pm 0,06 \text{ g.L}^{-1}$. Elle est identique entre les animaux Cafétéria ($0,96 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}$) et ceux du groupe Contrôle. Au terme de 3 mois de régime, les concentrations en cholestérol pour les groupes Contrôle, Cafétéria et Lard sont respectivement de $0,97 \pm 0,08 \text{ g.L}^{-1}$, $1,03 \pm 0,08 \text{ g.L}^{-1}$ et $1,07 \pm 0,17 \text{ g.L}^{-1}$. La différence entre les groupes n'est pas significative.

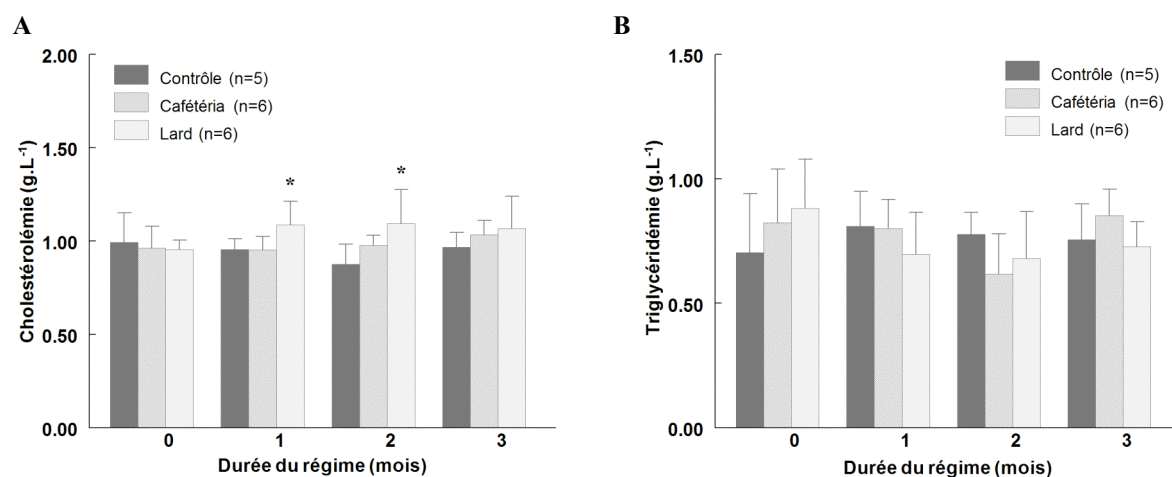


Figure 48. Evolution de la cholestérolémie et de la triglycéridémie plasmatiques.

Concentration en cholestérol et en triglycéride chez les animaux nourris avec un régime Contrôle, Cafétéria ou Lard, au début du régime et après 1, 2 et 3 mois de régime. Moyennes exprimées en $\text{g.L}^{-1} \pm \text{ET}$. * $p < 0,05$: vs. Contrôle.

La concentration en triglycérides plasmatiques ne varie pas de façon significative au cours du régime, quel que soit le groupe d'animaux considéré. En début de régime, elle est en moyenne de $0,70 \pm 0,23 \text{ g.L}^{-1}$, $0,82 \pm 0,21 \text{ g.L}^{-1}$ et $0,88 \pm 0,20 \text{ g.L}^{-1}$, pour les animaux des

groupes Contrôle, Cafétéria et Lard respectivement et en fin de régime, elle est en moyenne de $0,76 \pm 0,14 \text{ g.L}^{-1}$, $0,85 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}$ et $0,73 \pm 0,10 \text{ g.L}^{-1}$.

2.3. Adiponectine et leptine

Les concentrations en adiponectine et en leptine ont été mesurées en début de régime et après 1, 2 et 3 mois de régime. Les résultats sont présentés Figure 49 (A). Au début du régime, les concentrations plasmatiques en adiponectine sont de $5 \pm 1,32 \text{ mg.mL}^{-1}$, $4,21 \pm 0,57 \text{ mg.mL}^{-1}$ et $4,15 \pm 1,42 \text{ mg.mL}^{-1}$ pour les groupes Contrôle, Cafétéria et Lard respectivement. En fin de régime, elles sont de $3,69 \pm 1,11 \text{ mg.mL}^{-1}$ pour les animaux du groupe Contrôle, $4,58 \pm 1,32 \text{ mg.mL}^{-1}$ pour les animaux du groupe Cafétéria et $3,88 \pm 0,58 \text{ mg.mL}^{-1}$ pour les animaux du groupe Lard. Pendant toute la durée du régime, aucune différence significative entre les groupes n'est observée.

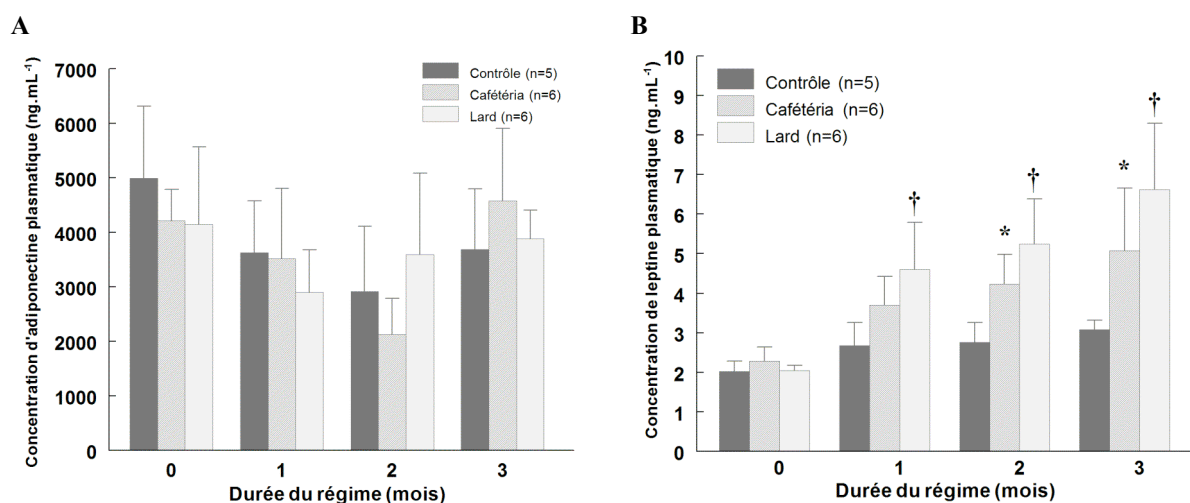


Figure 49. Concentrations plasmatiques en adiponectine et en leptine.

Concentration en adiponectine (ng.mL^{-1}) et en leptine (ng.mL^{-1}), chez les animaux nourris avec un régime Contrôle, Cafétéria ou HF-Lard, en début de régime et après 1, 2 et 3 mois (fin du régime). Moyennes \pm ET. * $p < 0,05$, † $p < 0,01$: vs. Contrôle.

La concentration en leptine dans le plasma est présentée Figure 49 (B). En début de régime, elle est en moyenne de $2,12 \pm 0,25 \text{ ng.mL}^{-1}$ pour les trois groupes. Cette concentration reste identique chez les rats du groupe Contrôle tout au long de l'expérience. En revanche, dès le premier mois de régime, la concentration en leptine augmente significativement dans le groupe Lard par rapport au groupe Contrôle ($4,6 \pm 1,19 \text{ ng.mL}^{-1}$ vs. $2,68 \pm 0,58 \text{ ng.mL}^{-1}$, $p < 0,05$). Au terme de 2 et 3 mois de régime, les animaux des groupes Cafétéria et Lard présentent une leptinémie supérieure à celle des animaux du groupe Contrôle : ainsi, la concentration en leptine est de $4,23 \pm 0,75 \text{ ng.mL}^{-1}$ ($p < 0,05$, vs. Contrôle) et $5,25 \pm 1,14 \text{ ng.mL}^{-1}$ ($p < 0,01$, vs. Contrôle) pour les groupes Cafétéria et Lard respectivement, contre $2,75 \pm 0,5 \text{ ng.mL}^{-1}$ pour le groupe Contrôle. Après 3 mois de régime, la leptinémie reste significativement plus élevée chez les rats des groupes Cafétéria et Lard

par rapport à celle du groupe Contrôle, puisqu'elle atteint respectivement $5,08 \pm 1,58 \text{ ng.mL}^{-1}$ ($p < 0,05$, vs. Contrôle) et $6,63 \pm 1,68 \text{ ng.mL}^{-1}$ ($p < 0,01$, vs. Contrôle).

En fin de régime, les concentrations plasmatiques en leptine corrélaient avec le pourcentage de tissus adipeux épидидymal ($r = 0,609$; $p = 0,01$), sous-cutané ($r = 0,508$; $p < 0,05$) et rétro-péritonéal ($r = 0,648$; $p < 0,01$).

2.4. Triglycérides ectopiques

Le dosage des triglycérides dans le foie et le muscle squelettique en fin de protocole ne permet pas de mettre en évidence de différences significatives de quantité de triglycérides ectopiques dans ces organes entre les différents groupes d'animaux (Figure 50).

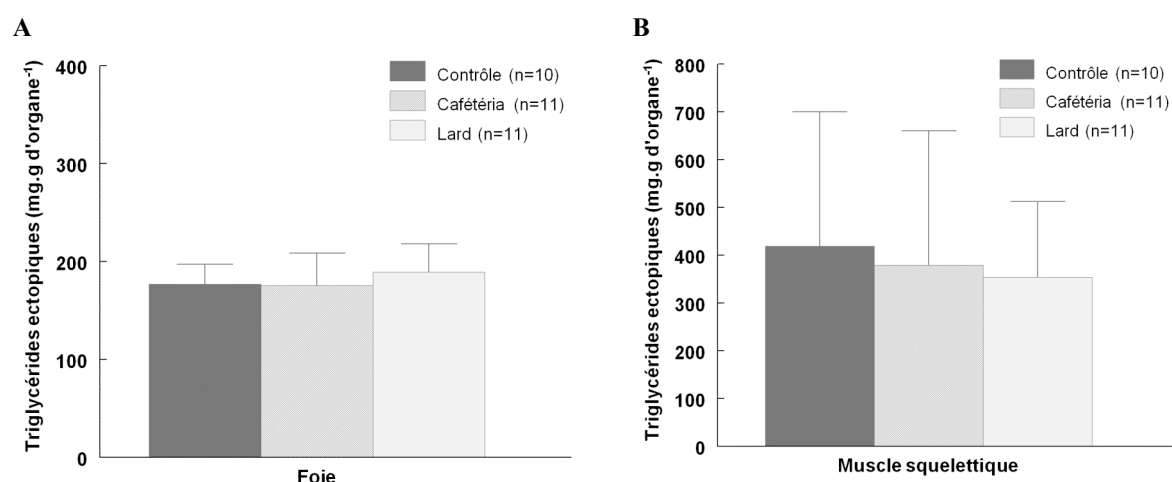


Figure 50. Concentrations en triglycérides hépatique et musculaire

Concentration en triglycérides ($\text{mg.g d'organe}^{-1}$) dans le foie (A) et dans le muscle squelettique (B) chez les animaux nourris avec un régime Contrôle, Cafétéria ou HF-Lard, après 3 mois de régimes. Moyennes \pm ET.

2.5. Evaluation de l'insulino-résistance globale par calcul de l'index HOMA

Les moyennes des index HOMA obtenus pour les rats des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard en début de régime et après 2 et 3 mois, sont présentées Figure 51.

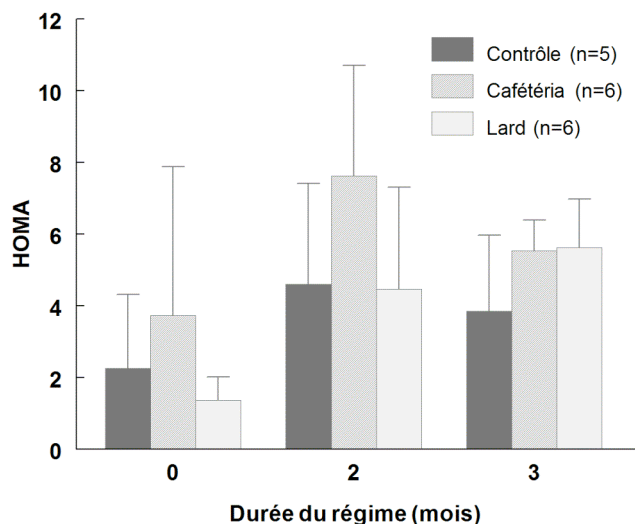


Figure 51. Insulino-sensibilité globale des animaux estimée par HOMA.

Index HOMA des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard, en début de régime et après 2 et 3 mois (fin du régime). Moyennes \pm ET.

La moyenne des index HOMA pour les rats du groupe Contrôle varie de $2,26 \pm 2,07$ en début de régime à $3,85 \pm 2,12$ en fin de régime ; pour le groupe Cafétéria, cette même moyenne varie de $3,73 \pm 4,15$ à $5,53 \pm 0,86$. Enfin, la moyenne des index HOMA des animaux nourris avec un régime HF-Lard passe de $1,37 \pm 0,64$ à $5,63 \pm 1,35$ entre le début et la fin du régime. Aucune différence significative de l'index HOMA n'est observée entre les trois groupes, et ce à tous les temps du régime.

3. Effets des régimes Cafétéria et Lard sur la sensibilité à l'insuline du muscle cardiaque et du muscle squelettique.

3.1. Mesure de l'insulino-résistance cardiaque avec le 6DIG

Les résultats obtenus lors de la mesure de l'insulino-résistance cardiaque avec le 6DIG à différents temps du régime sont présentés Figure 52. Les descripteurs empiriques cardiaques des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard en début de régime sont respectivement de $1,32 \pm 0,33$, $1,60 \pm 0,91$ et $1,70 \pm 0,81$. Au bout de 2 mois de régime, les valeurs du descripteur empirique sont de $1,77 \pm 1,20$, $1,58 \pm 0,29$ et $0,98 \pm 0,66$ pour les groupes Contrôle, Cafétéria et Lard respectivement. En fin de régime, ces valeurs sont respectivement de $1,02 \pm 0,38$, $1,47 \pm 0,91$ et $0,87 \pm 0,26$. Ces valeurs ne présentent aucune différence significative entre elles.

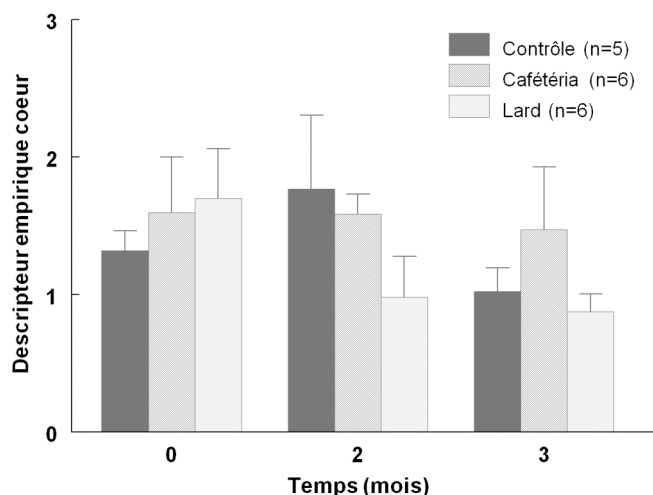


Figure 52. Descripteur empirique cardiaque des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard.

L'insulino-résistance cardiaque est mesurée en début de régime, après 2 mois et 3 mois de régime. Moyennes \pm ET.

3.2. Mesure de l'insulino-résistance musculaire avec le 6DIG

La mesure de l'insulino-résistance musculaire avec le 6DIG, réalisée en début de régime et après 2 et 3 mois de régimes est présentée Figure 53. Le descripteur empirique musculaire des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard en début de régime est respectivement de $7,03 \pm 1,26$, $8,03 \pm 1,16$ et $6,84 \pm 1,08$. Au bout de deux mois de régime, les valeurs du descripteur empirique muscle sont de $5,62 \pm 0,81$ pour le groupe Contrôle, $6,91 \pm 0,54$ pour le groupe Cafétéria et $7,37 \pm 1,09$ pour le groupe Lard. En fin de régime, ces valeurs sont respectivement de $5,52 \pm 0,35$, $5,12 \pm 0,86$ et $7,33 \pm 0,65$. Aucune différence significative n'est observée entre les trois groupes Contrôle, Cafétéria et Lard tout au long du régime.

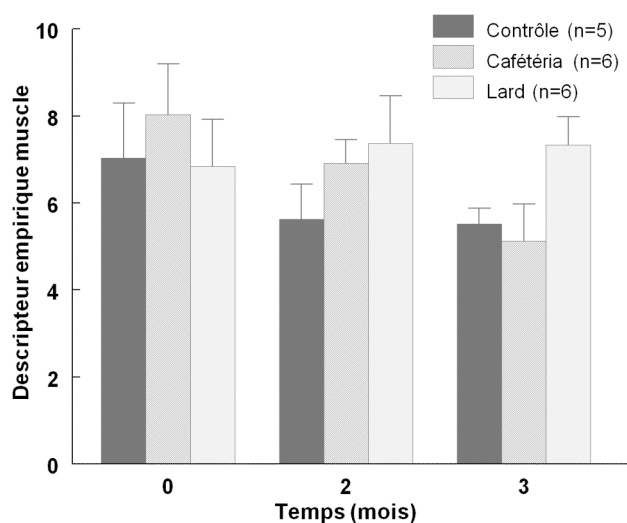


Figure 53. Descripteur empirique musculaire des groupes Contrôle, Cafétéria et Lard.

L'insulino-résistance musculaire est mesurée en début de régime, après 2 mois et 3 mois de régime. Moyennes \pm ET.

III. DISCUSSION

L'objectif de ce travail était d'étudier le développement de l'insulino-résistance sur un modèle de rats rendus obèses par modification du régime alimentaire, en réalisant un suivi longitudinal de la sensibilité à l'insuline à l'aide d'un traceur du transport du glucose, le 6DIG. Plusieurs régimes enrichis en graisses ou en sucres ont été utilisés pour nourrir pendant 3 mois de jeunes rats Sprague-Dawley de 8 semaines. Des dosages plasmatiques ont également été réalisés, afin de suivre l'évolution de différents paramètres d'intérêts : glycémie, insulinémie, triglycéridémie, cholestérolémie, leptinémie et adiponectinémie. Les dosages plasmatiques nécessitant le prélèvement d'une quantité importante de sang, il nous était impossible de réaliser les prélèvements sanguins et la mesure de l'insulino-résistance sur les mêmes animaux. Deux lots d'animaux ont donc été étudiés en parallèle, un lot « dosages » et un lot « 6DIG ». Dans chaque lot, trois groupes de rats ont été nourris avec différents régimes : Contrôle, Cafétéria et Lard. Les paramètres des expérimentations (âge des rats en début de protocole, nature des régimes hypercaloriques) ont été déterminés grâce au travail exposé dans la première partie « mise au point du modèle expérimental ».

La prise de poids est régulière tout au long du régime. Les poids des animaux du lot « 6DIG » et celui des animaux du lot « dosages » ne sont pas significativement différents. L'anesthésie nécessaire à la mesure de l'insulino-résistance avec le 6DIG ne perturbe pas la prise alimentaire et la prise hydrique des animaux. Les régimes hypercaloriques utilisés induisent une différence de masse corporelle dès la 3^{ème} semaine de régime entre les rats nourris avec un régime Cafétéria ou Lard comparés aux animaux du groupe Contrôle. Lors des études de mise en place du modèle expérimental, la différence entre les animaux Contrôle et Cafétéria apparaissait au bout 9 semaines de régime. Cette différence entre les deux études peut s'expliquer par le nombre plus faible d'animaux utilisés dans l'étude de validation du modèle expérimental. Après 3 mois de régime, les tissus adipeux épидidymal, sous-cutané, rétropéritonéal, périrénal et abdominal sont plus développés chez les animaux nourris avec un régime Cafétéria ou Lard par rapport aux animaux nourris avec un régime standard. La prise de poids générale observée est donc associée à une augmentation de la masse adipeuse. L'énergie ingérée par les animaux des groupes Cafétéria et Lard est significativement plus importante que chez les animaux du groupe Contrôle, ce qui peut expliquer la survenue d'une obésité rapide.

Chaque mois, plusieurs paramètres sanguins ont été mesurés sur les animaux à jeun. La glycémie, l'insulinémie ainsi que la concentration plasmatique en triglycérides restent statistiquement identiques quel que soit le régime alimentaire des animaux. L'insulinémie tend à augmenter chez les animaux Cafétéria et Lard par rapport au groupe Contrôle, mais aucune différence statistique n'est mesurable. Les grandes variabilités observées au sein des groupes pourraient expliquer ces résultats. Une augmentation de la cholestérolémie est

observée chez les animaux du groupe Lard (par rapport au groupe Contrôle), après 1 et 2 mois de régime. Cette différence n'est cependant plus statistiquement présente après 3 mois de régime.

Les adipokines sont des molécules sécrétées par le tissu adipeux. L'hyperplasie ou l'hypertrophie du tissu adipeux en cas d'obésité conduit à la dérégulation de sa fonction endocrine (De Ferranti, 2008 ; Skurk, 2007). L'adiponectine et la leptine sont deux molécules ayant un rôle particulièrement important dans le développement de l'insulino-résistance. Chez les individus insulino-résistants ou obèses, la concentration plasmatique en adiponectine est diminuée (Kadowaki, 2003) alors que dans la grande majorité des cas, la concentration en leptine est augmentée. L'adiponectine favorise l'insulino-sensibilité et joue un rôle anti-inflammatoire. La leptine agit sur la régulation de la balance énergétique via des récepteurs spécifiques, les récepteurs à la leptine et module la prise alimentaire. Durant notre étude, les concentrations de ces deux adipokines ont été évaluées en début de régime puis chaque mois jusqu'à la fin de l'expérience. Les concentrations en adiponectine sont identiques pour les trois groupes, Contrôle, Lard et Cafétéria. En revanche, les concentrations en leptine plasmatique augmentent chez les animaux nourris avec des régimes Cafétéria ou Lard alors qu'elles restent stables pour les animaux du groupe Contrôle. En outre, les concentrations en leptine au terme des 4 mois de régimes sont assez bien corrélées au pourcentage de tissus adipeux épидидymal, rétropéritonéal et sous-cutané.

Le défaut d'action de l'insuline, lors de l'insulino-résistance, conduit à une altération de l'inhibition de la lipolyse sous insuline. Les sujets obèses ont également une lipolyse accrue. Cela peut se traduire par une augmentation de l'abondance des acides gras dans la circulation sanguine, mais aussi par une accumulation de triglycérides ectopiques dans le foie et le muscle squelettique. Les analyses réalisées sur ces deux organes n'ont cependant pas permis de mettre en évidence une telle accumulation.

Les méthodes de mesure de l'insulino-résistance sont nombreuses. La technique de référence, le clamp euglycémique hyperinsulinémique permet d'obtenir des informations sur l'insulino-résistance systémique d'un animal mais cette technique met en jeu un protocole lourd pour l'animal. De plus, l'utilisation du [¹⁴C]-2-DG pour obtenir des informations spécifiques sur le cœur et le muscle nécessite le prélèvement de ces organes. D'autres méthodes, basées sur l'insulinémie ou la glycémie existent, mais elles sont peu sensibles (Pacini, 2003). Une méthode de mesure de l'insulino-résistance par organe a été développée au laboratoire « Radiopharmaceutiques Biocliniques ». Elle repose sur l'utilisation d'un traceur du transport du glucose, le 6DIG, utilisable en imagerie nucléaire. Cette technique non invasive permet donc d'envisager des mesures répétées de l'insulino-résistance par organe sur un même animal.

Le but de notre étude était de déterminer si une insulino-résistance apparaissait au cours de l'induction de l'obésité par régime alimentaire de 3 mois chez le rat Sprague-Dawley. Aucune différence de sensibilité à l'insuline dans les muscles cardiaque et squelettique n'a été observée avec le 6DIG entre les groupes Contrôle, Cafétéria et Lard. Comme attendu compte tenu de sa faible sensibilité, le calcul de l'index HOMA n'a pas non plus permis de mettre évidence une altération de la sensibilité à l'insuline systémique. L'action de l'insuline semble donc être normale après 3 mois de régime Cafétéria ou Lard, malgré une importante prise de poids. Nos résultats suggèrent ainsi que la durée du régime n'était pas assez longue pour induire l'insulino-résistance cardiaque ou musculaire et que l'apparition de l'insulino-résistance serait ultérieure à celle de l'obésité. Cependant, la variabilité dans la réponse à un régime hypercalorique est importante : d'une part, tous les animaux ne présentent pas la même sensibilité aux régimes (ceci s'observe également dans la prise de poids des animaux) et d'autre part, tous les individus obèses ne sont pas forcément insulino-résistants. La comparaison des valeurs individuelles d'insulino-résistance (J0 vs. J60 et J90) n'a pas non plus permis de mettre en évidence une diminution de l'insulino-sensibilité au cours du temps. Enfin, une autre explication de ces résultats pourrait être une sensibilité du descripteur empirique trop faible pour mettre évidence de petites variations d'insulino-sensibilité. L'utilisation du modèle mathématique, plus robuste, pourrait peut-être mettre en évidence des variations d'insulino-sensibilité mais cette méthode requiert des prélèvements sanguins qui rendent son utilisation répétée difficile. Nos résultats sont en contradiction avec certaines publications et en accord avec d'autres. L'insulino-résistance a ainsi été mise en évidence par clamp euglycémique hyperinsulinémique chez des rats après 8 semaines de régime High-Fat Lard 61 %, mais cette étude était réalisée sur des animaux femelles (Park, 2001). Cependant il est très difficile de comparer les résultats d'études différentes. En effet, de nombreux paramètres entrent en jeu tant dans le développement de l'obésité que dans celui de l'insulino-résistance. La souche et le sexe des animaux, leur âge en début de régime, les caractéristiques nutritives du régime, l'environnement pré- et post-natal des animaux, l'environnement au moment des expérimentations sont autant de facteurs pouvant expliquer les différences entre les études. Par ailleurs, les techniques d'évaluation de l'insulino-résistance sont plus ou moins sensibles et plus ou moins fiables et ne sont en aucun cas « normalisées » d'une étude à l'autre.

Les études métaboliques sont complexes et il est indispensable pour leur interprétation de tenir compte de la grande variabilité métabolique des individus. De la même façon que des rats de même poids peuvent grossir de manières très différentes lorsqu'ils sont soumis à des régimes alimentaires identiques, l'évolution des paramètres métaboliques peut être diverse. Afin de minimiser l'importance des valeurs individuelles, il est nécessaire de réaliser les expériences sur un grand nombre d'individus. Sur un plan logistique, il nous était impossible de mener les expérimentations sur un grand nombre d'animaux simultanément. Afin

d'augmenter le nombre d'individus dans chaque groupe, nous avons mené une deuxième série d'expériences dans les mêmes conditions. Cependant, il s'est révélé impossible de regrouper les animaux en fin d'expérimentation : les tests statistiques réalisés montraient des différences significatives entre la première et la deuxième série d'expérimentation pour la plupart des mesures. Ces différences étaient surtout visibles dans le cas du groupe Contrôle, dont les paramètres métaboliques étaient proches de ceux des groupes nourris avec un régime hypercalorique. Ces variations peuvent s'expliquer par le fait que les conditions expérimentales étaient différentes d'une fois sur l'autre, d'importants travaux de rénovation ayant eu lieu à l'étage au-dessus de l'animalerie. Un problème de même type a déjà été évoqué dans la littérature : des travaux réalisés dans un bâtiment proche d'une animalerie ont provoqué chez les animaux étudiés un stress comparable au stress induit volontairement par injection de dexaméthasone (O'Regan, 2010). Ce stress a entraîné entre autre une insulino-résistance et de l'hypertension chez les animaux contrôles, réduisant ainsi les différences entre les animaux traités et les animaux contrôles. Le protocole expérimental était certes différent dans notre étude, mais les travaux pourraient expliquer le fait que nous n'ayons pas réussi à reproduire nos expériences.

Notre étude suggère que dans nos conditions expérimentales, l'insulino-résistance, si elle doit se développer, se développerait après trois mois de régime hypercalorique. Il serait donc intéressant de maintenir des animaux sous régime hypercalorique au-delà de ces 3 mois et de réaliser d'autres mesures de l'insulino-résistance. Toutefois, notre étude a permis de prouver la faisabilité du protocole expérimental pour mesurer de façon chronique l'insulino-résistance avec le 6DIG, en terme de protocole expérimental. Nous avons réalisé 3 mesures sur chaque animal, mais d'autres mesures auraient été possibles, sous réserve d'avis favorable d'un comité d'éthique : le protocole étant faiblement traumatique, les animaux récupèrent rapidement après les expérimentations.

Les régimes Cafétéria et Lard utilisés pour nourrir nos animaux ont donc permis la mise en place d'une obésité dès la 3^{ème} semaine d'expérimentation. L'apparition de l'obésité est accompagnée d'une augmentation de la leptinémie chez ces animaux qui n'apparaît pas chez les animaux du groupe Contrôle. Cependant, aucune insulino-résistance n'a été mise en évidence dans le cœur ou dans le muscle squelettique durant les 3 mois de régimes.

3^{ème} partie : Optimisation du traitement des données

INTRODUCTION

Parallèlement aux études physiopathologiques présentées dans la première partie de ce document, un travail sur l'optimisation du traitement des données a été effectué afin de répondre à plusieurs difficultés rencontrées lors de leur analyse.

Détermination de la région d'intérêt cardiaque

Le traitement des données acquises en imagerie planaire pour la mesure du transport du glucose dans le myocarde avec le 6DIG nécessite l'extraction de la cinétique du traceur dans l'organe. Celle-ci est obtenue en délimitant de façon manuelle une région d'intérêt (ROI) sur le cœur, en se basant sur les images aux temps courts de l'acquisition, grâce au logiciel γ -vision +, couplé au γ -imager. Le fait de tracer une ROI manuellement suppose que le compartiment d'intérêt soit bien délimité spatialement des autres compartiments physiologiques. Or dans le cas du 6DIG, la cinétique cardiaque décroît très rapidement et le cœur n'apparaît pas de manière évidente à l'image. Le traitement des données par deux observateurs indépendants a montré une faible reproductibilité inter-observateurs de la méthode, liée au positionnement de cette région d'intérêt (Thèse de J.Vollaire, 2010). Nous avons donc dans un premier temps cherché à améliorer le positionnement de la ROI, en utilisant une technique de traitement d'image : l'analyse factorielle.

Optimisation de l'utilisation de la modélisation mathématique

L'analyse des données cardiaques et musculaires obtenues avec le 6DIG peut être réalisée de deux façons. La première méthode de traitement développée est basée sur l'utilisation d'un modèle mathématique, qui tient compte à la fois de la cinétique tissulaire et de la cinétique sanguine du traceur. Cette dernière est obtenue par de nombreux prélèvements sanguins, qui nécessitent la pose invasive d'un cathéter intra-artériel. De plus, l'utilisation du modèle mathématique dans le muscle squelettique exige des acquisitions de la radioactivité de 90 minutes par condition (basale et insuline). Une étude préliminaire visant à tester la faisabilité de la mesure de l'insulino-résistance répétée avec le 6DIG nous a permis de montrer un faible taux de survie des animaux lorsque les prélèvements sanguins sont

effectués. Cette mortalité importante semble être due au caractère invasif de la pose de cathéters et aux durées des anesthésies nécessaires à la mise en œuvre du protocole expérimental. La prise alimentaire des animaux est de plus fortement perturbée après chaque mesure. Cette étude nous a permis de montrer que le protocole contraignant nécessaire à l'utilisation du modèle mathématique ne pouvait pas être réalisé de manière chronique. Ces résultats nous ont donc conduits à utiliser la seconde méthode de traitement des données, basée sur une simple analyse graphique des cinétiques tissulaires du 6DIG (méthode du « descripteur empirique ») pour évaluer l'insulino-résistance des animaux rendus obèses par des régimes hypercaloriques. Cependant, il apparaît que si le descripteur empirique musculaire, calculé pour des animaux sains, corrèle fortement à l'index d'insulino-résistance musculaire, il ne présente pas une sensibilité suffisante pour mesurer de faibles variations d'insulino-résistance.

Nous avons donc cherché à adapter le traitement des données afin de permettre l'utilisation du modèle mathématique sur la base d'acquisitions de la radioactivité dans le muscle squelettique de 20 minutes d'une part et de s'affranchir des prélèvements sanguins d'autre part.

L'objectif de cette troisième partie est donc :

- **Pour la mesure de l'insulino-résistance cardiaque**, d'étudier l'utilisation d'une nouvelle méthode de détermination de la région d'intérêt cardiaque sur les images scintigraphiques obtenues avec le 6DIG
- **Pour la mesure de l'insulino-résistance musculaire**, d'adapter la méthode existante de traitement des données afin de pouvoir réaliser des acquisitions n'excédant pas 20 minutes pour chaque condition
- **Pour l'utilisation des modèles mathématiques**, essayer de s'affranchir des prélèvements sanguins en obtenant la cinétique sanguine du traceur à partir de l'image scintigraphique.

I. DETERMINATION DE LA REGION D'INTERET SUR LE MUSCLE CARDIAQUE – UTILISATION DE L'ANALYSE FACTORIELLE DES SEQUENCES D'IMAGES MEDICALES

1. Introduction

Afin d'améliorer la reproductibilité du placement de la région d'intérêt cardiaque, une approche par analyse factorielle a été utilisée. Le principe de l'analyse factorielle en imagerie scintigraphique a été mis au point au début des années 1980 par deux équipes de recherche en France et en Angleterre (Barber, 1980). L'Analyse Factorielle des Séquences d'Images Medicales (AFSIM) est une méthode permettant l'extraction, à partir d'une séquence d'images, des principales variations de signal contenues dans cette séquence. Elle permet de mettre en évidence des informations a priori non discernables, et de les résumer en un petit nombre d'images et de cinétiques associées, qui décrivent l'évolution du signal au cours du temps dans le compartiment. Elle permet donc de résumer la séquence d'images initiale en quelques images dont chacune d'entre elles va correspondre à un compartiment physiologique. Dans chaque pixel, le signal (et donc la valeur du pixel) va varier de façon caractéristique et donc différente des autres pixels au cours du temps. L'AFSIM fait ressortir tous les pixels qui suivent de manière plus ou moins fidèle une cinétique décrite par un facteur spécifique.

L'AFSIM met en jeu une suite d'équations nombreuses et complexes. Le logiciel Pixies⁵ permet de réaliser des analyses factorielles sur les images scintigraphiques de façon semi-automatique. Les grandes étapes réalisées par le logiciel sont les suivantes.

La première étape est une étape d'agrégation qui consiste à modifier l'échantillonnage spatial des images en rassemblant les pixels voisins. Cette étape permet d'augmenter le rapport signal sur bruit. La taille de la matrice utilisée par le logiciel pour l'agrégation est définie par le logiciel. Plus la matrice sera de taille importante, plus le signal sera important, moins la résolution spatiale sera précise.

La seconde étape est la sélection de trixels (le terme de trixel est employé pour désigner la variation de l'intensité d'un pixel au cours du temps) : elle consiste à sélectionner des données sur lesquelles l'analyse factorielle sera réalisée. Pour cela, on choisit soit un nombre de trixel à conserver, soit un seuil tel que les trixels dont l'intensité est supérieure au seuil déterminé soient conservés, soit un pourcentage de trixels comportant la plus forte intensité de signal à conserver. La notion d'intensité du signal correspond à l'aire sous la courbe temporelle.

⁵ Apteryx 2004 Pixies: image sequence processing software, version 1.11, <http://imagerie.apteryx.fr/pixies>

L'étape d'analyse orthogonale est ensuite réalisée sur les données sélectionnées. Cette étape va principalement servir à séparer le signal utile du bruit. Elle est réalisée par analyse en composante principale (ACP) ou par analyse factorielle des correspondances (AFC), suivant la nature du bruit retrouvé dans la séquence d'images. En imagerie scintigraphique planaire, le bruit suit une loi de Poisson, c'est donc l'AFC qui sera utilisée. L'analyse orthogonale permet d'obtenir une série d'images propres auxquelles sont associés des vecteurs propres et des valeurs propres. Elle permet d'obtenir des informations sur le nombre d'images propres (et donc de composantes physiologiques) suffisantes pour résumer les informations contenues dans la séquence d'images originales. Elle permet l'obtention d'un repère orthogonal dans lequel seront situées les solutions finales.

L'analyse oblique va ensuite permettre d'identifier de nouvelles fonctions qui combinent des vecteurs propres résultant de l'analyse orthogonale et ainsi permettre des interprétations physiologiques. Cette étape nécessite la connaissance d'un certain nombre de paramètres a priori, ainsi que l'opposition d'un certain nombre de contraintes. Par exemple, dans le cas de la médecine nucléaire, le signal est positif ou nul dans chaque compartiment. Cette contrainte est donc appliquée au modèle. Le nombre de facteurs est déterminé à la fois par les premiers résultats tirés de l'analyse orthogonale et par les connaissances physiologiques relatives. L'analyse oblique est basée sur un algorithme d'optimisation itératif. Il peut être arrêté par l'utilisateur après un certain nombre d'itération ou s'arrêter automatiquement lorsque la convergence est atteinte, c'est-à-dire que la solution est définie par un ensemble de données positives ou nulles. Dans le cas du traitement d'images scintigraphiques, certains paramètres sont déterminés à l'avance tels que la positivité des courbes ou des images factorielles.

Enfin, l'étape de projection permet de revenir à l'échantillonnage spatial initial des données.

Nous avons voulu donc savoir si l'utilisation de l'AFSIM pour traiter nos résultats pouvait permettre de tracer une zone d'intérêt sur le cœur de façon plus reproductible et donc plus fiable que par l'utilisation de la technique manuelle.

2. Matériel et méthodes

2.1. Protocole expérimental

Les données utilisées pour cette étude sont les données acquises lors de la première mesure de l'insulino-résistance des animaux des groupes Lard, Cafétéria et Contrôle. Le protocole est expliqué en détail p. 112 et suivantes.

Brièvement, les expériences sont menées sur des rats mâles Sprague-Dawley (Harlan, France), normoglycémiques et normoinsulinémiques, âgés de 9 semaines et nourris *ad libitum* avec un régime standard A04.

L'animal est installé sous la γ -caméra afin d'imager le cœur, la cage thoracique étant placée au plus près du collimateur. Les injections du ⁶DIG sont effectuées sur une période d'une minute à l'aide d'un pousse-seringue : une première injection de ⁶DIG est réalisée. La deuxième injection est réalisée 5 minutes après l'injection d'un bolus d'insuline. Chaque injection est suivie d'une période d'acquisition de la radioactivité cardiaque de 20 minutes (Figure 40).

Deux séries de données ont été utilisées pour étudier la faisabilité de la méthode. Dans la première, la quantité de radioactivité injectée à l'animal était d'environ 9,25 MBq en condition basale et 9,25 MBq sous insuline. Dans le second, la radioactivité injectée était d'environ 11 MBq pour les deux conditions.

2.2. Analyse des images

2.2.1 Placement de la ROI après analyse factorielle

Les données obtenues par la γ -caméra sont traitées par une analyse factorielle à l'aide du logiciel Pixies. L'échantillonnage temporel des images est de 60 secondes. Une matrice 4x4 est utilisée pour l'étape d'agrégation des pixels. L'analyse factorielle est réalisée pour 3 compartiments. La ROI cardiaque est déterminée comme le contour de la région la plus dense.

2.2.2 Placement manuel de la ROI

Le placement manuel de la ROI cardiaque est réalisé sur les temps courts d'acquisition (Figure 54), à l'aide du logiciel γ -vision plus. Pour des raisons de normalisation de traitement, la taille des ROI a été fixée à 40,74 mm². Cette taille correspond à la taille moyenne (n=20) des ROI réalisées sur le cœur lors du développement de la méthode d'analyse.

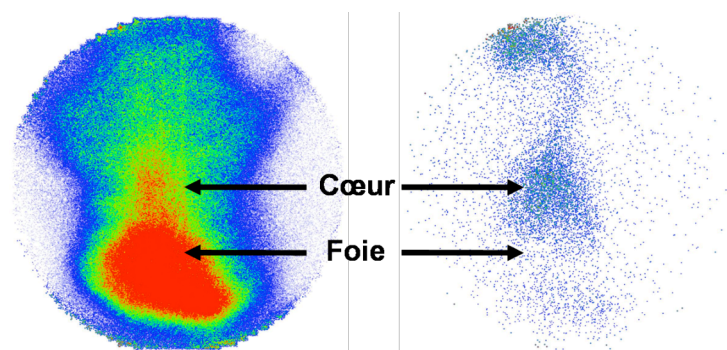


Figure 54. Exemple de scintigraphie obtenue avec le 6DIG chez le rat.

L'image de gauche est obtenue 20 minutes après une injection d'un bolus de 6DIG. Une image aux temps courts d'acquisition (ici à 30 secondes) est nécessaire au traitement des données (à droite).

2.3. Etude de reproductibilité inter-observateur

Cette étude est réalisée en calculant le descripteur empirique cardiaque après traitement des données par analyse factorielle grâce au logiciel Pixies. Une analyse factorielle à 3 compartiments permet de mettre en évidence le cœur et de tracer une région d'intérêt sur celui-ci. Les cinétiques du 6DIG sont alors obtenues en coups par minutes. Le traitement des données est expliqué p.113. Pour rappel, le descripteur empirique cardiaque, basé sur l'analyse graphique des courbes est calculé par la formule :

$$DE = \frac{[A0 - A1]^{insuline}}{[A0 - A1]^{basal}}$$

Où A0 représente l'ordonnée à l'origine de la fonction mono-exponentielle d'équation $y_a(t) = A0 \cdot \exp(-a1 \cdot t)$, calculée entre le pic d'activité tissulaire et $t=10$ minutes, et A1 représente l'ordonnée à l'origine de la fonction linéaire d'équation $y_a(t) = a1 \cdot t + A1$, calculée entre 10 et 15 minutes. Les valeurs de A0 et de A1 sont calculées en conditions basale et sous insuline. Les paramètres A0 et A1 sont calculés grâce au module "numerical" du logiciel SAAMII.

Les données sont traitées par 2 observateurs indépendants et un test de Kappa est effectué.

3. Résultats

3.1. Reproductibilité inter-observateur après placement de la ROI grâce à l'analyse factorielle des séquences d'images médicales

Un exemple représentatif des résultats obtenus par l'AFSIM à 3 compartiments est présenté Figure 55.

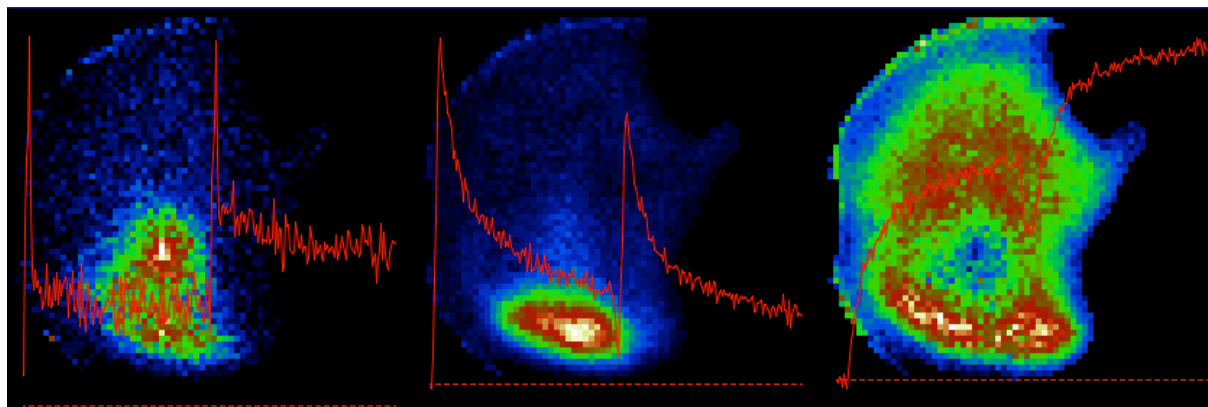


Figure 55. Résultat de l'analyse factorielle sur des images scintigraphiques obtenues après injection de 6DIG.

L'analyse factorielle à 3 compartiments permet l'obtention de 3 images (ou compartiments), dans lesquelles le signal change de façon caractéristique au cours du temps. Les courbes associées décrivent l'évolution du signal au cours du temps.

L'interprétation des images obtenues par analyse factorielle se fait en fonction des connaissances des structures anatomiques de l'animal, ainsi que sur les cinétiques associées à chaque composante attendue. L'un des compartiments correspond au cœur, le second au foie et le troisième aux autres parties anatomiques de l'animal. Les cinétiques associées à ces compartiments sont différentes : les images associées au cœur et au foie présentent une cinétique décroissante en fonction du temps alors que l'image associée au « reste du corps » de l'animal présente une cinétique croissante.

Pour une injection de 9,25 MBq de traceur, la moyenne des valeurs des descripteurs empiriques obtenus par le premier observateur est de $1,5 \pm 0,56$ contre $1,48 \pm 0,40$ pour le second observateur (Tableau 7). Pour une injection de 11 MBq, les descripteurs sont en moyenne de $1,58 \pm 0,31$ et $1,55 \pm 0,30$ respectivement pour l'observateur 1 et l'observateur 2.

	Observateur 1	Observateur 2
1 ^{ère} série (n=15) injection de 9,25 MBq	$1,50 \pm 0,56$	$1,48 \pm 0,40$
2 ^{ème} série (n=12) injection de 11 MBq	$1,58 \pm 0,31$	$1,55 \pm 0,30$

Tableau 7. Reproductibilité inter-observateur après placement de la ROI en utilisant l'analyse factorielle des séquences d'images médicales.

La quantité de radioactivité injectée pour chaque acquisition était de 9,25 MBq (n=15) et 11 MBq (n=12). Les descripteurs empiriques sont calculés indépendamment par deux observateur. Résultats exprimés en moyenne \pm ET.

Le test statistique de Kappa fournit un coefficient permettant d'étudier la reproductibilité pour des variables aléatoires non continues. Plus ce coefficient est proche de 1, plus les séries sont en accord. Le tableau suivant permet d'estimer l'accord entre observateurs en fonction du coefficient Kappa obtenu.

Coefficient Kappa	Accord
< 0,2	Très faible
0,21 – 0,40	Faible
0,41 – 0,60	Moyen
0,61 – 0,80	Bon
0,81 – 1	Très bon

Les coefficients de Kappa obtenus pour les deux séries d'animaux traités sont les suivants :

1^{ère} série : 0,382 - intervalle de confiance à 95 % [0,0752 - 0,690] – **Faible**

2^{ème} série : 0,686 - intervalle de confiance à 95 % [0,551 - 0,821] – **Bon**

3.2. Reproductibilité inter-observateurs après placement manuel de la ROI

La moyenne des valeurs des descripteurs empiriques cardiaques obtenus par le premier observateur est de $1,39 \pm 1,06$ contre $1,40 \pm 1,23$ pour le second observateur pour une injection de 9,25 MBq de traceur (Tableau 8). Les descripteurs sont en moyenne de $1,52 \pm 0,41$ et $1,65 \pm 0,72$ respectivement pour l'observateur 1 et l'observateur 2, pour une injection de 11 MBq.

	Observateur 1	Observateur 2
1 ^{ère} série (n=15) injection de 9,25 MBq	$1,39 \pm 1,06$	$1,40 \pm 1,23$
2 ^{ème} série (n=12) injection de 11 MBq	$1,52 \pm 0,41$	$1,65 \pm 0,72$

Tableau 8. Reproductibilité inter-observateurs après placement manuel de la ROI

La quantité de radioactivité injectée pour chaque acquisition était de 9,25 MBq (n=15) et 11 MBq (n=12). Les descripteurs empiriques sont calculés indépendamment par deux observateurs. Résultats exprimés en moyenne \pm ET.

Les coefficients de Kappa obtenus pour les deux séries d'animaux traités sont les suivants :

1^{ère} série : 0,36 - intervalle de confiance à 95 % [0,184 - 0,538] - **Faible**

2^{ème} série : 0,24 - intervalle de confiance à 95 % [0,075 - 0,385] - **Faible**

4. Discussion

Pour pouvoir réaliser une analyse factorielle sur les images scintigraphiques, il est nécessaire de déterminer l'échantillonnage temporel de la séquence d'images sur lesquelles cette analyse va être réalisée. Le choix de l'échantillonnage doit donc se faire en fonction des connaissances a priori de la cinétique recherchée et dans notre cas, de la dose de radioactivité injectée à l'animal. En effet, si un échantillonnage toutes les 10 secondes peut être intéressant au regard de la cinétique du traceur dans le cœur puisque le 6DIG arrive dans cet organe rapidement par le système veineux, il présente l'inconvénient de fournir des images sur lesquelles la quantité de désintégrations mesurées est peu importante. Le nombre de coups recueillis dans les images est faible puisque la concentration du 6DIG dans l'organe diminue rapidement après injection et l'iode 125 est un élément radioactif de faible énergie (35 keV). La statistique de comptage est donc mauvaise et l'analyse factorielle est alors impossible. Dans notre cas, l'utilisation d'un échantillonnage temporel de 60 secondes est plus adaptée. L'AFSIM permet alors d'identifier le compartiment cardiaque.

Les données de deux séries de rats ont été traitées par deux observateurs indépendants, avec le logiciel γ -vision plus ou avec le logiciel Pixies. Ces deux séries diffèrent uniquement par la quantité de radioactivité injectée pour chaque condition (basale et insuline) : 9,25 MBq ou 11 MBq. Le positionnement de la ROI de façon manuelle donne une faible reproductibilité du calcul des descripteurs empiriques, et ce quelle que soit la quantité de radioactivité injectée. En utilisant l'AFSIM pour positionner la ROI cardiaque, la reproductibilité inter-observateur est faible pour une injection de 9,25 MBq et bonne pour une injection de 11 MBq d'activité. Ces résultats peuvent être expliqués par une amélioration de la statistique de comptage du fait de la plus grande quantité de radioactivité injectée : le placement de la ROI cardiaque est alors plus facile. L'utilisation de l'analyse factorielle permet donc d'améliorer la reproductibilité inter-observateur du placement de la région d'intérêt lorsque la quantité de radioactivité injectée est suffisante. Par ailleurs, une étude de reproductibilité précédemment réalisée avec le calcul des index cardiaques par modélisation mathématique après placement manuel de la ROI a montré une reproductibilité « moyenne » ($2,17 \pm 1,41$ vs. $2,56 \pm 1,61$; test de Kappa : 0,44) de la méthode (Thèse de J.Vollaire, 2010). L'utilisation du modèle mathématique au lieu du descripteur empirique pour traiter les données améliore donc la reproductibilité inter-observateur. Ceci s'explique par le fait que le descripteur empirique est beaucoup plus sujet aux variations que l'index obtenu par modélisation mathématique, puisqu'il est calculé à partir de rapport de pentes et ne tient pas compte de l'activité sanguine. La reproductibilité inter-observateur pourrait donc encore être améliorée avec l'utilisation du modèle mathématique pour traiter les données extraites par analyse factorielle.

II. TRAITEMENT DES DONNEES POUR L'ETUDE DE L'INSULINO-RESISTANCE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE

1. Contexte

Des études antérieures menées au sein du laboratoire ont permis de mettre au point et de valider une méthode de mesure du transport du 6DIG dans le muscle squelettique chez le rat (Thèse de J.Vollaire, 2010). Cette mesure repose sur deux injections de traceur séparées par l'injection d'un bolus d'insuline. Le transport de la molécule est donc étudié en condition basale puis sous insuline. La cinétique du transport du 6DIG dans le muscle squelettique est différente de celle observée dans le myocarde : elle peut être décomposée en deux phases, la première rapide et la seconde, plus lente, correspondant à un plateau (Figure 56).

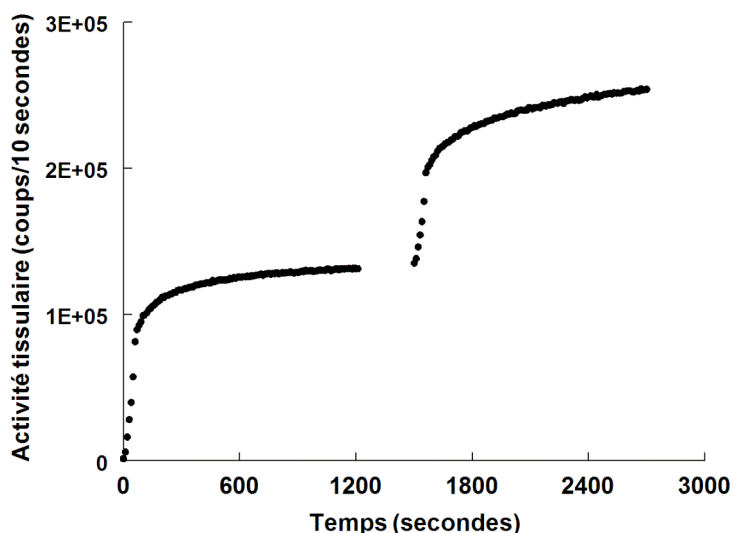


Figure 56. Cinétique de transport du 6DIG en condition basale puis sous insuline dans le muscle squelettique.

Afin de traiter les données obtenues par acquisition de la radioactivité, une modélisation mathématique est nécessaire. L'équipe d'A.Bertoldo a développé un modèle mathématique permettant d'estimer le transport du glucose dans le muscle squelettique humain en TEP (Bertoldo, 2005). Dans ce modèle, le traceur, le $[^{11}\text{C}]\text{-3OMG}$, est injecté à l'équilibre lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique. Le comportement cellulaire du $[^{125}\text{I}]\text{-6DIG}$ étant proche de celui du $[^{11}\text{C}]\text{-3OMG}$, un modèle mathématique, dérivé du modèle utilisé pour le $[^{11}\text{C}]\text{-3OMG}$, a été mis au point au laboratoire (E. Pellegrini, L. Slimani et P. Millet). Ce modèle, développé à partir du module « compartimental » du logiciel SAAMII, permet de quantifier le transport du glucose à partir de données biologiques et d'obtenir un index chiffré du transport du glucose *in vivo* chez le rat, reflétant l'insulino-résistance musculaire (Figure 57). Il comporte trois compartiments : un compartiment

plasmatique (C_p), un compartiment interstitiel (C_i) et un compartiment intracellulaire (C_e). Les échanges entre ces compartiments sont caractérisés par des constantes de transfert k .

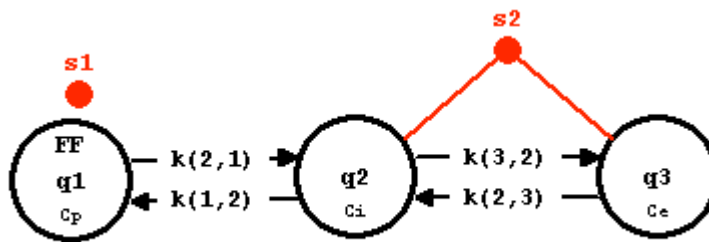


Figure 57. Modèle mathématique à trois compartiments développé pour l'étude du transport du 6DIG dans le muscle squelettique chez le rat *in vivo*.

C_p représente le compartiment plasmatique, C_i représente le compartiment interstitiel et C_e représente le compartiment tissulaire. Les coefficients de transfert fractionnel sont représentés entre chaque compartiment, notés par les constantes k .

Les fonctions s_1 et s_2 représentent les fonctions d'observation, respectivement dans le compartiment plasmatique et dans le compartiment musculaire qui comprend le compartiment interstitiel et le compartiment intracellulaire. Ce modèle utilise également une fonction forcée (FF) appliquée aux valeurs de la courbe d'activité plasmatique. Les échanges entre les différents compartiments sont supposés linéaires et sont estimés à partir des coefficients de transferts : $k(1,2)$, $k(2,1)$, $k(3,2)$ et $k(2,3)$. Les coefficients de transfert $k(2,1)$ et $k(1,2)$ représentent les flux de 6DIG respectivement du compartiment plasmatique vers le compartiment interstitiel et du compartiment interstitiel vers le compartiment plasmatique. Les coefficients $k(3,2)$ et $k(2,3)$ représentent le flux entre le compartiment interstitiel et le compartiment intracellulaire d'une part et le flux inverse, entre le compartiment intracellulaire et le compartiment interstitiel d'autre part. L'index d'insulino-résistance musculaire ($Index$) est calculé selon la relation suivante :

$$Index = k(3,2) \text{ insuline} / k(3,2) \text{ basal}$$

Il correspond donc au rapport de l'entrée du traceur dans le compartiment interstitiel en condition sous insuline sur l'entrée du traceur dans le compartiment interstitiel en condition basale. Donc, plus l'index est élevé, plus le sujet est sensible à l'insuline.

Il a été montré que les constantes cinétiques $k(i,j)$ pouvaient être estimées de manière fiable à partir de 90 minutes d'acquisition pour chaque condition (basale et insuline), c'est donc ce temps d'acquisition qui a été fixé pour chaque condition.

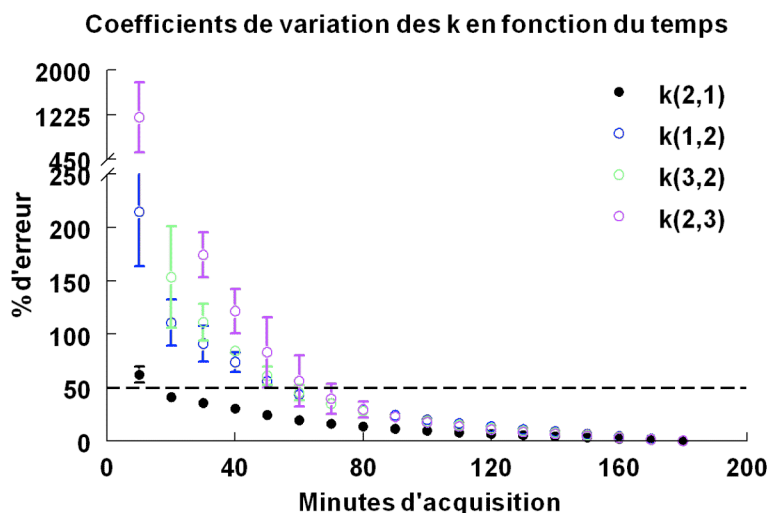


Figure 58. Exemple de calcul des coefficients de variation des constantes cinétiques du modèle mathématique en fonction du temps.

Jusqu'à 90 minutes, les pourcentages d'erreurs associés aux valeurs k calculées sont très élevés et ne permettent pas une détermination précise de ces coefficients. (Thèse de J.Vollaire, 2010)

La durée des acquisitions et les nombreux prélèvements sanguins nécessaires au fonctionnement du modèle ne permettent pas d'envisager son utilisation répétée chez l'animal. Un descripteur empirique, basé uniquement sur l'analyse des courbes d'acquisitions dans le muscle de 20 minutes chacune, a été développé. Ce descripteur empirique musculaire tient compte des pentes entre 1 et 5 minutes et entre 5 et 10 minutes sous insuline, ainsi que du plateau moyen calculé entre 15 et 20 minutes en condition basale. Cependant, si ce descripteur empirique, calculé pour des animaux sains, corrèle fortement à l'index d'insulino-résistance musculaire, il ne présente pas une sensibilité suffisante pour mesurer de faibles variations d'insulino-résistance.

Le but de cette étude est donc d'une part d'extrapoler les données entre 20 et 90 minutes afin de permettre l'utilisation du modèle mathématique et d'autre part de vérifier que l'utilisation des données extrapolées est équivalente à celle des données expérimentales acquises sur 90 minutes.

2. Matériel et méthodes

Les données utilisées pour l'optimisation du traitement des données musculaires sont issues d'un travail précédemment réalisé au laboratoire (Thèse de J.Vollaire, 2010).

2.1. Animaux

8 rats mâles Wistar d'environ 340 g et 7 rats mâles Zucker d'environ 470 g ont été utilisés. Le 6DIG est injecté à l'aide d'un pousse-seringue (Harvard Pump 11 Plus, Harvard Apparatus). L'insuline (Actrapid, 100 UI/mL) est fournie par Novo Nordisk (Paris, France). Les cathéters en polyuréthane sont fournis par Portex (Ref 800/100/200, Angleterre). La radioactivité dans le muscle squelettique est détectée à l'aide d'une sonde NaI (P14, Bicon Corp., USA), couplée à un analyseur multicanaux fonctionnant en multi-échelles (SM512, Novelec, France).

2.2. Préparation des animaux

Les rats, à jeûn depuis une dizaine d'heures environ, sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de Pentobarbital Sodique ($54,7 \text{ mg.mL}^{-1}$) à raison de $100 \text{ mL}/100 \text{ g}$, soit $54,7 \text{ mg.kg}^{-1}$. Deux cathéters, préalablement remplis de sérum physiologique hépariné (Heparine Choay, Sanofi Aventis, 5 % soit 25000 UI dans 100 mL) sont placés : le premier dans la veine jugulaire droite, afin de permettre les injections, le second dans l'artère carotide gauche afin de réaliser les prélèvements sanguins. Les cathéters sont ensuite « tunnélisés » sous la peau et ressortent sur le dos de l'animal, entre les omoplates. La température corporelle des animaux est stabilisée durant toute l'expérience à l'aide d'une couverture chauffante régulée par un thermomètre rectal contrôlant la température interne du rat (Homeothermic blanket control unit, Harvard Apparatus, UK).

2.3. Acquisition de la radioactivité

La sonde permettant la mesure de la radioactivité est placée au plus près du quadriceps de la patte postérieure droite de l'animal. La zone de détection est délimitée par un collimateur en plomb (3 cm de diamètre) fabriqué dans une plaque de plomb de 5 mm d'épaisseur. L'échantillonnage temporel de l'acquisition de la radioactivité est de 10 secondes. La cinétique sanguine est suivie grâce à des prélèvements sanguins de $10 \mu\text{L}$ ($n=2$), effectués à 0, 10, 20, 30, 40, 50 secondes puis à 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 10, 15, 30, 45, 60 et 90 minutes post-injection. La radioactivité contenue dans les échantillons sanguins est mesurée à l'aide d'un compteur gamma (Cobra II auto-gamma, Packard).

Une première injection de 6DIG (condition basale) (9,25 MBq) est infusée sur une période d'une minute à l'aide d'un pousse-seringue. La radioactivité est mesurée pendant 90 minutes, puis un bolus d'insuline ($2,5 \text{ UI/kg}$) est injecté. Cinq minutes après, une deuxième injection de 6DIG est réalisée et un nouvel enregistrement de 90 minutes est effectué (condition insuline) (Figure 59).

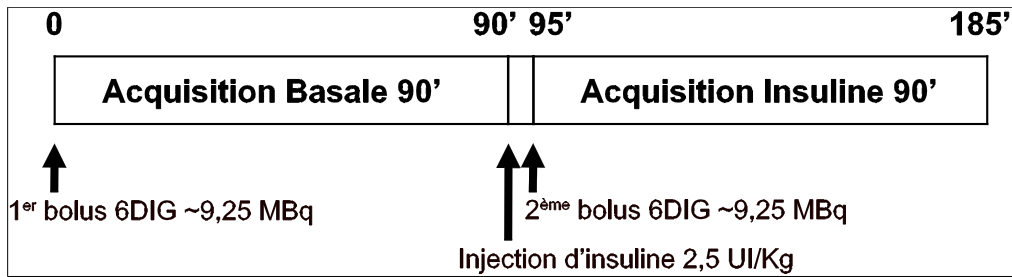


Figure 59. Protocole de mesure du transport du 6DIG dans le muscle squelettique en condition basale et en condition insuline.

Ce protocole de 185 minutes permet l'utilisation du modèle mathématique pour traiter les données.

2.4. Traitement numérique des données

2.4.1 Expression des données

Les données sanguines et tissulaires sont exprimées en coups par minute par millilitre (cpm.mL^{-1}). La normalisation s'effectue par une conversion des données fournies par la sonde (coups/10 secondes) en cpm.mL^{-1} grâce à une courbe étalon élaborée au préalable avec des activités connues diluées dans 1 mL de sérum physiologique.

2.4.2 Modélisation mathématique

Le traitement des données est effectué grâce au module « compartimental » du logiciel SAAM II. L'index d'insulino-résistance musculaire est calculé par le rapport des $k(3,2)$ insuline et basal et correspond au rapport d'entrée du traceur dans le compartiment interstitiel en condition sous insuline sur l'entrée du traceur dans le compartiment interstitiel en condition basale (Figure 57).

Le modèle mathématique est décrit par le système d'équations suivant:

$$\dot{C}_i(t) = k(2,1) * C_p(t) - (k(1,2) + k(3,2)) * C_i(t) + k(2,3) * C_e(t) \quad C_i(0) = 0$$

$$\dot{C}_e(t) = k(3,2) * C_i(t) - k(2,3) * C_e(t) \quad C_e(0) = 0$$

$$C(t) = (1 - Vb) * (C_i(t) + C_e(t)) + Vb * C_p(t)$$

où C_p est la concentration plasmatique, C_i la concentration interstitielle (extracellulaire), C_e la concentration intracellulaire en traceur, C est l'activité totale mesurée dans la région d'intérêt et Vb représente la fraction de sang qui occupe le volume imagé. Ce dernier paramètre étant très faible, il est négligé dans le calcul.

L'activité mesurée est décrite par :

$$C_{obs}(t_j) = C(t_j) + e(t_j) \quad j = 1, 2 \dots N$$

où $e(t_j)$ est l'erreur de mesure au temps t_j . Cette erreur est estimée indépendante, de répartition Gaussienne et de moyenne nulle.

La précision des paramètres fournis par le modèle est évaluée par la somme des résidus pondérés au carré (*WRSS*). Les résidus sont calculés à différents temps comme les différences entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées :

$$WRSS(\hat{p}) = \sum_{j=1}^N w_j \left[C^{obs}(t_j) - C(\hat{p}, t_j) \right]^2$$

où N est le nombre de mesure, \hat{p} est le paramètre estimé, w_j la pondération donnée par $w_j = \Delta t_j / C^{obs}(t_j)$ (où Δt_j est l'intervalle d'acquisition relatif à $C^{obs}(t_j)$).

Le module « compartmental » de SAAMII calcule pour chaque coefficient de transfert un intervalle de confiance, un écart-type et un coefficient de variation (CV) en %.

2.4.3 Extrapolation des données

Les extrapolations des cinétiques sanguines et musculaires sont effectuées avec le module « numerical » du logiciel SAAMII.

3. Résultats

3.1. Extrapolation des données musculaires entre 20 et 90 minutes à partir des cinétiques mesurées pendant 90 minutes.

La cinétique du 6DIG dans le muscle squelettique présente deux phases successives : une phase de croissance rapide, suivie d'une phase de croissance lente assimilable à un plateau. En utilisant le module « numerical » du logiciel SAAM II, les 20 premières minutes d'acquisition ont été extrapolées jusqu'à 90 minutes par l'équation : $y_b(t) = B1*(1-\exp^{-b1*t}) + B2*(1-\exp^{-b2*t})$.

Les résultats obtenus (Figure 60) montrent la moyenne des courbes réelles et la moyenne des courbes extrapolées, pour les rats Wistar et Zucker en condition basale. On peut voir sur cette figure que l'extrapolation sous-estime l'augmentation de la radioactivité dans le muscle.

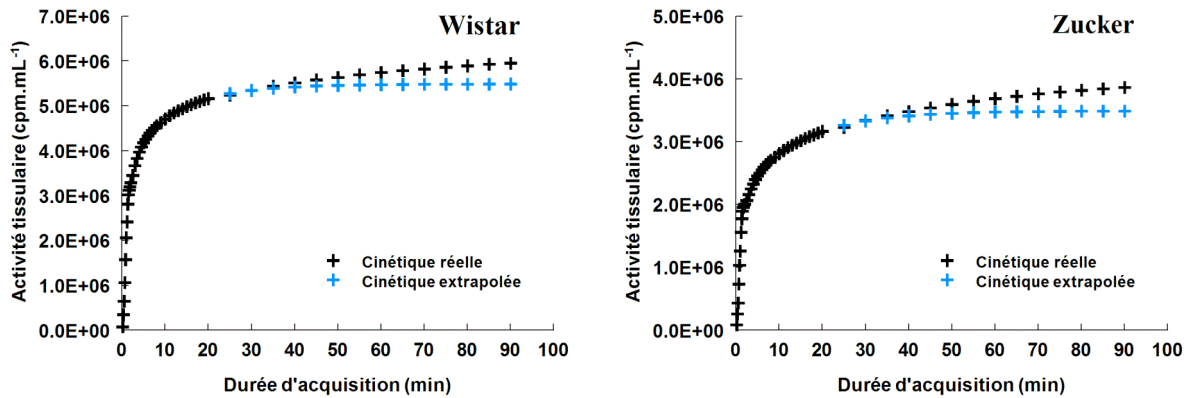


Figure 60. Extrapolation des cinétiques musculaires.

Cinétiques musculaires moyennes mesurées entre 0 et 90 minutes (en noir) et cinétiques musculaires moyennes extrapolées à partir des 20 premières minutes d'acquisition (en bleu), chez le rat Wistar et chez le rat Zucker. Ces données sont acquises en condition basale.

Nous avons donc « imposé » au modèle une valeur pour le temps = 90 minutes. Le pourcentage d'augmentation entre 20 et 90 minutes a été calculé pour chaque rat. Les augmentations moyennes obtenues en condition basale pour les rats Wistar et les rats Zucker étaient respectivement de +16 % et +23 % et ne présentaient pas de différences significatives. Nous avons donc utilisé la moyenne des valeurs obtenues pour les rats Wistar et Zucker, soit 19 %, pour calculer, pour chaque rat, une valeur théorique à 90 minutes qui nous a permis de « simuler » l'extrapolation vers le haut. Les courbes obtenues sont présentées Figure 61.

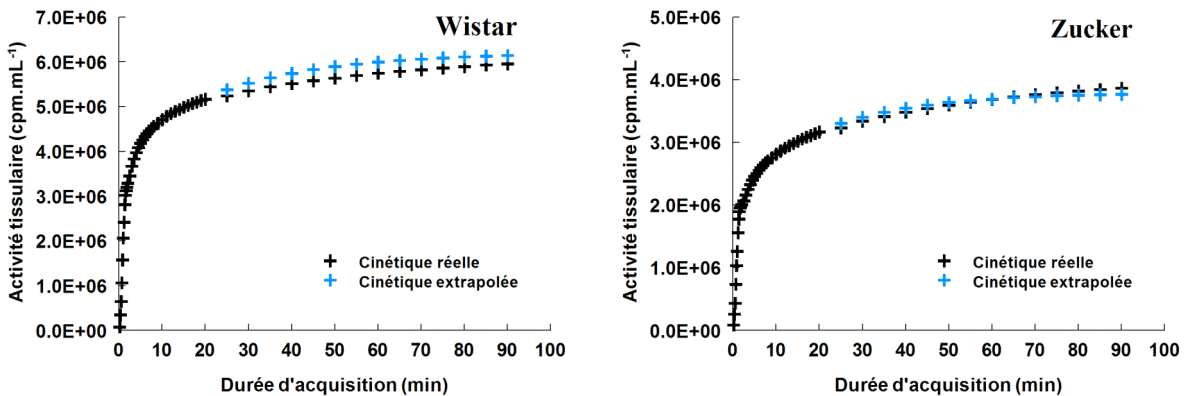


Figure 61. Extrapolation des cinétiques musculaires après correction de la valeur à 90 minutes.

Cinétiques musculaires mesurées entre 0 et 90 minutes (en noir) et cinétiques musculaires extrapolées à partir des 20 premières minutes d'acquisition (en bleu), chez le rat Wistar et chez le rat Zucker. La valeur à 90 minutes est imposée lors du calcul de l'extrapolation. Ces données sont acquises en condition basale.

Nous avons utilisé une approche similaire pour les acquisitions obtenues sous insuline. Les valeurs obtenues étaient respectivement de 9 % et 12 %. Là encore, il n'y avait pas de

différences significatives entre ces valeurs, et c'est donc leur moyenne qui a été utilisée par la suite.

Ainsi, la valeur théorique à 90 minutes est définie comme la valeur à 20 minutes, augmentée de 19 % en condition basale et de 11 % en condition insuline.

3.2. Extrapolation des données sanguines entre 20 et 90 minutes à partir des cinétiques mesurées, par prélèvements de sang, pendant 90 minutes

Une approche similaire a été effectuée afin d'obtenir la cinétique sanguine du traceur pendant 90 minutes à partir de la cinétique sanguine mesurée pendant 20 minutes par prélèvements sanguins (Figure 62). La cinétique sanguine est extrapolée en utilisant une double exponentielle décroissante d'équation : $ya(t) = A1*exp(-a1*t) + A2*exp(-a2*t)$. Le pourcentage de diminution appliqué est de 41 % en basal et 20 % sous insuline.

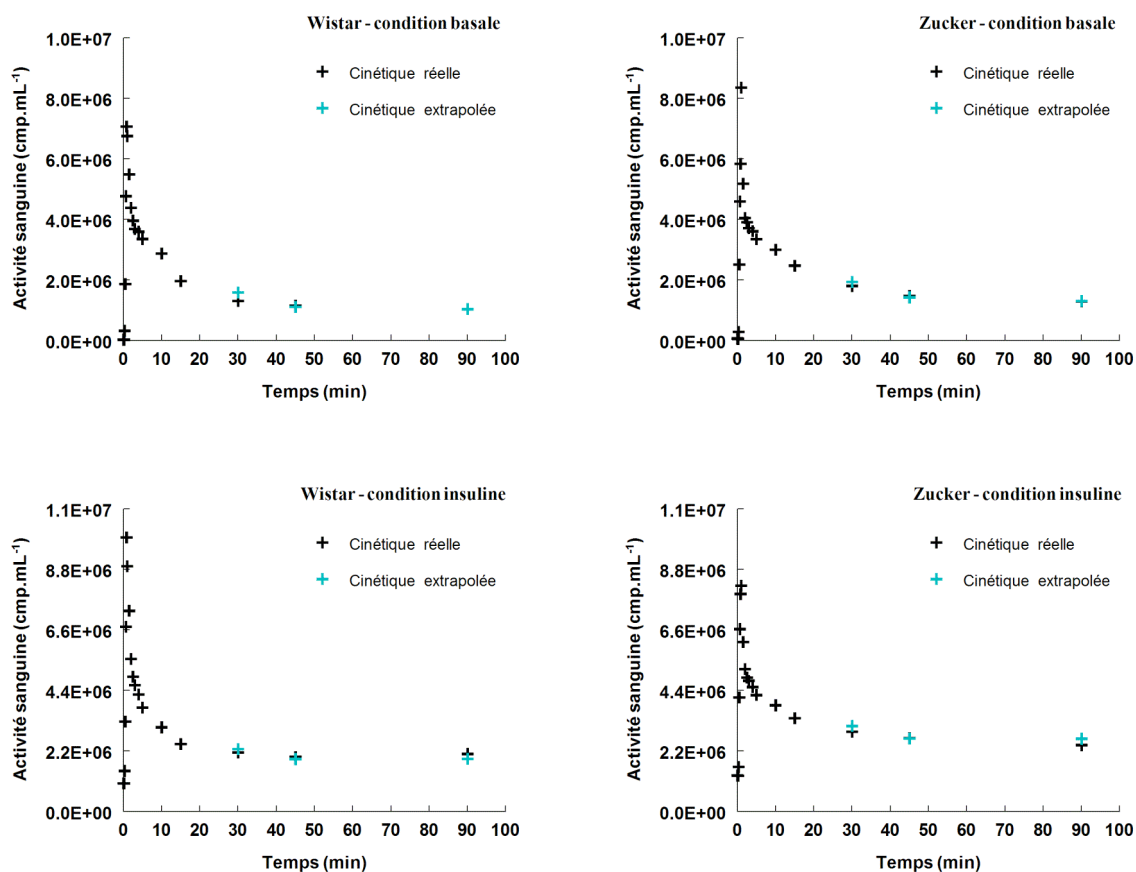


Figure 62. Extrapolation des cinétiques sanguines obtenues après injection du 6DIG.

Cinétiques sanguines mesurées entre 0 et 90 minutes (en noir) et cinétiques sanguines extrapolées à partir des 20 premières minutes d'acquisition (en bleu), chez le rat Wistar et chez le rat Zucker. La valeur à 90 minutes est imposée lors du calcul de l'extrapolation. Ces données sont acquises en condition basale (en haut) et sous insuline (en bas).

3.3. Calcul des index d'insulino-résistance avec le modèle mathématique

Afin de valider l'utilisation des données extrapolées entre 20 et 90 minutes, le calcul des index a été effectué de plusieurs manières :

- en utilisant **les données musculaires et sanguines réelles mesurées pendant 90 minutes,**
- en utilisant **les données musculaires extrapolées entre 20 et 90 minutes et les données sanguines réelles,**
- en utilisant **les données musculaires réelles et les données sanguines extrapolées entre 20 et 90 minutes,**
- en utilisant **les données musculaires et sanguines extrapolées entre 20 et 90 minutes.**

Les résultats sont présentés Figure 63. Lorsque les index sont calculés à partir de valeurs réelles, la valeur moyenne de ces index est de $2,47 \pm 0,20$ pour les rats Wistar et de $1,40 \pm 0,08$ pour les rats Zucker. Le calcul des index avec les valeurs musculaires extrapolées et les valeurs sanguines réelles ne change pas significativement les valeurs des index. L'utilisation des données musculaires réelles et les données sanguines extrapolées semble diminuer la valeur de l'index musculaire pour les rats Wistar. Cependant les moyennes ne sont pas significativement différentes (valeurs réelles vs. valeurs extrapolées). Les index sont significativement différents entre les animaux Wistar et Zucker, lorsque les index sont calculés avec les cinétiques réelles ($2,47 \pm 0,20$ et $1,40 \pm 0,08$, $p < 0,001$) ou avec les cinétiques musculaires extrapolées et les cinétiques sanguines réelles ($2,53 \pm 0,16$ et $1,45 \pm 0,11$, $p < 0,001$). Lorsque l'index est calculé à partir des cinétiques musculaires réelles et les cinétiques sanguines extrapolées, les index pour les animaux Wistar et Zucker ne sont pas significativement différents. Les index calculés avec les données sanguines et musculaires extrapolées, mettent en évidence une différence significative entre les animaux Wistar et Zucker ($2,10 \pm 0,24$ vs. $1,50 \pm 0,07$, $p < 0,05$).

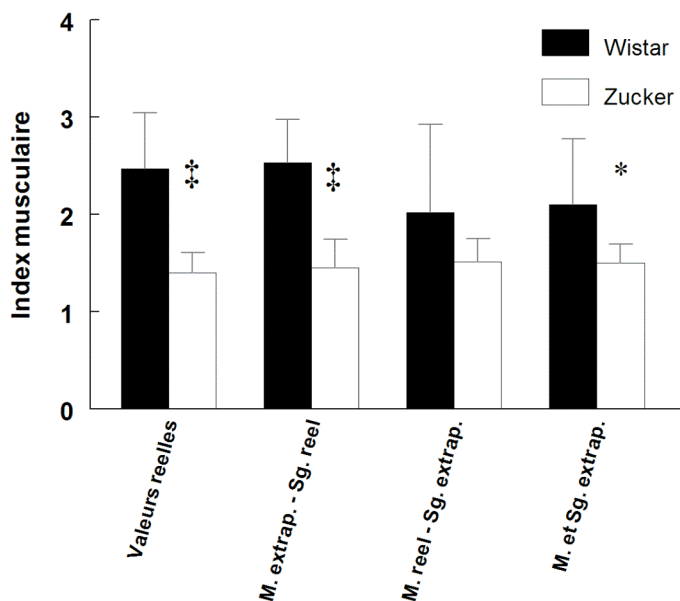


Figure 63. Index d'insulino-résistance musculaire

Valeurs de l'index d'insulino-résistance musculaire calculé à partir des données réelles ou extrapolées (extrap.).
* $p < 0,05$ et ‡ $p < 0,001$: Wistar vs. Zucker

4. Discussion

Le modèle mathématique permettant le calcul d'un index d'insulino-résistance musculaire avec le 6DIG nécessite des données tissulaires acquises sur 90 minutes ainsi que la cinétique sanguine du traceur. Dans un premier temps, nous avons voulu savoir s'il était possible, à partir d'acquisitions de la radioactivité dans le muscle squelettique durant seulement 20 minutes, de calculer un index d'insulino-résistance fiable. Nos résultats suggèrent qu'une extrapolation des données musculaires à partir des 20 premières minutes d'acquisition jusqu'à 90 minutes est possible mais le facteur permettant d'estimer la valeur à 90 minutes utilisée pour l'extrapolation des données, a été calculé sur un petit nombre d'animaux : il est nécessaire de vérifier que ce facteur serait identique pour un plus grand nombre d'animaux et sur d'autres séries expérimentales. L'utilisation d'une fonction plus précise que la fonction « double exponentielle » et donc plus adaptée à la courbe réelle peut également être envisagée par des études mathématiques plus complètes. Enfin, il est nécessaire de vérifier que l'extrapolation des données est réellement applicable dans le cas d'acquisitions de deux fois 20 minutes en démontrant la reproductibilité et la sensibilité de la méthode.

III. ESTIMATION DE LA CINÉTIQUE SANGUINE A PARTIR DE LA CINÉTIQUE HÉPATIQUE DU TRACEUR.

1. Contexte

Afin de pouvoir réaliser des études longitudinales chez l'animal, il est nécessaire de s'affranchir des prélèvements sanguins. Les images obtenues n'ont pas une résolution suffisante pour tracer une ROI sur l'aorte ou le ventricule gauche qui nous permettrait d'obtenir la cinétique sanguine du traceur. Une approche envisageable est l'utilisation d'une cinétique sanguine théorique déduite à partir de la courbe d'activité observée dans le foie. En effet, le foie est un organe fortement irrigué par le sang et son positionnement sur l'image scintigraphique est aisé. Des biodistributions ont permis de montrer que la cinétique du 6DIG dans le foie était décroissante et proche de celle observée dans le sang. De plus, il a été montré que le transport hépatique du 6DIG était identique en condition basale ou après injection d'insuline (Perret, 1999).

Nous avons donc réalisé une étude en utilisant un protocole expérimental similaire à celui décrit dans les parties précédentes, pour voir s'il était possible, à partir de l'image hépatique, d'extraire la cinétique sanguine du traceur.

2. Matériel et méthodes

2.1. Animaux et matériel

5 rats mâles Wistar (Charles River, France) d'environ 300 g ont été utilisés. Le 6DIG est injecté à l'aide d'un pousse-seringue ("Harvard Pump 11 Plus", Harvard Apparatus). L'insuline (Actrapid, 100 UI.mL⁻¹) est fournie par Novo Nordisk (Paris, France). Les cathéters en polyuréthane sont fournis par Portex (Ref 800/100/200, Angleterre). La radioactivité est enregistrée au moyen d'une γ -caméra dédiée au petit animal (γ Imager, Biospace).

2.2. Préparation des animaux

Les expériences sont réalisées sur des animaux à jeun depuis une dizaine d'heures. Afin de réaliser les différentes injections et les prélèvements sanguins requis par le protocole expérimental, des cathéters sont placés sur l'animal. Les injections et les prélèvements sanguins sont réalisés *via* des cathéters placés respectivement dans une veine caudale et dans une artère carotide.

2.3. Protocole d'acquisition de la radioactivité par imagerie

Le protocole d'acquisition de la radioactivité est le même que celui utilisé pour les expériences précédentes : il consiste en deux injections de 6DIG séparées d'un bolus d'inuline. Chaque injection est suivie d'une acquisition de la radioactivité pendant 20 minutes. Des prélèvements sanguins sont réalisés à 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 15 et 20 minutes post-injection lors de chaque acquisition afin d'obtenir la cinétique sanguine du traceur.

2.4. Obtention de la cinétique hépatique

La cinétique hépatique du 6DIG est obtenue après traitement des images scintigraphiques par AFSIM réalisée grâce au logiciel Pixies, qui permet de définir une ROI sur le foie de l'animal.

3. Résultats

Le pic d'activité du 6DIG dans le sang apparaît en moyenne une minute après l'injection du traceur. Dans le foie, le pic d'activité est visible en moyenne deux minutes après l'injection du traceur (Figure 64).

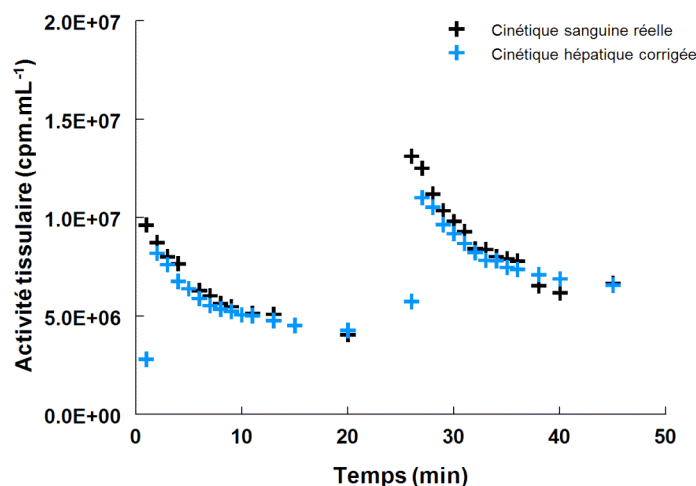


Figure 64. Comparaison entre une cinétique sanguine réelle et une cinétique obtenue à partir d'une région d'intérêt hépatique.

La cinétique sanguine réelle est obtenue par prélèvement sanguin et la cinétique hépatique est obtenue après positionnement d'une région d'intérêt au niveau du foie sur l'image scintigraphique. Les données obtenues sont ensuite corrigées et exprimées en cpm.mL⁻¹.

4. Discussion

La nécessité de réaliser des prélèvements sanguins pour obtenir la cinétique sanguine du traceur est un facteur limitant pour utiliser le modèle mathématique de façon chronique chez l'animal. Nous avons donc voulu voir s'il était possible d'obtenir la cinétique sanguine du traceur grâce à l'activité hépatique mesurée directement sur l'image. Nos résultats montrent qu'il existe un décalage du pic d'activité entre le compartiment hépatique et le compartiment sanguin. Les valeurs aux temps précoces de la cinétique sanguine étant fondamentale pour le calcul des index, l'utilisation de la cinétique extraite du foie ne permet pas l'estimation des constantes de transfert du modèle mathématique.

Ainsi, en l'état de nos connaissances, les prélèvements sanguins restent indispensables pour utiliser un modèle mathématique pour déterminer un index d'insulino-résistance tissulaire avec le 6DIG.

Pour résumer cette troisième partie :

- L'utilisation de l'AFSIM améliore la reproductibilité dans le positionnement de la région d'intérêt cardiaque, à condition que la quantité de radioactivité injectée soit suffisante. Ces résultats obtenus par analyse graphique des courbes sont à confirmer avec l'utilisation du modèle mathématique.
- L'extrapolation des données de l'activité musculaire entre 20 et 90 minutes permet le calcul de l'index d'insulino-résistance musculaire avec le modèle mathématique, mais cette méthode est trop peu sensible pour envisager son utilisation pour la mise en évidence de faibles variations d'insulino-résistance.
- L'utilisation de la cinétique hépatique ne permet pas d'obtenir la cinétique sanguine du 6DIG. La cinétique sanguine obtenue par prélèvements sanguins reste donc indispensable à l'utilisation du modèle mathématique.

Il est donc possible d'obtenir un index d'insulino-résistance cardiaque avec deux acquisitions de la radioactivité de 20 minutes (condition basale et sous insuline), mais les prélèvements sanguins restent nécessaires entre 1 et 20 minutes.

Conclusions et perspectives

L'obésité et l'insulino-résistance, deux éléments centraux du syndrome métabolique, touchent chaque année de plus en plus d'individus : ces pathologies sont devenues de véritables problèmes de santé publique. L'existence d'un nouvel outil de mesure de l'insulino-résistance en imagerie nucléaire, le 6DIG, permet d'envisager de nombreuses études pour mieux comprendre l'apparition de ces perturbations métaboliques.

Ce travail de thèse a permis de montrer la faisabilité d'une mesure chronique de l'insulino-résistance dans le cœur et dans le muscle squelettique en imagerie nucléaire avec le 6DIG. Aucune insulino-résistance n'a été mise en évidence au cours des trois mois de régime sur le modèle animal d'obésité induite par régime alimentaire. Dans ce contexte, il serait intéressant d'une part d'augmenter le nombre d'animaux de l'étude et d'autre part de reproduire ces expériences sur plus de trois mois, afin de savoir si l'utilisation de ces régimes alimentaires conduit ou non au développement d'une insulino-résistance plus tardive.

Des études visant à améliorer la sensibilité de la méthode de mesure de l'insulino-résistance dans le cœur et dans le muscle ont également été réalisées et les résultats sont les suivants :

1- L'utilisation de l'Analyse Factorielle des Séquences d'Images Médicales pour délimiter une région d'intérêt cardiaque permet d'améliorer la reproductibilité inter-observateur de la méthode, lorsque la quantité de radioactivité injectée est suffisamment élevée.

2- L'optimisation du traitement des données musculaires permet une réduction des durées d'acquisition de la radioactivité de 90 à 20 minutes. Ces résultats restent cependant à confirmer sur un plus grand nombre d'animaux et la sensibilité de cette technique est à évaluer avec précision : en effet, cette technique pourrait être trop peu sensible pour mettre en évidence de faibles variations d'insulino-résistance.

3- En l'état actuel de nos connaissances, il est impossible de s'affranchir des prélèvements sanguins permettant l'obtention de la cinétique sanguine pour l'utilisation du modèle mathématique.

Bibliographie

- Abdul-Ghani, M.A., and R.A. DeFronzo. 2010. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol.* 2010:476279.
- Adechian, S., S. Giardina, D. Remond, I. Papet, D. Buonocore, C. Gaudichon, D. Dardevet, F. Marzatico, and L. Mosoni. 2009. Excessive energy intake does not modify fed-state tissue protein synthesis rates in adult rats. *Obesity (Silver Spring)*. 17:1348-55.
- Ahlqvist, E., T.S. Ahluwalia, and L. Groop. 2011. Genetics of type 2 diabetes. *Clin Chem.* 57:241-54.
- Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw. 2005. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet.* 366:1059-62.
- Alberti, K.G., and P.Z. Zimmet. 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 15:539-53.
- Aleixandre de Artinano, A., and M. Miguel Castro. 2009. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br J Nutr.* 102:1246-53.
- Alzamendi, A., A. Giovambattista, A. Raschia, V. Madrid, R.C. Gaillard, O. Rebolledo, J.J. Gagliardino, and E. Spinedi. 2009. Fructose-rich diet-induced abdominal adipose tissue endocrine dysfunction in normal male rats. *Endocrine.* 35:227-32.
- Amar, J., R. Burcelin, J.B. Ruidavets, P.D. Cani, J. Fauvel, M.C. Alessi, B. Chamontin, and J. Ferrieres. 2008. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr.* 87:1219-23.
- Antuna-Puente, B., B. Fève, S. Fellahi, and J.P. Bastard. 2008. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 34:2-11.
- Arner, E., P.O. Westermark, K.L. Spalding, T. Britton, M. Ryden, J. Frisen, S. Bernard, and P. Arner. 2010. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes.* 59:105-9.
- Backhed, F., H. Ding, T. Wang, L.V. Hooper, G.Y. Koh, A. Nagy, C.F. Semenkovich, and J.I. Gordon. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:15718-23.
- Bai, Y., S. Zhang, K.S. Kim, J.K. Lee, and K.H. Kim. 1996. Obese gene expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones. *J Biol Chem.* 271:13939-42.
- Baker, J.L., L.W. Olsen, and T.I. Sorensen. 2007. Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood. *N Engl J Med.* 357:2329-37.
- Balkau, B., P. Valensi, E. Eschwege, and G. Slama. 2007. A review of the metabolic syndrome. *Diabetes Metab.* 33:405-13.
- Balkau, B., M. Vernay, L. Mhamdi, M. Novak, D. Arondel, S. Vol, J. Tichet, and E. Eschwege. 2003. The incidence and persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) metabolic syndrome. The French D.E.S.I.R. study. *Diabetes Metab.* 29:526-32.
- Barber, D.C. 1980. The use of principal components in the quantitative analysis of gamma camera dynamic studies. *Phys Med Biol.* 25:283-92.
- Bates, S.H., W.H. Stearns, T.A. Dundon, M. Schubert, A.W. Tso, Y. Wang, A.S. Banks, H.J. Lavery, A.K. Haq, E. Maratos-Flier, B.G. Neel, M.W. Schwartz, and M.G. Myers, Jr. 2003. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not

- reproduction. *Nature*. 421:856-9.
- Beck, B. 2000. Neuropeptides and obesity. *Nutrition*. 16:916-23.
- Becker, D.J., L.N. Ongemba, V. Brichard, J.C. Henquin, and S.M. Brichard. 1995. Diet- and diabetes-induced changes of ob gene expression in rat adipose tissue. *FEBS Lett*. 371:324-8.
- Belfort, R., L. Mandarino, S. Kashyap, K. Wirfel, T. Pratipanawatr, R. Berria, R.A. DeFronzo, and K. Cusi. 2005. Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes*. 54:1640-8.
- Bell, C.G., D. Meyre, C. Samson, C. Boyle, C. Lecoeur, M. Tauber, B. Jouret, D. Jaquet, C. Levy-Marchal, M.A. Charles, J. Weill, F. Gibson, C.A. Mein, P. Froguel, and A.J. Walley. 2005. Association of melanin-concentrating hormone receptor 1 5' polymorphism with early-onset extreme obesity. *Diabetes*. 54:3049-55.
- Berg, A.H., Y. Lin, M.P. Lisanti, and P.E. Scherer. 2004. Adipocyte differentiation induces dynamic changes in NF-kappaB expression and activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 287:E1178-88.
- Bergman, R.N., Y.Z. Ider, C.R. Bowden, and C. Cobelli. 1979. Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol*. 236:E667-77.
- Bertoldo, A., J. Price, C. Mathis, S. Mason, D. Holt, C. Kelley, C. Cobelli, and D.E. Kelley. 2005. Quantitative assessment of glucose transport in human skeletal muscle: dynamic positron emission tomography imaging of [O-methyl-11C]3-O-methyl-D-glucose. *J Clin Endocrinol Metab*. 90:1752-9.
- Bessesen, D.H., S. Bull, and M.A. Cornier. 2008. Trafficking of dietary fat and resistance to obesity. *Physiol Behav*. 94:681-8.
- Bignan, G. 1993. Synthèse d'analogues iodés du glucose. Université Joseph Fourier, Grenoble.
- Bloomgarden, Z.T. 2003. American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) consensus conference on the insulin resistance syndrome: 25-26 August 2002, Washington, DC. *Diabetes Care*. 26:1297-303.
- Blucher, M., A.M. Brennan, T. Kelesidis, J. Kratzsch, M. Fasshauer, S. Kralisch, C.J. Williams, and C.S. Mantzoros. 2007. Total and high-molecular weight adiponectin in relation to metabolic variables at baseline and in response to an exercise treatment program: comparative evaluation of three assays. *Diabetes Care*. 30:280-5.
- Blundell, J.E., C.L. Lawton, J.R. Cotton, and J.I. Macdiarmid. 1996. Control of human appetite: implications for the intake of dietary fat. *Annu Rev Nutr*. 16:285-319.
- Bocarsly, M.E., E.S. Powell, N.M. Avena, and B.G. Hoebel. 2010. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacol Biochem Behav*. 97:101-6.
- Boden, G., X. Chen, J.W. Kolaczynski, and M. Polansky. 1997. Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Invest*. 100:1107-13.
- Bogan, J.S., N. Hendon, A.E. McKee, T.S. Tsao, and H.F. Lodish. 2003. Functional cloning of TUG as a regulator of GLUT4 glucose transporter trafficking. *Nature*. 425:727-33.
- Bol, V.V., B.M. Reusens, and C.A. Remacle. 2008. Postnatal catch-up growth after fetal protein restriction programs proliferation of rat preadipocytes. *Obesity (Silver Spring)*. 16:2760-3.
- Bosco, D., A. Fava, M. Plastino, T. Montalcini, and A. Pujia. 2011. Possible implications of Insulin Resistance and Glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Cell Mol Med*.
- Bozaoglu, K., K. Bolton, J. McMillan, P. Zimmet, J. Jowett, G. Collier, K. Walder, and D. Segal. 2007. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic

- syndrome. *Endocrinology*. 148:4687-94.
- Brandt, N., K. De Bock, E.A. Richter, and P. Hespel. 2010. Cafeteria diet-induced insulin resistance is not associated with decreased insulin signaling or AMPK activity and is alleviated by physical training in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 299:E215-24.
- Bray, G.A., S.J. Nielsen, and B.M. Popkin. 2004. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*. 79:537-43.
- Briat, A., L. Slimani, P. Perret, D. Villemain, S. Halimi, J. Demongeot, D. Fagret, and C. Ghezzi. 2007. In vivo assessment of cardiac insulin resistance by nuclear probes using an iodinated tracer of glucose transport. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 34:1756-64.
- Bringer, J., P. Fontaine, B. Detournay, F. Nachit-Ouinekh, G. Bami, and E. Eschwege. 2009. Prevalence of diagnosed type 2 diabetes mellitus in the French general population: the INSTANT study. *Diabetes Metab*. 35:25-31.
- Brownson, R.C., T.K. Boehmer, and D.A. Luke. 2005. Declining rates of physical activity in the United States: what are the contributors? *Annu Rev Public Health*. 26:421-43.
- Bruun, J.M., A.S. Lihn, S.B. Pedersen, and B. Richelsen. 2005. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab*. 90:2282-9.
- Bruun, J.M., A.S. Lihn, C. Verdich, S.B. Pedersen, S. Toubro, A. Astrup, and B. Richelsen. 2003. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 285:E527-33.
- Buchanan, J., P.K. Mazumder, P. Hu, G. Chakrabarti, M.W. Roberts, U.J. Yun, R.C. Cooksey, S.E. Litwin, and E.D. Abel. 2005. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology*. 146:5341-9.
- Buettner, R., K.G. Parhofer, M. Woenckhaus, C.E. Wrede, L.A. Kunz-Schughart, J. Scholmerich, and L.C. Bollheimer. 2006. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*. 36:485-501.
- Burcelin, R., W. Dolci, and B. Thorens. 2000. Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia: evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes*. 49:1635-42.
- Butler, A.E., J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R.A. Rizza, and P.C. Butler. 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 52:102-10.
- Campfield, L.A., F.J. Smith, Y. Guisez, R. Devos, and P. Burn. 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269:546-9.
- Canello, R., C. Henegar, N. Viguerie, S. Taleb, C. Poitou, C. Rouault, M. Coupaye, V. Pelloux, D. Hugol, J.L. Bouillot, A. Bouloumie, G. Barbatelli, S. Cinti, P.A. Svensson, G.S. Barsh, J.D. Zucker, A. Basdevant, D. Langin, and K. Clement. 2005. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. 54:2277-86.
- Cani, P.D., J. Amar, M.A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A.M. Neyrinck, F. Fava, K.M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmee, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrieres, J.F. Tanti, G.R. Gibson, L. Casteilla, N.M. Delzenne, M.C. Alessi, and R. Burcelin. 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 56:1761-72.
- Carpentier, J.L. 1994. Insulin receptor internalization: molecular mechanisms and physiopathological implications. *Diabetologia*. 37 Suppl 2:S117-24.
- Carruthers, A. 1990. Facilitated diffusion of glucose. *Physiol Rev*. 70:1135-76.

- Casey, P.H., R.H. Bradley, L. Whiteside-Mansell, K. Barrett, J.M. Gossett, and P.M. Simpson. 2011. Evolution of obesity in a low birth weight cohort. *J Perinatol*.
- Cawthorn, W.P., and J.K. Sethi. 2008. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett*. 582:117-31.
- Chen, D., and M.W. Wang. 2005. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 7:307-17.
- Chen, H., O. Charlat, L.A. Tartaglia, E.A. Woolf, X. Weng, S.J. Ellis, N.D. Lakey, J. Culpepper, K.J. Moore, R.E. Breitbart, G.M. Duyk, R.I. Tepper, and J.P. Morgenstern. 1996. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 84:491-5.
- Cinti, S. 2009. Transdifferentiation properties of adipocytes in the Adipose Organ. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Cinti, S., G. Mitchell, G. Barbatelli, I. Murano, E. Ceresi, E. Faloia, S. Wang, M. Fortier, A.S. Greenberg, and M.S. Obin. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 46:2347-55.
- Cobelli, C., M.P. Saccomani, E. Ferrannini, R.A. DeFronzo, R. Gelfand, and R. Bonadonna. 1989. A compartmental model to quantitate in vivo glucose transport in the human forearm. *Am J Physiol*. 257:E943-58.
- Coelho, M.S., K.L. Lopes, A. Freitas Rde, E.B. de Oliveira-Sales, C.T. Bergasmaschi, R.R. Campos, D.E. Casarini, A.K. Carmona, S. Araujo Mda, J.C. Heimann, and M.S. Dolnikoff. 2010. High sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue. *Regul Pept*. 162:61-7.
- Cook, S., P. Auinger, C. Li, and E.S. Ford. 2008. Metabolic syndrome rates in United States adolescents, from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002. *J Pediatr*. 152:165-70.
- Creely, S.J., P.G. McTernan, C.M. Kusminski, M. Fisher, N.F. Da Silva, M. Khanolkar, M. Evans, A.L. Harte, and S. Kumar. 2007. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 292:E740-7.
- Curat, C.A., A. Miranville, C. Sengenès, M. Diehl, C. Tonus, R. Busse, and A. Bouloumie. 2004. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*. 53:1285-92.
- Cusi, K., K. Maezono, A. Osman, M. Pendergrass, M.E. Patti, T. Pratipanawatr, R.A. DeFronzo, C.R. Kahn, and L.J. Mandarino. 2000. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest*. 105:311-20.
- Dardeno, T.A., S.H. Chou, H.S. Moon, J.P. Chamberland, C.G. Fiorenza, and C.S. Mantzoros. 2010. Leptin in human physiology and therapeutics. *Front Neuroendocrinol*. 31:377-93.
- de Ferranti, S., and D. Mozaffarian. 2008. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem*. 54:945-55.
- DeFronzo, R.A. 2004. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am*. 88:787-835, ix.
- DeFronzo, R.A., R. Gunnarsson, O. Bjorkman, M. Olsson, and J. Wahren. 1985. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 76:149-55.
- DeFronzo, R.A., J.D. Tobin, and R. Andres. 1979. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 237:E214-23.
- Diamond, F.B., Jr. 1998. Newer aspects of the pathophysiology, evaluation, and management of obesity in childhood. *Curr Opin Pediatr*. 10:422-7.

- Ding, G., Q. Qin, N. He, S.C. Francis-David, J. Hou, J. Liu, E. Ricks, and Q. Yang. 2007. Adiponectin and its receptors are expressed in adult ventricular cardiomyocytes and upregulated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Mol Cell Cardiol.* 43:73-84.
- Dourmashkin, J.T., G.Q. Chang, J.O. Hill, E.C. Gayles, S.K. Fried, and S.F. Leibowitz. 2006. Model for predicting and phenotyping at normal weight the long-term propensity for obesity in Sprague-Dawley rats. *Physiol Behav.* 87:666-78.
- Drake, A.J., P.J. Raubenheimer, D. Kerrigan, K.J. McInnes, J.R. Seckl, and B.R. Walker. 2010. Prenatal dexamethasone programs expression of genes in liver and adipose tissue and increased hepatic lipid accumulation but not obesity on a high-fat diet. *Endocrinology.* 151:1581-7.
- Drake, A.J., B.R. Walker, and J.R. Seckl. 2005. Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288:R34-8.
- Dubuc, P.U. 1976. The development of obesity, hyperinsulinemia, and hyperglycemia in ob/ob mice. *Metabolism.* 25:1567-74.
- Eckel, R.H., and R.M. Krauss. 1998. American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. AHA Nutrition Committee. *Circulation.* 97:2099-100.
- Egger, G.J., N. Vogels, and K.R. Westerterp. 2001. Estimating historical changes in physical activity levels. *Med J Aust.* 175:635-6.
- Elabd, C., C. Chiellini, M. Carmona, J. Galitzky, O. Cochet, R. Petersen, L. Penicaud, K. Kristiansen, A. Bouloumie, L. Casteilla, C. Dani, G. Ailhaud, and E.Z. Amri. 2009. Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells.* 27:2753-60.
- Eliasson, L., F. Abdulkader, M. Braun, J. Galvanovskis, M.B. Hoppa, and P. Rorsman. 2008. Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *J Physiol.* 586:3313-24.
- Etgen, G.J., and B.A. Oldham. 2000. Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state. *Metabolism.* 49:684-8.
- Faure, P., E. Rossini, N. Wiernsperger, M.J. Richard, A. Favier, and S. Halimi. 1999. An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats. *Diabetes.* 48:353-7.
- Finck, B.N., J.J. Lehman, T.C. Leone, M.J. Welch, M.J. Bennett, A. Kovacs, X. Han, R.W. Gross, R. Kozak, G.D. Lopaschuk, and D.P. Kelly. 2002. The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 109:121-30.
- Fleischman, A., S.E. Shoelson, R. Bernier, and A.B. Goldfine. 2008. Salsalate improves glycemia and inflammatory parameters in obese young adults. *Diabetes Care.* 31:289-94.
- Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 226:497-509.
- Ford, E.S. 2005. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care.* 28:2745-9.
- Fortino, M.A., Y.B. Lombardo, and A. Chicco. 2007. The reduction of dietary sucrose improves dyslipidemia, adiposity, and insulin secretion in an insulin-resistant rat model. *Nutrition.* 23:489-97.
- Friedman, J.M., R.L. Leibel, D.S. Siegel, J. Walsh, and N. Bahary. 1991. Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics.* 11:1054-62.
- Frontini, A., and S. Cinti. Distribution and development of brown adipocytes in the murine

- and human adipose organ. *Cell Metab.* 11:253-6.
- Fruhbeck, G. 2006. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J.* 393:7-20.
- Fruhbeck, G., M. Aguado, and J.A. Martinez. 1997. In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Commun.* 240:590-4.
- Fruhbeck, G., M. Garcia-Granero, and J.A. Martinez. 1998. Age-related differences in the thermogenic and ponderal effects following the administration of fragment peptides from the rat ob protein. *Regul Pept.* 73:83-7.
- Galic, S., J.S. Oakhill, and G.R. Steinberg. 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 316:129-39.
- Gesta, S., Y.H. Tseng, and C.R. Kahn. 2007. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell.* 131:242-56.
- Goossens, G.H. 2008. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav.* 94:206-18.
- Goralski, K.B., T.C. McCarthy, E.A. Hanniman, B.A. Zabel, E.C. Butcher, S.D. Parlee, S. Muruganandan, and C.J. Sinal. 2007. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem.* 282:28175-88.
- Graham, T.E., Q. Yang, M. Bluher, A. Hammarstedt, T.P. Ciaraldi, R.R. Henry, C.J. Wason, A. Oberbach, P.A. Jansson, U. Smith, and B.B. Kahn. 2006. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med.* 354:2552-63.
- Granton, P.V., C.J. Norley, J. Umoh, E.A. Turley, B.C. Frier, E.G. Noble, and D.W. Holdsworth. 2010. Rapid in vivo whole body composition of rats using cone beam muCT. *J Appl Physiol.* 109:1162-9.
- Gray, S., and J.K. Kim. 2011. New insights into insulin resistance in the diabetic heart. *Trends Endocrinol Metab.*
- Gregoire, F.M. 2001. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood).* 226:997-1002.
- Grundy, S.M. 2008. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:629-36.
- Gualillo, O., S. Eiras, F. Lago, C. Dieguez, and F.F. Casanueva. 2000. Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. *Life Sci.* 67:2433-41.
- Guilherme, A., J.V. Virbasius, V. Puri, and M.P. Czech. 2008. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:367-77.
- Gutt, M., C.L. Davis, S.B. Spitzer, M.M. Llabre, M. Kumar, E.M. Czarnecki, N. Schneiderman, J.S. Skyler, and J.B. Marks. 2000. Validation of the insulin sensitivity index (ISI(0,120)): comparison with other measures. *Diabetes Res Clin Pract.* 47:177-84.
- Haslam, D.W., and W.P. James. 2005. Obesity. *Lancet.* 366:1197-209.
- Henquin, J.C., D. Dufrane, and M. Nenquin. 2006. Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes.* 55:3470-7.
- Henry, C., F. Koumanov, C. Ghezzi, C. Morin, J.P. Mathieu, M. Vidal, J. de Leiris, M. Comet, and D. Fagret. 1997. [123I]-6-deoxy-6-iodo-D-glucose (6DIG): a potential tracer of glucose transport. *Nucl Med Biol.* 24:527-34.
- Henry, C., J.F. Tanti, T. Gremeaux, C. Morin, E. Van Obberghen, M. Comet, and Y. Le Marchand-Brustel. 1997. Characterization of 6-deoxy-6-iodo-D-glucose: a potential new tool to assess glucose transport. *Nucl Med Biol.* 24:99-104.
- Hosogai, N., A. Fukuhara, K. Oshima, Y. Miyata, S. Tanaka, K. Segawa, S. Furukawa, Y.

- Tochino, R. Komuro, M. Matsuda, and I. Shimomura. 2007. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 56:901-11.
- Hossain, P., B. Kawar, and M. El Nahas. 2007. Obesity and diabetes in the developing world—a growing challenge. *N Engl J Med*. 356:213-5.
- Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 259:87-91.
- Hu, E., P. Liang, and B.M. Spiegelman. 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*. 271:10697-703.
- Huan, J.N., J. Li, Y. Han, K. Chen, N. Wu, and A.Z. Zhao. 2003. Adipocyte-selective reduction of the leptin receptors induced by antisense RNA leads to increased adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance. *J Biol Chem*. 278:45638-50.
- InVS. 2007. Etude Nationale Nutrition Santé 2006. Institut de Veille Sanitaire (France).
- Isganaitis, E., and R.H. Lustig. 2005. Fast food, central nervous system insulin resistance, and obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25:2451-62.
- Ishiki, M., and A. Klip. 2005. Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology*. 146:5071-8.
- Jensen, M., and P. De Meyts. 2009. Molecular mechanisms of differential intracellular signaling from the insulin receptor. *Vitam Horm*. 80:51-75.
- Jimenez-Chillaron, J.C., M. Hernandez-Valencia, A. Lightner, R.R. Faucette, C. Reamer, R. Przybyla, S. Ruest, K. Barry, J.P. Otis, and M.E. Patti. 2006. Reductions in caloric intake and early postnatal growth prevent glucose intolerance and obesity associated with low birthweight. *Diabetologia*. 49:1974-84.
- Joost, H.G., and B. Thorens. 2001. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol*. 18:247-56.
- Judex, S., Y.K. Luu, E. Ozcivici, B. Adler, S. Lublinsky, and C.T. Rubin. 2010. Quantification of adiposity in small rodents using micro-CT. *Methods*. 50:14-9.
- Julia, C., B. Salanave, K. Binard, V. Deschamps, M. Vernay, and C. K. 2010. Biais de déclaration du poids et de la taille chez les adultes en France : effets sur l'estimation des prévalences du surpoids et de l'obésité. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*:69-72.
- Kadowaki, T., K. Hara, T. Yamauchi, Y. Terauchi, K. Tobe, and R. Nagai. 2003. Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med (Maywood)*. 228:1111-7.
- Kelley, D.E., B. Goodpaster, R.R. Wing, and J.A. Simoneau. 1999. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol*. 277:E1130-41.
- Kern, P.A., M. Saghizadeh, J.M. Ong, R.J. Bosch, R. Deem, and R.B. Simsolo. 1995. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest*. 95:2111-9.
- Kim, S.J., Y. Choi, Y.H. Choi, and T. Park. 2011. Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. *J Nutr Biochem*.
- Klish, W.J. 1995. Childhood obesity: pathophysiology and treatment. *Acta Paediatr Jpn*. 37:1-6.
- Kojima, H., M. Fujimiya, T. Terashima, H. Kimura, and L. Chan. 2006. Extrapancratic proinsulin/insulin-expressing cells in diabetes mellitus: is history repeating itself? *Endocr J*. 53:715-22.
- Koppen, A., and E. Kalkhoven. 2010. Brown vs white adipocytes: the PPAR γ coregulator story. *FEBS Lett*. 584:3250-9.

- Koumanov, F. 1995. Dérivés iodés de monosaccharides utilisables comme produits radiopharmaceutiques. Au nom de Cis Bio International. France, 1995; 95214.
- Koumanov, F., C. Henry, C. Ghezzi, G. Bignan, C. Morin, J.P. Mathieu, S. Hamant, M. Vidal, J. de Leiris, and M. Comet. 1996. Biological studies of analogues of glucose iodinated in positions 1, 2, or 3. *Nucl Med Biol.* 23:53-60.
- Kraegen, E.W., D.E. James, A.B. Jenkins, and D.J. Chisholm. 1985. Dose-response curves for in vivo insulin sensitivity in individual tissues in rats. *Am J Physiol.* 248:E353-62.
- Kraegen, E.W., A.B. Jenkins, L.H. Storlien, and D.J. Chisholm. 1990. Tracer studies of in vivo insulin action and glucose metabolism in individual peripheral tissues. *Horm Metab Res Suppl.* 24:41-8.
- Krause, M.P., Y. Liu, V. Vu, L. Chan, A. Xu, M.C. Riddell, G. Sweeney, and T.J. Hawke. 2008. Adiponectin is expressed by skeletal muscle fibers and influences muscle phenotype and function. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295:C203-12.
- Kretschmer, B.D., P. Schelling, N. Beier, C. Liebscher, S. Treutel, N. Kruger, H.P. Scholz, and A. Haus. 2005. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sci.* 76:1553-73.
- Krook, A., M. Bjornholm, D. Galuska, X.J. Jiang, R. Fahlman, M.G. Myers, Jr., H. Wallberg-Henriksson, and J.R. Zierath. 2000. Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 49:284-92.
- Krssak, M., K. Falk Petersen, A. Dresner, L. DiPietro, S.M. Vogel, D.L. Rothman, M. Roden, and G.I. Shulman. 1999. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia.* 42:113-6.
- Kuh, D., R. Hardy, N. Chaturvedi, and M.E. Wadsworth. 2002. Birth weight, childhood growth and abdominal obesity in adult life. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26:40-7.
- Lafontan, M. 2008. Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond).* 32 Suppl 7:S39-51.
- Lago, F., C. Dieguez, J. Gomez-Reino, and O. Gualillo. 2007. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18:313-25.
- Large, V., O. Peroni, D. Letexier, H. Ray, and M. Beylot. 2004. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* 30:294-309.
- Lavergne, F. 2003. Etude de la captation d'un analogue iodé du glucose, le 6-déoxy-6-iodo-D-glucose dans le muscle squelettique. Etude chez le rat, in vivo et ex vivo (DEA).
- Lebovitz, H.E. 1999. Type 2 diabetes: an overview. *Clin Chem.* 45:1339-45.
- Lee, Y.H., J. Giraud, R.J. Davis, and M.F. White. 2003. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem.* 278:2896-902.
- Lehrke, M., and M.A. Lazar. 2005. The many faces of PPARgamma. *Cell.* 123:993-9.
- Leibowitz, K.L., G.Q. Chang, P.S. Pamy, J.O. Hill, E.C. Gayles, and S.F. Leibowitz. 2007. Weight gain model in prepubertal rats: prediction and phenotyping of obesity-prone animals at normal body weight. *Int J Obes (Lond).* 31:1210-21.
- LeMagnen, J. 1974. Advances in studies in the physiological control and regulation of food intake. *Progress in Physiological Psychology.* 4.
- Leonard, B.L., R.N. Watson, K.M. Loomes, A.R. Phillips, and G.J. Cooper. 2005. Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabetol.* 42:162-70.
- Leuwer, M., I. Welters, G. Marx, A. Rushton, H. Bao, L. Hunter, and P. Trayhurn. 2009. Endotoxaemia leads to major increases in inflammatory adipokine gene expression in white adipose tissue of mice. *Pflugers Arch.* 457:731-41.

- Levin, B.E. 2010. Interaction of perinatal and pre-pubertal factors with genetic predisposition in the development of neural pathways involved in the regulation of energy homeostasis. *Brain Res.* 1350:10-7.
- Levin, B.E., A.A. Dunn-Meynell, B. Balkan, and R.E. Keeseey. 1997. Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol.* 273:R725-30.
- Levin, B.E., and E. Govek. 1998. Gestational obesity accentuates obesity in obesity-prone progeny. *Am J Physiol.* 275:R1374-9.
- Levin, B.E., J. Triscari, S. Hogan, and A.C. Sullivan. 1987. Resistance to diet-induced obesity: food intake, pancreatic sympathetic tone, and insulin. *Am J Physiol.* 252:R471-8.
- Levine, J.A. 2004. Nonexercise activity thermogenesis (NEAT): environment and biology. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286:E675-85.
- Ley, R.E., F. Backhed, P. Turnbaugh, C.A. Lozupone, R.D. Knight, and J.I. Gordon. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:11070-5.
- Lihn, A.S., J.M. Bruun, G. He, S.B. Pedersen, P.F. Jensen, and B. Richelsen. 2004. Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol Cell Endocrinol.* 219:9-15.
- Lim, S., K.R. Son, I.C. Song, H.S. Park, C.J. Jin, H.C. Jang, K.S. Park, Y.B. Kim, and H.K. Lee. 2009. Fat in liver/muscle correlates more strongly with insulin sensitivity in rats than abdominal fat. *Obesity (Silver Spring).* 17:188-95.
- Lofgren, P., I. Andersson, B. Adolffson, B.M. Leijonhufvud, K. Hertel, J. Hoffstedt, and P. Arner. 2005. Long-term prospective and controlled studies demonstrate adipose tissue hypercellularity and relative leptin deficiency in the postobese state. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:6207-13.
- Lonn, M., K. Mehlig, C. Bengtsson, and L. Lissner. 2010. Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women. *FASEB J.* 24:326-31.
- Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 117:175-84.
- Magnan, C., and A. Ktorza. 2005. Production and secretion of insulin by pancreatic beta-cell. *EMC-Endocrinologie*:241-264.
- Magnusson, I., D.L. Rothman, L.D. Katz, R.G. Shulman, and G.I. Shulman. 1992. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest.* 90:1323-7.
- Marcelin, G., and S. Chua, Jr. 2010. Contributions of adipocyte lipid metabolism to body fat content and implications for the treatment of obesity. *Curr Opin Pharmacol.* 10:588-93.
- Mari, A., G. Pacini, E. Murphy, B. Ludvik, and J.J. Nolan. 2001. A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care.* 24:539-48.
- Masek, J., and P. Fabry. 1959. High-fat diet and the development of obesity in albino rats. *Experientia.* 15:444-5.
- Mathieu, J.P., F. Riche, S. Coornaert, A. Bardy, G. Busquet, J. Godart, M. Comet, and M. Vidal. 1982. Marquage d'acides gras en position oméga par les isotopes de l'iode. *J.Biophys.Med.Nucl*:4.
- Matsuda, M., and R.A. DeFronzo. 1999. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care.* 22:1462-70.
- Matthews, V.B., T.L. Allen, S. Risis, M.H. Chan, D.C. Henstridge, N. Watson, L.A. Zaffino, J.R. Babb, J. Boon, P.J. Meikle, J.B. Jowett, M.J. Watt, J.O. Jansson, C.R. Bruce, and

- M.A. Febbraio. 2010. Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia*. 53:2431-41.
- Maury, E., and S.M. Brichard. 2010. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 314:1-16.
- Maury, E., L. Noel, R. Detry, and S.M. Brichard. 2009. In vitro hyperresponsiveness to tumor necrosis factor-alpha contributes to adipokine dysregulation in omental adipocytes of obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 94:1393-400.
- Mazen, I., M. El-Gammal, M. Abdel-Hamid, and K. Amr. 2009. A novel homozygous missense mutation of the leptin gene (N103K) in an obese Egyptian patient. *Mol Genet Metab*. 97:305-8.
- Melanson, K.J., T.J. Angelopoulos, V. Nguyen, L. Zukley, J. Lowndes, and J.M. Rippe. 2008. High-fructose corn syrup, energy intake, and appetite regulation. *Am J Clin Nutr*. 88:1738S-1744S.
- Mercer, J.G., and Z.A. Archer. 2008. Putting the diet back into diet-induced obesity: diet-induced hypothalamic gene expression. *Eur J Pharmacol*. 585:31-7.
- Minokoshi, Y., Y.B. Kim, O.D. Peroni, L.G. Fryer, C. Muller, D. Carling, and B.B. Kahn. 2002. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*. 415:339-43.
- Mokdad, A.H., E.S. Ford, B.A. Bowman, D.E. Nelson, M.M. Engelgau, F. Vinicor, and J.S. Marks. 2000. Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998. *Diabetes Care*. 23:1278-83.
- Montague, C.T., J.B. Prins, L. Sanders, J. Zhang, C.P. Sewter, J. Digby, C.D. Byrne, and S. O'Rahilly. 1998. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes*. 47:1384-91.
- Moran, T.H., and S. Bi. 2006. Hyperphagia and obesity in OLETF rats lacking CCK-1 receptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 361:1211-8.
- Morino, K., S. Neschen, S. Bilz, S. Sono, D. Tzirigotis, R.M. Reznick, I. Moore, Y. Nagai, V. Samuel, D. Sebastian, M. White, W. Philbrick, and G.I. Shulman. 2008. Muscle-specific IRS-1 Ser->Ala transgenic mice are protected from fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes*. 57:2644-51.
- Muniyappa, R., H. Chen, R. Muzumdar, F.H. Einstein, X. Yan, L.Q. Yue, N. Barzilai, and M.J. Quon. 2009. Comparison between Surrogate Indexes of Insulin Sensitivity/Resistance and Hyperinsulinemic Euglycemic Clamp Estimates in Rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Muniyappa, R., M. Montagnani, K.K. Koh, and M.J. Quon. 2007. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev*. 28:463-91.
- Muoio, D.M., G.L. Dohm, E.B. Tapscott, and R.A. Coleman. 1999. Leptin opposes insulin's effects on fatty acid partitioning in muscles isolated from obese ob/ob mice. *Am J Physiol*. 276:E913-21.
- Muoio, D.M., and C.B. Newgard. 2008. Fatty acid oxidation and insulin action: when less is more. *Diabetes*. 57:1455-6.
- Myers, M.G., Jr., R.L. Leibel, R.J. Seeley, and M.W. Schwartz. Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends Endocrinol Metab*. 21:643-51.
- Nawrocki, A.R., M.W. Rajala, E. Tomas, U.B. Pajvani, A.K. Saha, M.E. Trumbauer, Z. Pang, A.S. Chen, N.B. Ruderman, H. Chen, L. Rossetti, and P.E. Scherer. 2006. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem*. 281:2654-60.
- Novak, C.M., C.M. Kotz, and J.A. Levine. 2006. Central orexin sensitivity, physical activity, and obesity in diet-induced obese and diet-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 290:E396-403.

- O'Regan, D., C.J. Kenyon, J.R. Seckl, and M.C. Holmes. 2010. Environmental disturbance confounds prenatal glucocorticoid programming experiments in Wistar rats. *Lab Anim.* 44:199-205.
- ObEpi. 2009. Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité (France).
- Ohtake, T., I. Yokoyama, T. Watanabe, T. Momose, T. Serezawa, J. Nishikawa, and Y. Sasaki. 1995. Myocardial glucose metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus patients evaluated by FDG-PET. *J Nucl Med.* 36:456-63.
- Okuno, A., H. Tamemoto, K. Tobe, K. Ueki, Y. Mori, K. Iwamoto, K. Umesono, Y. Akanuma, T. Fujiwara, H. Horikoshi, Y. Yazaki, and T. Kadowaki. 1998. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest.* 101:1354-61.
- Olshansky, S.J., D.J. Passaro, R.C. Hershov, J. Layden, B.A. Carnes, J. Brody, L. Hayflick, R.N. Butler, D.B. Allison, and D.S. Ludwig. 2005. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med.* 352:1138-45.
- OMS. 2003. Obésité : prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale. In Série de Rapports techniques. OMS, Genève.
- Oron-Herman, M., Y. Kamari, E. Grossman, G. Yeager, E. Peleg, Z. Shabtay, A. Shamiss, and Y. Sharabi. 2008. Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *Am J Hypertens.* 21:1018-22.
- Ouchi, N., A. Higuchi, K. Ohashi, Y. Oshima, N. Gokce, R. Shibata, Y. Akasaki, A. Shimono, and K. Walsh. 2010. Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science.* 329:454-7.
- Ouchi, N., S. Kihara, Y. Arita, Y. Okamoto, K. Maeda, H. Kuriyama, K. Hotta, M. Nishida, M. Takahashi, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 2000. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation.* 102:1296-301.
- Ouchi, N., S. Kihara, T. Funahashi, T. Nakamura, M. Nishida, M. Kumada, Y. Okamoto, K. Ohashi, H. Nagaretani, K. Kishida, H. Nishizawa, N. Maeda, H. Kobayashi, H. Hiraoka, and Y. Matsuzawa. 2003. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation.* 107:671-4.
- Ouchi, N., J.L. Parker, J.J. Lugus, and K. Walsh. 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 11:85-97.
- Pacini, G., and A. Mari. 2003. Methods for clinical assessment of insulin sensitivity and beta-cell function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 17:305-22.
- Pagliassotti, M.J., D. Pan, P. Prach, T. Koppenhafer, L. Storlien, and J.O. Hill. 1995. Tissue oxidative capacity, fuel stores and skeletal muscle fatty acid composition in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Obes Res.* 3:459-64.
- Pajvani, U.B., M. Hawkins, T.P. Combs, M.W. Rajala, T. Doebber, J.P. Berger, J.A. Wagner, M. Wu, A. Knopps, A.H. Xiang, K.M. Utzschneider, S.E. Kahn, J.M. Olefsky, T.A. Buchanan, and P.E. Scherer. 2004. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem.* 279:12152-62.
- Panchal, S.K., and L. Brown. 2011. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol.* 2011:351982.
- Park, J.Y., and J.M. Daly. 2003. Evaluation of diabetes management software. *Diabetes Educ.* 29:255-62, 267.
- Park, S., Y.W. Kim, J.Y. Kim, E.C. Jang, K.O. Doh, and S.K. Lee. 2001. Effect of high fat diet on insulin resistance: dietary fat versus visceral fat mass. *J Korean Med Sci.* 16:386-90.

- Park, S.Y., Y.R. Cho, H.J. Kim, T. Higashimori, C. Danton, M.K. Lee, A. Dey, B. Rothermel, Y.B. Kim, A. Kalinowski, K.S. Russell, and J.K. Kim. 2005. Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice. *Diabetes*. 54:3530-40.
- Pasarica, M., O.R. Sereda, L.M. Redman, D.C. Albarado, D.T. Hymel, L.E. Roan, J.C. Rood, D.H. Burk, and S.R. Smith. 2009. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes*. 58:718-25.
- Patel, S.D., M.W. Rajala, L. Rossetti, P.E. Scherer, and L. Shapiro. 2004. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science*. 304:1154-8.
- Patsouris, D., P.P. Li, D. Thapar, J. Chapman, J.M. Olefsky, and J.G. Neels. 2008. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab*. 8:301-9.
- Patti, M.E., A.J. Butte, S. Crunkhorn, K. Cusi, R. Berria, S. Kashyap, Y. Miyazaki, I. Kohane, M. Costello, R. Saccone, E.J. Landaker, A.B. Goldfine, E. Mun, R. DeFronzo, J. Finlayson, C.R. Kahn, and L.J. Mandarino. 2003. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:8466-71.
- Pereira, L.O., and A.H. Lancha, Jr. 2004. Effect of insulin and contraction up on glucose transport in skeletal muscle. *Prog Biophys Mol Biol*. 84:1-27.
- Permana, P.A., C. Menge, and P.D. Reaven. 2006. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 341:507-14.
- Perret, P. 1999. Etudes biologiques de nouveaux analogues iodés du glucose et validation du 6-Déoxy-6-iodo-D-glucose comme traceur pur du transport du glucose in vivo. Université Joseph Fourier Grenoble.
- Perret, P., C. Ghezzi, J.P. Mathieu, C. Morin, and D. Fagret. 2003. Assessment of insulin sensitivity in vivo in control and diabetic mice with a radioactive tracer of glucose transport: [125I]-6-deoxy-6-iodo-D-glucose. *Diabetes Metab Res Rev*. 19:306-12.
- Perret, P., C. Ghezzi, L. Ogier, M. Abbadi, C. Morin, J.P. Mathieu, and D. Fagret. 2004. Biological studies of radiolabeled glucose analogues iodinated in positions 3, 4 or 6. *Nucl Med Biol*. 31:241-50.
- Perret, P., L. Slimani, A. Briat, D. Villemain, S. Halimi, J. Demongeot, D. Fagret, and C. Ghezzi. 2007. Assessment of insulin resistance in fructose-fed rats with 125I-6-deoxy-6-iodo-D-glucose, a new tracer of glucose transport. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 34:734-44.
- Perseghin, G., P. Scifo, F. De Cobelli, E. Pagliato, A. Battezzati, C. Arcelloni, A. Vanzulli, G. Testolin, G. Pozza, A. Del Maschio, and L. Luzi. 1999. Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a 1H-13C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes*. 48:1600-6.
- Pico, C., J. Sanchez, P. Oliver, and A. Palou. 2002. Leptin production by the stomach is up-regulated in obese (fa/fa) Zucker rats. *Obes Res*. 10:932-8.
- Pirola, L., A.M. Johnston, and E. Van Obberghen. 2004. Modulation of insulin action. *Diabetologia*. 47:170-84.
- Plagemann, A., T. Harder, M. Brunn, A. Harder, K. Roepke, M. Wittrock-Staar, T. Ziska, K. Schellong, E. Rodekamp, K. Melchior, and J.W. Dudenhausen. 2009. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol*. 587:4963-76.
- Prentice, A.M. 2005. Early influences on human energy regulation: thrifty genotypes and

- thrifty phenotypes. *Physiol Behav.* 86:640-5.
- Prentki, M., and C.J. Nolan. 2006. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 116:1802-12.
- Priego, T., J. Sanchez, A. Palou, and C. Pico. 2009. Effect of high-fat diet feeding on leptin receptor expression in white adipose tissue in rats: depot- and sex-related differential response. *Genes Nutr.* 4:151-6.
- Proud, C.G. 2006. Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochem Soc Trans.* 34:213-6.
- Qatanani, M., N.R. Szwegold, D.R. Greaves, R.S. Ahima, and M.A. Lazar. 2009. Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *J Clin Invest.* 119:531-9.
- Rains, J.L., and S.K. Jain. 2011. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med.* 50:567-75.
- Rasouli, N., and P.A. Kern. 2008. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 93:S64-73.
- Reaven, G.M. 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 37:1595-607.
- Reaven, G.M. 1995. The fourth musketeer--from Alexandre Dumas to Claude Bernard. *Diabetologia.* 38:3-13.
- Reaven, G.M. 2005. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva Med.* 47:201-10.
- Reaven, G.M. 2006. The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary? *Am J Clin Nutr.* 83:1237-47.
- Rees, D.A., and J.C. Alcolado. 2005. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 22:359-70.
- Ribot, J., A.M. Rodriguez, E. Rodriguez, and A. Palou. 2008. Adiponectin and resistin response in the onset of obesity in male and female rats. *Obesity (Silver Spring).* 16:723-30.
- Rising, R., I.T. Harper, A.M. Fontvielle, R.T. Ferraro, M. Spraul, and E. Ravussin. 1994. Determinants of total daily energy expenditure: variability in physical activity. *Am J Clin Nutr.* 59:800-4.
- Robertson, S.A., G.M. Leininger, and M.G. Myers, Jr. 2008. Molecular and neural mediators of leptin action. *Physiol Behav.* 94:637-42.
- Roden, M., and G.I. Shulman. 1999. Applications of NMR spectroscopy to study muscle glycogen metabolism in man. *Annu Rev Med.* 50:277-90.
- Roh, S.G., S.H. Song, K.C. Choi, K. Katoh, V. Wittamer, M. Parmentier, and S. Sasaki. 2007. Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 362:1013-8.
- Romestaing, C., M.A. Piquet, E. Bedu, V. Rouleau, M. Dautresme, I. Hourmand-Ollivier, C. Filippi, C. Duchamp, and B. Sibille. 2007. Long term highly saturated fat diet does not induce NASH in Wistar rats. *Nutr Metab (Lond).* 4:4.
- Rosen, E.D., and O.A. MacDougald. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:885-96.
- Rosen, E.D., P. Sarraf, A.E. Troy, G. Bradwin, K. Moore, D.S. Milstone, B.M. Spiegelman, and R.M. Mortensen. 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell.* 4:611-7.
- Rosenbaum, M., and R.L. Leibel. 1988. Pathophysiology of childhood obesity. *Adv Pediatr.* 35:73-137.
- Rothman, D.L., R.G. Shulman, and G.I. Shulman. 1991. N.m.r. studies of muscle glycogen synthesis in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Biochem Soc Trans.* 19:992-4.

- Ruiz, L., J.R. Colley, and P.J. Hamilton. 1971. Measurement of triceps skinfold thickness. An investigation of sources of variation. *Br J Prev Soc Med.* 25:165-7.
- Salans, L.B., S.W. Cushman, and R.E. Weismann. 1973. Studies of human adipose tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients. *J Clin Invest.* 52:929-41.
- Saltiel, A.R., and C.R. Kahn. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 414:799-806.
- Sampey, B.P., A.M. Vanhoose, H.M. Winfield, A.J. Freerman, M.J. Muehlbauer, P.T. Fueger, C.B. Newgard, and L. Makowski. 2011. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring).* 19:1109-17.
- Santure, M., M. Pitre, A. Marette, Y. Deshaies, C. Lemieux, R. Lariviere, A. Nadeau, and H. Bachelard. 2002. Induction of insulin resistance by high-sucrose feeding does not raise mean arterial blood pressure but impairs haemodynamic responses to insulin in rats. *Br J Pharmacol.* 137:185-96.
- Savage, D.B., K.F. Petersen, and G.I. Shulman. 2007. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev.* 87:507-20.
- Sclafani, A., and C.N. Berner. 1976. Influence of diet palatability on the meal taking behavior of hypothalamic hyperphagic and normal rats. *Physiol Behav.* 16:355-63.
- Sclafani, A., and D. Springer. 1976. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav.* 17:461-71.
- Sengenès, C., M. Berlan, I. De Glisezinski, M. Lafontan, and J. Galitzky. 2000. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J.* 14:1345-51.
- Sengenès, C., A. Miranville, K. Lolmede, C.A. Curat, and A. Bouloumie. 2007. The role of endothelial cells in inflamed adipose tissue. *J Intern Med.* 262:415-21.
- Shafat, A., B. Murray, and D. Rumsey. 2009. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite.* 52:34-8.
- Shapiro, A., W. Mu, C. Roncal, K.Y. Cheng, R.J. Johnson, and P.J. Scarpace. 2008. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 295:R1370-5.
- Shoelson, S.E., L. Herrero, and A. Naaz. 2007. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* 132:2169-80.
- Shoghi, K.I., R.J. Gropler, T. Sharp, P. Herrero, N. Fettig, Y. Su, M.S. Mitra, A. Kovacs, B.N. Finck, and M.J. Welch. 2008. Time course of alterations in myocardial glucose utilization in the Zucker diabetic fatty rat with correlation to gene expression of glucose transporters: a small-animal PET investigation. *J Nucl Med.* 49:1320-7.
- Siersbaek, R., R. Nielsen, and S. Mandrup. 2010. PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett.* 584:3242-9.
- Skurk, T., C. Alberti-Huber, C. Herder, and H. Hauner. 2007. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 92:1023-33.
- Soonthornpun, S., W. Setasuban, A. Thamprasit, W. Chayanunnukul, C. Rattarasarn, and A. Geater. 2003. Novel insulin sensitivity index derived from oral glucose tolerance test. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:1019-23.
- Soria, A., A. Chicco, M. Eugenia D'Alessandro, A. Rossi, and Y.B. Lombardo. 2002. Dietary fish oil reverse epididymal tissue adiposity, cell hypertrophy and insulin resistance in dyslipemic sucrose fed rat model small star, filled. *J Nutr Biochem.* 13:209-218.
- Spalding, K.L., E. Arner, P.O. Westermark, S. Bernard, B.A. Buchholz, O. Bergmann, L. Blomqvist, J. Hoffstedt, E. Naslund, T. Britton, H. Concha, M. Hassan, M. Ryden, J. Frisen, and P. Arner. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* 453:783-7.

- Speakman, J.R. 2006. Thrifty genes for obesity and the metabolic syndrome--time to call off the search? *Diab Vasc Dis Res.* 3:7-11.
- Stanley, P.E. 1997. Commercially available luminometers and imaging devices for low-light level measurements and kits and reagents utilizing bioluminescence or chemiluminescence: survey update 5. *J Biolumin Chemilumin.* 12:61-78.
- Stein, C.J., and G.A. Colditz. 2004. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:2522-5.
- Steiner, D.F., S.Y. Park, J. Stoy, L.H. Philipson, and G.I. Bell. 2009. A brief perspective on insulin production. *Diabetes Obes Metab.* 11 Suppl 4:189-96.
- Stephens, D.N. 1980. Does the Lee obesity index measure general obesity? *Physiol Behav.* 25:313-5.
- Steppan, C.M., J. Wang, E.L. Whiteman, M.J. Birnbaum, and M.A. Lazar. 2005. Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol.* 25:1569-75.
- Storlien, L.H., J.A. Higgins, T.C. Thomas, M.A. Brown, H.Q. Wang, X.F. Huang, and P.L. Else. 2000. Diet composition and insulin action in animal models. *Br J Nutr.* 83 Suppl 1:S85-90.
- Storlien, L.H., A.B. Jenkins, D.J. Chisholm, W.S. Pascoe, S. Khouri, and E.W. Kraegen. 1991. 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.* 40:280-9.
- Stuart, C.A., M.E. Howell, Y. Zhang, and D. Yin. 2009. Insulin-stimulated translocation of glucose transporter (GLUT) 12 parallels that of GLUT4 in normal muscle. *J Clin Endocrinol Metab.* 94:3535-42.
- Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haeften. 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 365:1333-46.
- Stumvoll, M., A. Mitrakou, W. Pimenta, T. Jenssen, H. Yki-Jarvinen, T. Van Haeften, W. Renn, and J. Gerich. 2000. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care.* 23:295-301.
- Suckale, J., and M. Solimena. 2010. The insulin secretory granule as a signaling hub. *Trends Endocrinol Metab.* 21:599-609.
- Suganami, T., K. Tanimoto-Koyama, J. Nishida, M. Itoh, X. Yuan, S. Mizuarai, H. Kotani, S. Yamaoka, K. Miyake, S. Aoe, Y. Kamei, and Y. Ogawa. 2007. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:84-91.
- Sumiyoshi, M., M. Sakanaka, and Y. Kimura. 2006. Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. *J Nutr.* 136:582-7.
- Sun, S.S., R. Liang, T.T. Huang, S.R. Daniels, S. Arslanian, K. Liu, G.D. Grave, and R.M. Siervogel. 2008. Childhood obesity predicts adult metabolic syndrome: the Fels Longitudinal Study. *J Pediatr.* 152:191-200.
- Sutherland, L.N., L.C. Capozzi, N.J. Turchinsky, R.C. Bell, and D.C. Wright. 2008. Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295:E1076-83.
- Takahashi, M., Y. Takahashi, K. Takahashi, F.N. Zolotaryov, K.S. Hong, R. Kitazawa, K. Iida, Y. Okimura, H. Kaji, S. Kitazawa, M. Kasuga, and K. Chihara. 2008. Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* 582:573-8.
- Tam, L.S., B. Tomlinson, T.T. Chu, T.K. Li, and E.K. Li. 2007. Impact of TNF inhibition on insulin resistance and lipids levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clin*

- Rheumatol.* 26:1495-8.
- Tappy, L., K.A. Le, C. Tran, and N. Paquot. 2010. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition.* 26:1044-9.
- Teff, K.L., S.S. Elliott, M. Tschop, T.J. Kieffer, D. Rader, M. Heiman, R.R. Townsend, N.L. Keim, D. D'Alessio, and P.J. Havel. 2004. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:2963-72.
- Tian, R., and E.D. Abel. 2001. Responses of GLUT4-deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis. *Circulation.* 103:2961-6.
- Tilg, H., and A.R. Moschen. 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 6:772-83.
- Tomas, E., T.S. Tsao, A.K. Saha, H.E. Murrey, C. Zhang Cc, S.I. Itani, H.F. Lodish, and N.B. Ruderman. 2002. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:16309-13.
- Tontonoz, P., and B.M. Spiegelman. 2008. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem.* 77:289-312.
- Tran, L.T., V.G. Yuen, and J.H. McNeill. 2009. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem.* 332:145-59.
- Trayhurn, P., B. Wang, and I.S. Wood. 2008. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr.* 100:227-35.
- Trayhurn, P., and I.S. Wood. 2004. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 92:347-55.
- Tripathy, D., P. Almgren, T. Tuomi, and L. Groop. 2004. Contribution of insulin-stimulated glucose uptake and basal hepatic insulin sensitivity to surrogate measures of insulin sensitivity. *Diabetes Care.* 27:2204-10.
- Turcotte, L.P., J.R. Swenberger, M. Zavitz Tucker, and A.J. Yee. 2001. Increased fatty acid uptake and altered fatty acid metabolism in insulin-resistant muscle of obese Zucker rats. *Diabetes.* 50:1389-96.
- Turnbaugh, P.J., R.E. Ley, M.A. Mahowald, V. Magrini, E.R. Mardis, and J.I. Gordon. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 444:1027-31.
- Uysal, K.T., S.M. Wiesbrock, M.W. Marino, and G.S. Hotamisligil. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature.* 389:610-4.
- Vazquez-Vela, M.E., N. Torres, and A.R. Tovar. 2008. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res.* 39:715-28.
- Vincent, M.A., L.H. Clerk, J.R. Lindner, W.J. Price, L.A. Jahn, H. Leong-Poi, and E.J. Barrett. 2006. Mixed meal and light exercise each recruit muscle capillaries in healthy humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290:E1191-7.
- Visser, M., L.M. Bouter, G.M. McQuillan, M.H. Wener, and T.B. Harris. 1999. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA.* 282:2131-5.
- Vitola, B.E., S. Deivanayagam, R.I. Stein, B.S. Mohammed, F. Magkos, E.P. Kirk, and S. Klein. 2009. Weight loss reduces liver fat and improves hepatic and skeletal muscle insulin sensitivity in obese adolescents. *Obesity (Silver Spring).* 17:1744-8.
- Vogt, C., H. Ardehali, P. Iozzo, H. Yki-Jarvinen, J. Koval, K. Maezono, M. Pendergrass, R. Printz, D. Granner, R. DeFronzo, and L. Mandarino. 2000. Regulation of hexokinase II expression in human skeletal muscle in vivo. *Metabolism.* 49:814-8.
- Vollaire, J. 2010. Développement d'une nouvelle technique de mesure de la résistance à

- l'insuline avec un traceur du transport du glucose, le [125I]-6-Déoxy-6-Iodo-D-glucose : étude réalisée chez le rat. Université de Grenoble.
- Wajchenberg, B.L. 2000. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 21:697-738.
- Walder, K., A. Filippis, S. Clark, P. Zimmet, and G.R. Collier. 1997. Leptin inhibits insulin binding in isolated rat adipocytes. *J Endocrinol.* 155:R5-7.
- Wang, C.C., M.L. Goalstone, and B. Draznin. 2004. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes.* 53:2735-40.
- Wang, Y., M.A. Beydoun, L. Liang, B. Caballero, and S.K. Kumanyika. 2008. Will all Americans become overweight or obese? estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. *Obesity (Silver Spring).* 16:2323-30.
- Wang, Y., W.B. Lau, E. Gao, L. Tao, Y. Yuan, R. Li, X. Wang, W.J. Koch, and X.L. Ma. 2010. Cardiomyocyte-derived adiponectin is biologically active in protecting against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298:E663-70.
- Wang, Z.V., and P.E. Scherer. 2008. Adiponectin, cardiovascular function, and hypertension. *Hypertension.* 51:8-14.
- Wassenaar, W., and C.H. Tator. 1973. Glucose analogues as potential agents for brain tumour diagnosis and treatment. *Trans Am Neurol Assoc.* 98:43-8.
- Weir, G.C., and S. Bonner-Weir. 2004. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes.* 53 Suppl 3:S16-21.
- Weisberg, S.P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, and A.W. Ferrante, Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 112:1796-808.
- Weiss, R., J. Dziura, T.S. Burgert, W.V. Tamborlane, S.E. Taksali, C.W. Yeckel, K. Allen, M. Lopes, M. Savoye, J. Morrison, R.S. Sherwin, and S. Caprio. 2004. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med.* 350:2362-74.
- West, D.B., and B. York. 1998. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am J Clin Nutr.* 67:505S-512S.
- Westerterp-Plantenga, M.S., W.H. Saris, C.J. Hukshorn, and L.A. Campfield. 2001. Effects of weekly administration of pegylated recombinant human OB protein on appetite profile and energy metabolism in obese men. *Am J Clin Nutr.* 74:426-34.
- Weyer, C., T. Funahashi, S. Tanaka, K. Hotta, Y. Matsuzawa, R.E. Pratley, and P.A. Tataranni. 2001. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:1930-5.
- Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree, and H. King. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 27:1047-53.
- Woo, M., and M.E. Patti. 2008. Diabetes risk begins in utero. *Cell Metab.* 8:5-7.
- Wright, J.J., J. Kim, J. Buchanan, S. Boudina, S. Sena, K. Bakirtzi, O. Ilkun, H.A. Theobald, R.C. Cooksey, K.V. Kandror, and E.D. Abel. 2009. Mechanisms for increased myocardial fatty acid utilization following short-term high-fat feeding. *Cardiovasc Res.* 82:351-60.
- Xu, H., D. Wilcox, P. Nguyen, M. Voorbach, T. Suhar, S.J. Morgan, W.F. An, L. Ge, J. Green, Z. Wu, R.E. Gimeno, R. Reilly, P.B. Jacobson, C.A. Collins, K. Landschulz, and T. Surowy. 2006. Hepatic knockdown of mitochondrial GPAT1 in ob/ob mice improves metabolic profile. *Biochem Biophys Res Commun.* 349:439-48.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B.B. Kahn, and T. Kadowaki. 2002. Adiponectin stimulates

- glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 8:1288-95.
- Yang, Q., T.E. Graham, N. Mody, F. Preitner, O.D. Peroni, J.M. Zabolotny, K. Kotani, L. Quadro, and B.B. Kahn. 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature.* 436:356-62.
- Yang, R.Z., M.J. Lee, H. Hu, J. Pray, H.B. Wu, B.C. Hansen, A.R. Shuldiner, S.K. Fried, J.C. McLenithan, and D.W. Gong. 2006. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290:E1253-61.
- Ye, J., Z. Gao, J. Yin, and Q. He. 2007. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293:E1118-28.
- Youngren, J.F. 2007. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci.* 64:873-91.
- Zhang, L., W. Keung, V. Samokhvalov, W. Wang, and G.D. Lopaschuk. 2010. Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1801:1-22.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J.M. Friedman. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372:425-32.
- Zhu, Y., C. Qi, J.R. Korenberg, X.N. Chen, D. Noya, M.S. Rao, and J.K. Reddy. 1995. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:7921-5.
- Zierath, J.R., J.N. Livingston, A. Thorne, J. Bolinder, S. Reynisdottir, F. Lonqvist, and P. Arner. 1998. Regional difference in insulin inhibition of non-esterified fatty acid release from human adipocytes: relation to insulin receptor phosphorylation and intracellular signalling through the insulin receptor substrate-1 pathway. *Diabetologia.* 41:1343-54.
- Zimmermann, R., J.G. Strauss, G. Haemmerle, G. Schoiswohl, R. Birner-Gruenberger, M. Riederer, A. Lass, G. Neuberger, F. Eisenhaber, A. Hermetter, and R. Zechner. 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science.* 306:1383-6.
- Zimmet, P., G. Alberti, F. Kaufman, N. Tajima, M. Silink, S. Arslanian, G. Wong, P. Bennett, J. Shaw, and S. Caprio. 2007. The metabolic syndrome in children and adolescents. *Lancet.* 369:2059-61.
- Zucker, T.F., and L.M. Zucker. 1963. Fat accretion and growth in the rat. *J Nutr.* 80:6-19.

Résumé

Les prévalences de l'obésité et du diabète de type 2 sont en nette augmentation et ces deux pathologies sont étroitement liées. Le diabète de type 2 est caractérisé par une incapacité des cellules β du pancréas à sécréter de l'insuline et par un défaut de transport du glucose en réponse à l'insuline dans les tissus insulino-sensibles (ou insulino-résistance, IR) : le muscle squelettique, le cœur et le tissu adipeux. L'utilisation d'un traceur du transport du glucose marqué à l'iode radioactif, le 6DIG, permet d'évaluer l'IR de façon non-invasive dans le cœur et le muscle squelettique. L'objectif de ce travail était d'étudier le développement éventuel de l'IR chez des animaux rendus obèses par des régimes enrichis en lipides et/ou en glucides. Aucune IR n'a été mise en évidence au cours des trois mois d'expérience dans le modèle animal d'obésité induite par régime alimentaire. Des études visant à optimiser le traitement des données obtenues avec le 6DIG ont également été réalisées. Celles-ci nous ont permis de montrer : 1- une amélioration de la reproductibilité de la méthode de mesure de l'IR cardiaque par utilisation de l'Analyse Factorielle des Séquences d'Images Médicales, 2- la faisabilité d'une diminution de la durée des acquisitions de la radioactivité pour la mesure de l'IR musculaire, 3- la nécessité de réaliser des prélèvements sanguins pour l'utilisation de la modélisation mathématique afin de traiter les données.

Mots-clés : Obésité – Insulino-résistance – Régimes enrichis en graisses et en sucres – Imagerie nucléaire – 6DIG

Abstract

Prevalence of obesity and type 2 diabetes are in constant augmentation worldwide and these pathologies are closely associated. Type 2 diabetes represents a combination of pancreatic β -cell dysfunction and insulin-regulated glucose uptake impairment in insulin-sensitive tissues: heart, skeletal muscles and adipose tissues. The novel tracer of glucose transport [^{123}I]-6DIG allows the non invasive determination of insulin resistance (IR) in the heart and skeletal muscle. The aim of this study was to evaluate the development of IR in rats fed a high-fat and/or high-carbohydrate diets. No insulin resistance was observed during the 3 month of experimentation in our animal model. Study to optimize 6DIG obtained data reduction was also made. The results show: (1) improvement of the method data reduction reproducibility in the heart with Factor Analysis of Medical Image Sequences technique, (2) a possibility to reduce radioactivity acquisition time to muscle IR measurement, (3) the need of blood sample to use mathematical modeling in the data reduction.

Key-words : Obesity – Insulin resistance – High-fat/High carbohydrate diets – Nuclear imaging – 6DIG