



Impact du taux de stéroïdes circulants sur la distribution du tissu adipeux et les altérations métaboliques chez la femme

Mémoire

Geneviève B. Marchand

Maîtrise en nutrition - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Geneviève B. Marchand, 2018

Impact du taux de stéroïdes circulants sur la distribution du tissu adipeux et les altérations métaboliques chez la femme

Mémoire

Geneviève B Marchand

Sous la direction de

André Tchernof (directeur de recherche)

Résumé

La physiopathologie de l'obésité est un phénomène complexe qui peut amener plusieurs complications métaboliques chroniques tels que le diabète de type II et la dyslipidémie. Les dépôts de tissus adipeux n'étant pas morphologiquement homogènes, une accumulation préférentielle au niveau viscéral est associée davantage aux maladies chroniques que l'accumulation sous-cutanée. Parallèlement à ce phénomène, le dimorphisme sexuel chez l'humain témoigne de l'importance des hormones sexuelles dans la distribution des graisses. Ce phénomène semble d'autant plus important chez la femme, chez qui la ménopause entraîne une redistribution des graisses au niveau abdominal. L'objectif de ce mémoire est donc de définir la relation entre les niveaux circulants d'hormones stéroïdiennes et la distribution des graisses chez la femme, ainsi que leurs liens avec les facteurs de risque cardiométabolique. Nous avons d'abord étudié la relation entre les estrogènes circulants et l'adiposité ainsi que les paramètres métaboliques dans une cohorte de femmes ménopausées. Nous avons observé que les estrogènes étaient positivement associés à plusieurs altérations métaboliques tels que la résistance à l'insuline, mais que ce phénomène s'expliquait par la variation concomitante de masse grasse totale. Par la suite, nous avons examiné la relation des androgènes ainsi que leurs métabolites et précurseurs avec la distribution des graisses et la fonction du tissu adipeux chez la femme préménopausée. Nous avons observé que plusieurs androstanes étaient associés négativement à l'adiposité totale. De plus, certains stéroïdes, particulièrement la prégénolone, étaient associés négativement avec la dysfonction du tissu adipeux. En somme, nos résultats pointent vers l'importance du tissu adipeux dans la régulation de la concentration d'hormones sexuelles plasmatiques.

Abstract

The physiopathology of obesity is a complex phenomenon resulting in many metabolic complications like type 2 diabetes and dyslipidemia. Adipose tissue depots from various locations are morphologically heterogeneous and a preferential accumulation in the visceral area is more closely associated with metabolic disorders than subcutaneous fat accumulation. The sex dimorphism observed in human body fat distribution supports important role for sex hormones in this phenomenon. The goal of this master thesis was to elucidate the relation between plasma steroid hormone levels, adipose tissue distribution and cardiometabolic risk variables in women. First, we studied the relation between circulating estrogens and adiposity as well as metabolic parameters in menopausal women. We observed positive associations between estrogens and metabolic alterations such as insulin resistance, but these associations were explained by the concomitant variation of total body fat mass. Second, we investigated the associations between androgens, their metabolites and precursors, with adipose tissue distribution and function in premenopausal women. We observed that many androstanes were negatively related with total adiposity. Moreover, some steroids, especially pregnenolone were negatively associated with markers of adipose tissue dysfunction. Together, our results point toward the importance of adipose tissue in the regulation of circulating sex hormones.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations et des sigles	x
Remerciements.....	xiv
Avant-propos.....	xv
Introduction	1
1. L'obésité chez l'humain.....	1
1.1 Définition et prévalence de l'obésité.....	1
1.2 Distribution des graisses	1
1.2.1 Classification des tissus adipeux	1
1.2.2 Considérations méthodologiques.....	2
1.3 Dimorphisme sexuel chez l'humain	3
1.3.1 L'obésité viscérale.....	5
2. Estrogènes circulants chez l'humain.....	13
2.1 Estrogènes circulants chez la femme	14
2.1.1 Estrogènes et adiposité - femmes préménopausées.....	14
2.1.2 Changements hormonaux associés à la ménopause	15
2.1.3 Estrogènes endogènes chez la femme ménopausée.....	16
2.1.4 Thérapie de remplacement hormonal	18
2.3 Estrogènes et métabolisme.....	18
2.3.1 Prise alimentaire et gain de masse grasse	19
2.3.2 Lipolyse et lipogenèse.....	19
2.3.3 Adipogenèse	20
2.3.4 Sensibilité à l'insuline	21
2.3.5 Adipokines.....	21
2.3.6 Cytokines inflammatoires.....	22
3. Androgènes circulants chez l'humain	23

3.1 Androgènes circulants chez l'homme	25
3.2 Androgènes circulants chez la femme	26
3.3 Androgènes et métabolisme	28
3.3.1 Lipolyse et lipogenèse	28
3.3.2 Adipogenèse	29
3.3.3 Adipokines	30
Objectifs et hypothèses	32
Objectif général	32
Objectifs spécifiques	32
Chapitre 1 : L'impact des estrogènes circulants sur la masse adipeuse et sur les altérations métaboliques chez la femme ménopausée	33
Résumé	34
Abstract	36
Introduction	37
Subjects and methods	39
Results	44
Discussion	47
Acknowledgements	50
Funding	50
Disclosures	50
Abbreviations	50
References	52
Figure headings	59
Chapitre 2 : Les taux de stéroïdes circulants et le phénotype du tissu adipeux chez la femme préménopausée	65
Résumé	66
Abstract	68
Introduction	69
Subjects and methods	71
Results	75
Discussion	77
Acknowledgements	80
Funding	80
Disclosure statement	81

Abbreviations	81
References	82
Figure headings	86
Conclusion	92
Bibliographie	97

Liste des tableaux

Introduction:

Tableau 1: Composantes du syndrome métabolique, adapté du rapport du NCEP (68).....	11
---	----

Chapitre 1 :

Table 1. Study sample characteristics (n=101).....	56
Table 2. Pairwise correlations between levels of steroids or steroid metabolites and age, time since menopause, adiposity measurements as well as metabolic parameters (n=101)	57
Table 3. Multivariate regression models establishing the contribution of each estrogen and body fat percentage to the variance in metabolic parameters	58

Chapitre 2 :

Table 1. Population characteristics (n=42).....	89
Table 2. Pairwise correlation coefficients between circulating levels of androgens, androgen precursors or metabolites and adiposity measurements.....	90
Table 3. Pairwise correlation coefficients between circulating levels of adrenal steroid precursors, mineralocorticoids or glucocorticoids and adiposity measurements	91

Liste des figures

Introduction :

Figure 1 : Différence des aires de tissus adipeux mesurée par tomodensitométrie (TDM) à la région des vertèbres L4-L5 chez deux individus différents montrant une masse grasse totale semblable. Figure tirée de Tchernof et collaborateurs (6)..... 2

Figure 2 : Différence morphologique entre un tissu adipeux sain hyperplasique (gauche) et un tissu adipeux hypertrophique (droite). Figure tirée de Choe et collaborateurs (32). 7

Schéma de chemins de conversions enzymatiques stéroïdiens dans les tissus adipeux humains. Tirée de Tchernof et collaborateurs (94). 24

Chapitre 1 :

Figure 1.....	61
Figure 2.....	62
Figure 3.....	63
Figure 4.....	64

Chapitre 2 :

Figure 1.....	87
Figure 2.....	88

Liste des abréviations et des sigles

$\Delta 4$: Androstènedione

ADT : Androstérone

AGL : Acides gras libres

CRP : Protéine C-réactive

CT : Circonférence de la taille

DHT : Dihydrotestostérone

E1 : Estrone

E1-S : Estrone-sulfate

E2 : Estradiol

E3 : Estriol

ECLIA : Immunoessai par électrochimiluminescence

ECMS : Enquête Canadienne sur les Mesures de la Santé

ELISA : Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

ER : Récepteur des estrogènes

DHEA : Déhydroépiandrostérone

DHEA-S : Déhydroépiandrostérone-sulfate

DXA : Absorptiométrie biphotonique à rayons X

FAI : Indice d'androgène libre

GLUT4 : Transporteur de glucose 4

GPER : Récepteur estrogénique couplé à la protéine G 1

HDL : Lipoprotéines de haute densité

HSL : Lipase hormonosensible

IC : Intervalle de confiance

IL-6 : Interleukine 6

IL-8 : Interleukine 8

IMC : Indice de masse corporelle

IRM : Imagerie par résonance magnétique

IRS-1 : *Insulin receptor substrate 1*

LDL : Lipoprotéines de faible densité

LH : Lipase hépatique

LPL : Lipoprotéine lipase

MCP-1 : *Monocyte chemoattractant protein-1*

MMPs : Métalloprotéases matricielles

NCEP : National Cholesterol Education Program

NIH : National Institute of Health

NF-κB : Nuclear factor Kappa-B

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PPARγ : Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes γ

RBP4 : *Retinol binding protein 4*

RIA : Dosage radio-immunologique

RR : Risque relatif

RTH : Ratio taille/hanche

SHBG : Globuline liant les hormones sexuelles

SOPK : Syndrome des ovaires polykystiques

T : Testostérone

TDM : Tomodensitométrie

TGL : Triglycérides lipase

TNF-α : Facteur de nécrose tumorale alpha

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VLDL : Lipoprotéines à très faible densité

ZAC1 : *Zinc-finger protein transcription factor*

*Tu peux t'élever davantage encore,
car tu as voulu apprendre.
- Richard Bach*

Remerciements

J'aimerais chaleureusement remercier certaines personnes qui ont contribué substantiellement de manière physique, intellectuelle ou psychologique à ma maîtrise. J'aimerais tout d'abord remercier mon mentor et directeur de recherche, Dr André Tchernof, pour son temps, sa compréhension et son soutien exceptionnel durant ces deux dernières années, mais aussi durant plusieurs étés comme stagiaire de recherche. Son dévouement et sa passion pour la recherche, ainsi que son implication dans la formation des étudiants seront toujours pour moi une grande inspiration pour ma future carrière professionnelle. J'aimerais aussi remercier Sofia Laforest, étudiante au doctorat, pour son aide précieuse en statistiques et pour ses judicieux conseils durant la rédaction de ce mémoire. J'aimerais remercier Jennifer Labrecque, étudiante à la maîtrise et nutritionniste, pour son support moral et son aide tout au long de ma maîtrise. J'aimerais remercier Mélanie Nadeau et Mélissa Pelletier, deux professionnelles de recherche, pour leur temps et leur dévouement à l'équipe de recherche ainsi qu'aux étudiants. J'aimerais remercier ma mère, Lise Brochu, pour son support infini dans mes études et dans ma vie personnelle, son écoute intarissable et son positivisme qui m'ont permis de me rendre ici aujourd'hui. Finalement, j'aimerais remercier mon père, Mario Marchand, pour le modèle exceptionnel de chercheur passionné, de travail acharné et de dévotion envers ses étudiants. Il est et restera toujours mon plus grand modèle.

Avant-propos

Au cours de ma maîtrise, j'ai eu l'opportunité de participer à de nombreux projets. Notamment, j'ai pu effectuer des analyses avec les données récoltées d'une cohorte de femmes ménopausées, en collaboration avec Dre Simone Lemieux. Ces analyses m'ont permis d'écrire un article comme première auteure, s'intitulant « *Increased body fat mass explains the positive association between circulating estradiol and insulin resistance in postmenopausal women* ». Cet article compose le chapitre 1 de ce mémoire. Il est disponible sur *Pubmed* sous forme électronique depuis le 5 décembre 2017 et sera publié sous peu dans le *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*. Parmi les coauteurs de cet article, j'aimerais remercier l'endocrinologue Anne-Marie Carreau pour sa contribution à l'interprétation des données, ses conseils judicieux pour la rédaction de l'article et son expertise précieuse. J'aimerais aussi remercier Les Drs Jean Bergeron et John S Weisnagel, qui ont participé à la mise en oeuvre et à l'élaboration du projet ainsi qu'à la correction du premier jet de cet article. De même, j'aimerais remercier l'endocrinologue Fernand Labrie pour la génération des mesures de stéroïdes circulants par des méthodes de fines pointes ainsi que pour sa contribution dans la correction du manuscrit. Je remercie la Dre Simone Lemieux d'avoir sollicité mon aide dans ce projet et d'avoir participé à la correction du manuscrit. J'aimerais finalement remercier mon directeur Dr André Tchernof pour son encadrement tout au long de ce projet.

Comme second projet, j'ai contribué à l'analyse de données récoltées dans une cohorte de femmes subissant une chirurgie gynécologique au Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL). Ce projet a mené à l'élaboration et à la rédaction d'un article original intitulé « *Circulating steroid levels as correlates of adipose tissue phenotype in premenopausal women* » dont je suis la première auteure. Cet article a été resoumis après révisions dans le journal *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* le 2 mars 2018 et est disponible en ligne depuis le 11 mai 2018. Ce projet a pu être réalisé grâce à la collaboration de plusieurs chercheurs, professionnels et étudiants, dont l'endocrinologue Anne-Marie Carreau, qui a

encore une fois mis à contribution son expertise dans l'interprétation des données. De même, Sofia Laforest, candidate au titre de doctorat, a contribué à l'élaboration de ce manuscrit en me conseillant judicieusement pour les analyses statistiques, en effectuant certaines mesures en laboratoire et en révisant le manuscrit. La participation de la Dre Julie-Anne Côté, nutritionniste et ancienne étudiante du laboratoire du Dr Tchernof, est importante pour cet article, grâce à la mesure de certaines données en laboratoire ainsi que sa contribution dans la révision de l'article. J'aimerais aussi remercier les chirurgiens du CHUL, qui ont participé à cette étude en prélevant les échantillons de tissus adipeux des participantes, ainsi que Dre Katherine Cianflone pour sa participation dans l'élaboration de certaines mesures et la révision du manuscrit. J'aimerais aussi remercier nos collaborateurs à Munich, les Drs Cornelia Perhn et Jerzy Adamski, qui ont mesuré, avec grande précision, des valeurs de stéroïdes plasmatiques de notre cohorte. Finalement, je veux encore remercier le Dr André Tchernof pour appui et sa supervision durant la réalisation de ces analyses et la conception de ce manuscrit.

Introduction

1. L'obésité chez l'humain

1.1 Définition et prévalence de l'obésité

Le surpoids et l'obésité sont définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une accumulation anormale, voire excessive, de graisse pouvant entraîner un risque pour la santé (1). L'indice de masse corporelle (IMC) est un outil fréquemment utilisé pour estimer le niveau d'obésité par les professionnels de la santé. Cet indice est obtenu en divisant la masse en kilogrammes par la taille en mètres au carré (2). Le surplus de poids est défini par un IMC supérieur ou égal à 25 kg/m², alors que l'obésité est caractérisée par un IMC supérieur ou égal à 30 kg/m². Plusieurs organismes tels que l'OMS et le *National Institute of Health* (NIH) reconnaissent maintenant l'obésité comme une maladie chronique (1, 3).

L'Enquête Canadienne sur les Mesures de la Santé (ECMS) a été réalisée de 2007 à 2009 sur approximativement 5 600 Canadiens âgés de 6 à 79 ans (4). Selon cette enquête, 25% des adultes canadiens étaient obèses en 2008, selon une taille et un poids mesurés durant l'enquête (4). De plus, près de 60% des adultes canadiens étaient au moins en surplus de poids selon ces mêmes mesures (4). Selon l'ECMS, les coûts directs (exemple : frais de soins hospitaliers) ou indirects (exemple : perte économique due à une mort prématurée ou à une invalidité) s'élèvent jusqu'à 4,6 milliards de dollars par année au Canada (4). Ainsi, d'un point de vue économique et de santé populationnelle, il est crucial de s'enquérir de la physiopathologie de l'obésité et de ses complications métaboliques.

1.2 Distribution des graisses

1.2.1 Classification des tissus adipeux

L'accumulation de graisse corporelle ne peut être considérée comme un élément homogène : en effet, le tissu adipeux est segmenté en différents dépôts ayant des conséquences différentes sur la santé et le métabolisme individuel. Les différents

dépôts ont été systématiquement classés par Shen et collaborateurs (5), qui les ont divisés en deux grandes catégories : le dépôt sous-cutané et interne. Selon cette classification, le dépôt sous-cutané se définit comme étant la couche de tissu adipeux superficiel, située entre le derme épidermique et les aponévroses ou le fascia musculaire (5). Le tissu adipeux interne peut être secondairement sous-classé en tissu adipeux viscéral et non viscéral (5). Il est la somme de 3 dépôts, représentant les 3 cavités abdominales: soit le dépôt intrathoracique, intraabdominal et intrapelvique (5). Bien que l'inclusion ou l'exclusion des différents dépôts varient selon les études, la combinaison des dépôts intrabdominal et intrapelvique est généralement la plus souvent utilisée par les chercheurs pour mesurer l'accumulation de graisse viscérale chez l'humain (5).

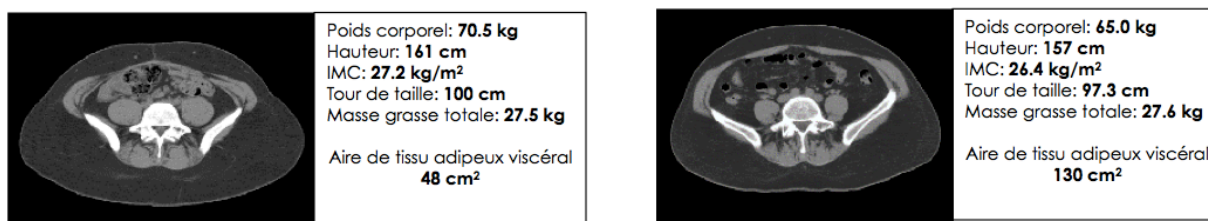


Figure 1 : Différence des aires de tissus adipeux mesurée par tomодensitométrie (TDM) à la région des vertèbres L4-L5 chez deux individus différents montrant une masse grasse totale semblable. Figure tirée de Tchernof et collaborateurs (6).

1.2.2 Considérations méthodologiques

Plusieurs techniques d'estimation de distribution des graisses sont décrites dans la littérature. Le ratio taille/hanche (RTH) ou la circonférence de la taille (CT) sont couramment utilisés afin d'estimer le degré d'obésité abdominale (7). Ils sont peu dispendieux, demandent peu d'expertise et peuvent être employés dans de grands échantillons de population (7). Cependant, ils ne permettent pas de différencier le dépôt sous-cutané abdominal du dépôt viscéral.

Certaines techniques d'imagerie ont permis d'estimer plus précisément ou de mesurer directement la proportion des deux dépôts de tissu adipeux au niveau abdominal. Les techniques existantes permettant de faire ce type de mesures sont la tomодensitométrie (TDM), l'imagerie par résonance magnétique (IRM),

l'absorptiométrie biphotonique à rayons X (DXA) et, moins couramment, les techniques d'imagerie par ultrasons (échographie) (6). La TDM et l'IRM sont considérées comme deux méthodes précises, mais les experts ne s'entendent pas sur laquelle des deux est la meilleure. Néanmoins, la TDM est considérée comme une bonne méthode d'estimation du dépôt viscéral et sous-cutané (8, 9) en plus d'être largement utilisée dans la littérature (9). De plus, la TDM amène une erreur inter-observateurs moindre que l'IRM (10). La TDM est cependant critiquée, car elle expose les participants à certaines doses de radiations, ce qui limite le nombre de mesures pouvant être effectuées (7). Certains investigateurs ont observé des résultats similaires entre les images obtenues par TDM et par IRM, suggérant que cette dernière technique est un bon remplacement de la TDM (11-13). Par contre, une surestimation du dépôt viscéral par IRM a été constatée (12, 13). En somme, la grande variété de méthodes de mesures peut expliquer certaines disparités dans la recherche sur les différents dépôts adipeux.

La proportion de chaque dépôt est variable de manière interindividuelle et intrasexuelle. De plus, celle-ci affecte différemment le risque de développement de maladies cardiométaboliques. La prochaine section portera donc sur ces deux éléments intrinsèquement reliés.

1.3 Dimorphisme sexuel chez l'humain

La composition corporelle et les changements associés au vieillissement sont différents entre les hommes et les femmes. Notamment, les femmes sont généralement caractérisées par une plus grande accumulation de gras corporel total que les hommes (14). Par ailleurs, les hommes sont généralement constitués d'une plus grande quantité de masse maigre, plus précisément une plus grande masse musculaire et osseuse (14).

Jean Vague fut le premier investigateur ayant invoqué la présence d'un dimorphisme sexuel dans la distribution des graisses chez l'humain (15). Ce dernier a observé deux patrons de distribution distincts, associé à un risque différent de développer des maladies métaboliques (15). Selon ces travaux, le

patron de distribution de type *gynoïde* est caractérisé par une accumulation préférentielle de tissu adipeux au niveau des hanches et des cuisses (15). Ce profil de distribution, généralement associé à l'obésité féminine, est considéré protecteur contre le développement de maladie chronique, pour une valeur d'adiposité donnée (15). Le second profil, dit *androïde*, est défini comme une accumulation au niveau abdominal (15). Ce patron de distribution de masse grasse est davantage observé chez les hommes et est associé à un risque accru de développer un diabète de type II ou des maladies cardiovasculaires (15). Cependant, il existe une très grande diversité interindividuelle dans l'accumulation de tissu adipeux viscéral, et ce pour une même quantité de gras corporel totale (16). Ainsi, bien que l'on observe plus fréquemment l'obésité viscérale chez l'homme, celle-ci peut tout de même être présente chez la femme (9).

Ce dimorphisme sexuel tend à évoluer suite à la ménopause. En effet, une augmentation modeste du tissu adipeux total ainsi qu'une redistribution des graisses vers une accumulation préférentielle au niveau viscéral est observée chez les femmes ménopausées (17-19). Les femmes, souffrant moins de maladies chroniques avant la ménopause, deviennent progressivement aussi susceptibles que les hommes à développer ce type de pathologie après la ménopause (20). Ce phénomène sera discuté davantage dans les sections 2 et 3 de ce mémoire.

Les travaux réalisés par le Dr. Jean Vague ont mené à la réalisation d'une multitude de recherches concernant l'accumulation de gras abdominal. Ces études ont confirmé que l'obésité viscérale est associée à plusieurs dysfonctions métaboliques pouvant avoir des répercussions systémiques importantes, ainsi qu'à l'apparition de maladies chroniques (21, 22). De nombreux chercheurs ont étudié l'impact de l'accumulation de gras viscéral sur divers paramètres de santé cardiométaboliques. La prochaine section portera sur cet aspect.

1.3.1 L'obésité viscérale

Physiopathologie générale

Il existe plusieurs hypothèses sur les mécanismes de la détérioration du métabolisme associée à un accroissement d'adiposité viscérale (9). La première concerne le métabolisme particulier du tissu adipeux viscéral, plus hyperlipolytique que le tissu sous-cutané. Cette caractéristique particulière entraînerait une augmentation des acides gras libres circulants, engendrant une surexposition du foie à ceux-ci, une détérioration du profil lipidique ainsi qu'une hyperinsulinémie. La seconde hypothèse concerne le profil pro-inflammatoire du tissu adipeux viscéral, caractérisé par une augmentation de l'infiltration des macrophages et une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, ce qui produirait une augmentation de la résistance à l'insuline. La dernière hypothèse est que l'augmentation du tissu adipeux viscéral résulte d'une incapacité du tissu adipeux sous-cutané à accumuler les lipides, ce qui causerait une accumulation ectopique des acides gras dans les organes tels que le foie, le pancréas, les muscles, le cœur, les reins, ainsi que dans la cavité viscérale.

Un phénomène étudié par plusieurs équipes de recherche est la dysfonction du tissu adipeux. Un des éléments-clés de ce phénomène est l'hypertrophie adipocytaire. Il a été démontré à plusieurs reprises que la taille adipocytaire des divers dépôts adipeux augmente en fonction du degré d'obésité et atteint un plateau à des valeurs d'IMC supérieures à 30 kg/m² est positivement corrélée à l'obésité et à la masse grasse (23-27). Cette relation curvilinéaire suggère que l'expansion du tissu adipeux, pour se poursuivre une fois la taille maximale des adipocytes atteinte, nécessite le recrutement de nouveaux adipocytes. Le tissu adipeux peut prendre de l'expansion par hyperplasie, soit la capacité de se développer en augmentant son nombre de cellules adipeuses, ou par hypertrophie, soit l'augmentation de la taille de ces cellules. Il a été observé que le tissu adipeux viscéral, contrairement au tissu adipeux sous-cutané, prend de l'expansion préférentiellement par hypertrophie, du moins chez la femme (28). Il a été démontré que l'hypertrophie des adipocytes, contrairement à l'hyperplasie de

ceux-ci, est un facteur prédictif des complications métaboliques reliées à l'obésité (24, 27, 29). Cependant, la relation directe entre la taille adipocytaire et l'altération de paramètres métaboliques est toujours équivoque, cette disparité probablement causée par le manque de linéarité dans la relation entre la taille adipocytaire et la masse grasse (29).

Un patron adipocytaire hypertrophique a été associé à plusieurs altérations dans la fonction du tissu adipeux (30-32). L'infiltration de macrophages pro-inflammatoires est un facteur important de la dysfonction du tissu adipeux, étant corrélée positivement avec l'IMC, la masse grasse et l'hypertrophie adipocytaire (33-35). Un remodelage du tissu adipeux est aussi observé dans un contexte d'obésité, caractérisé par un débalancement entre la synthèse et la dégradation du collagène extracellulaire (36). La résultante de ce phénomène est l'accumulation de collagène péricellulaire, ce phénomène étant relié à l'altération de paramètres métaboliques (37). De manière intéressante, il a aussi été observé que l'oxygénation des tissus est diminuée chez les personnes obèses (38). Cette hypoxie, recréée dans des études *in vitro* à l'aide d'adipocytes de souris, est associée à l'augmentation de l'expression de plusieurs marqueurs inflammatoires et marqueurs de remodelage tissulaire tels les métalloprotéases matricielles (MPPs) (MPP2 et MPP9), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et l'interleukine 6 (IL-6) (39, 40). De même, une surexpression de deux cytokines pro-inflammatoires, le *nuclear factor Kappa-B* (NF- κ B) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), a été observée à plusieurs reprises dans les adipocytes hypertrophiques, et ce, de manière indépendante de l'IMC (29). De manière intéressante, il a aussi été observé que le traitement de cellules endothéliales à un milieu de culture exposé à des adipocytes entraîne une hypersécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-6, l'interleukine 8 (IL-8) et le *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) (41). Récemment, une revue de littérature sur l'impact de la chirurgie bariatrique sur l'inflammation du tissu adipeux montre une diminution de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, autant dans le plasma que dans le tissu adipeux sous-cutané (42). Ce constat émerge de la synthèse d'un très grand nombre d'études rétrospectives et/ou longitudinales qui

ont été publiées à ce sujet (42). Globalement, plusieurs altérations métaboliques sont observées dans le tissu adipeux dans un contexte d'obésité et d'hypertrophie adipocytaire. Cependant, les mécanismes exacts de cette physiopathologie sont toujours à élucider.

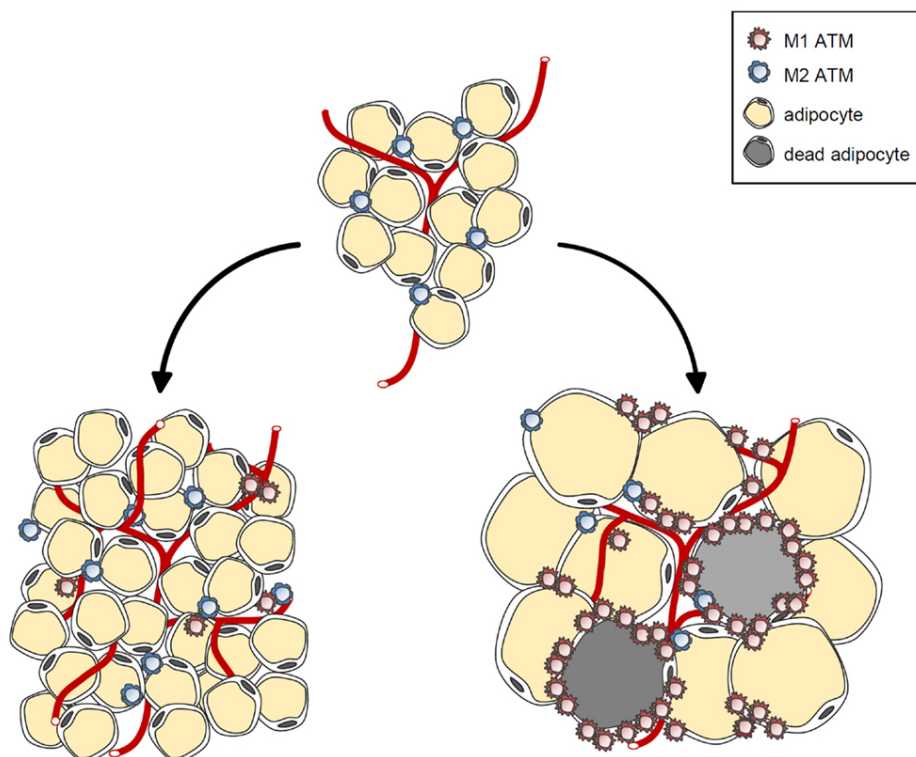


Figure 2 : Différence morphologique entre un tissu adipeux sain hyperplasique (gauche) et un tissu adipeux hypertrophique (droite). Figure tirée de Choe et collaborateurs (32).

La prochaine section portera sur les conséquences de l'excès d'adiposité viscérale sur l'altération de différents paramètres métaboliques ainsi que sur l'apparition ou l'aggravation de maladies chroniques.

Résistance à l'insuline

Tel que mentionné précédemment, l'une des premières découvertes concernant l'obésité viscérale est que l'accumulation de type androïde est associée à une augmentation du risque de développer une hyperglycémie (15). Plusieurs années

plus tard, une équipe de chercheurs de l'Université de Gothenburg ont montré que le RTH et la CT, sont les seules mesures anthropométriques prédictives du risque de développer le diabète de type II lorsque l'IMC est inclus dans le modèle (43). Depuis l'arrivée des techniques d'imagerie (voir section 1.2.2), plusieurs études ont démontré que l'aire de tissu adipeux viscéral est associée à l'intolérance au glucose (44-46). Notamment, une élégante étude réalisée par Pascot et collaborateurs (44) démontre que les hommes intolérants au glucose sont plus susceptibles (86,4% contre 41,6%) d'avoir une aire de tissu adipeux viscéral élevée, contrairement aux normotolérants.

Plusieurs études ont mis en lumière les mécanismes sous-jacents à ce phénomène (47). Quelques-uns de ces mécanismes seront présentés ci-dessous. L'accumulation de lipides dans les tissus périphériques est un élément important du développement de la résistance à l'insuline, notamment en augmentant l'apoptose des cellules bêta du pancréas (48). Il a aussi été proposé que l'hypertrophie adipocytaire est un facteur de risque indépendant de développer le diabète de type II, bien que l'association entre la taille adipocytaire viscérale et la résistance à l'insuline demeure équivoque (29). La réduction de l'expression de GLUT4, observée dans les adipocytes hypertrophiés (49), a été associée à une augmentation de la résistance à l'insuline (50). Il a été observé que l'augmentation de macrophages dans le tissu adipeux bloque le signal de l'insuline dans les adipocytes en diminuant l'expression du transporteur de glucose 4 (GLUT4) et de l'*insulin receptor substrate 1* (IRS-1) (51). La *retinol binding protein 4* (RBP4), plus exprimé dans le tissu adipeux viscéral que sous-cutané (52), a été identifié comme biomarqueur de résistance à l'insuline (53). Il entrainerait une résistance à l'insuline par l'activation du système immunitaire inné et adaptatif, ainsi que par l'augmentation de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (54, 55). Plusieurs voies mécanistiques semblent expliquer l'association entre la résistance à l'insuline, la dysfonction adipeuse et l'accumulation viscérale.

Dyslipidémie

L'impact de l'accumulation de graisse viscérale sur le métabolisme lipidique a été étudié de manière extensive. Notamment, une hypertriglycéridémie ainsi qu'une diminution de la concentration de lipoprotéines à haute densité (HDL) sont deux altérations du profil lipidique fréquemment rapporté dans la littérature (9, 56). Un enrichissement en triglycérides dans les lipoprotéines ainsi qu'une augmentation des HDL et des lipoprotéines à faible densité (LDL) petites et denses sont aussi observés (9, 56).

Le mécanisme sous-jacent aux altérations du métabolisme des lipides en présence d'obésité viscérale est un phénomène qui a été examiné par plusieurs équipes de chercheurs. Notamment, la concentration élevée d'acides gras libres (AGL) circulants en présence d'obésité (47) entraîne une augmentation des lipoprotéines à très faible densité (VLDL) enrichies en triglycérides produites par le foie (57). Ces VLDL enrichies entraînent l'échange de molécules de triglycérides contre des esters de cholestérols dans les LDL et les HDL (9). Ceux-ci deviennent de bons substrats pour la lipase hépatique (LH), ce qui forme des HDL et LDL petites et denses (58). Ces HDL sont plus rapidement métabolisées par l'organisme, ce qui explique la concentration faible des HDL plasmatiques (59). Ces altérations du profil lipidique sont des facteurs bien connus de l'augmentation du risque de maladies cardiovasculaires (60).

Hypertension

L'association positive entre l'obésité totale et l'hypertension artérielle est un phénomène bien connu (61). Certaines études ont maintenant démontré que l'obésité viscérale a un impact plus important sur l'hypertension que l'obésité totale. La CT est associée plus fortement à la pression artérielle systolique et diastolique que l'IMC (62, 63). Hayashi et collaborateurs ont aussi observé que les personnes se retrouvant dans les tertiles les plus élevés de gras viscéral ont un

risque augmenté de souffrir d'hypertension, cette relation étant indépendante du degré d'obésité totale (64).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Une étude intéressante réalisée à l'aide de la cohorte de Framingham a démontré qu'une augmentation de l'accumulation de gras dans le sinus rénal augmente le facteur de risque de développer de l'hypertension (65). Ainsi, une altération mécanistique causée par l'accumulation ectopique de gras pourrait expliquer la relation entre l'accumulation viscérale et l'augmentation de la pression artérielle. Un autre mécanisme potentiel est l'altération du système rénine-angiotensine-aldostérone, un phénomène observé chez des rats atteints du syndrome métabolique (66). De même, l'obésité entraîne des altérations structurales dans le rein (67). Ce dernier phénomène sera discuté plus en détail dans la section « insuffisance rénale » de ce mémoire.

Syndrome Métabolique

Le syndrome métabolique a attiré l'attention de nombreux chercheurs et professionnels de la santé pour son impact important sur le développement de maladies chroniques, comme les maladies cardiovasculaires (68). Ce syndrome se caractérise par la présence de multiples facteurs de risque cardiométaboliques chez un même individu (68). Le rapport du *National Cholesterol Education Program* (NCEP) apparu en 2002 définit ce syndrome comme la présence de 3 des 5 facteurs présenté au **Tableau 1** (présenté à la page suivante).

L'obésité viscérale semble ainsi un élément-clé dans le développement des complications cardiométaboliques, puisqu'elle a un impact négatif sur plusieurs paramètres métaboliques, tel que décrit précédemment. L'impact de l'obésité viscérale sur ces facteurs de risque cardiométabolique a des répercussions sur le développement de maladies chroniques. Les prochaines sections évoqueront la physiopathologie sous-jacente de l'obésité viscérale.

Facteur de risque	Valeur seuil
Obésité abdominale Homme Femme	Tour de taille > 102 cm > 88 cm
Triglycérides	≥ 1,7 mmol/L
Cholestérol HDL Homme Femme	< 1,0 mmol/L < 1,3 mmol/L
Pression artérielle	≥ 130/85 mm Hg
Glucose à jeun	≥ 6,1 mmol/L

Tableau 1: Composantes du syndrome métabolique, adapté du rapport du NCEP (68)

Maladies cardiovasculaires

Comme il a été discuté précédemment, une relation positive entre les altérations du profil lipidique et l'obésité viscérale est bien documentée. Ainsi, un impact négatif de l'accumulation adipeuse au niveau abdominal sur le risque de maladies cardiovasculaires est facilement envisageable. Cette relation a été démontrée à plusieurs reprises. Une des premières études sur la morphologie du tissu adipeux réalisée par l'Université de Gothenberg a d'ailleurs observé une relation positive entre le RTH et le risque d'infarctus et de maladies cardiaques ischémiques (69). Une étude prospective sur 12 ans chez les femmes montre des résultats similaires (70). Dagenais et collaborateurs ont aussi observé une augmentation du risque d'infarctus du myocarde et de mort cardiovasculaire avec une augmentation du RTH et de la CT, indépendamment de l'IMC (71). Dans une étude prospective longitudinale sur une moyenne de 10 ans, les participants en surplus de poids souffrant du syndrome métabolique étaient plus à risque de mortalité cardiovasculaire que ceux n'en souffrant pas (72). Lee et collaborateurs observent également que le changement du volume de gras viscéral mesuré par CT sur 6 ans était positivement corrélé à l'augmentation de facteurs de risque de maladies cardiovasculaires (73). Ainsi, la relation positive entre le risque cardiovasculaire et l'obésité abdominale est bien documentée.

Insuffisance rénale

Les maladies rénales chroniques, pouvant mener à l'insuffisance rénale, sont généralement associées au diabète de type II et à l'hypertension artérielle, ceux-ci étant les causes les plus importantes de cette pathologie (74). Par contre, l'obésité est associée à certains marqueurs de détérioration rénale, comme une augmentation du débit de filtration glomérulaire ou une hypertrophie glomérulaire (67). Plusieurs mécanismes potentiels expliquant ce phénomène ont été rapportés, tels que la rétention hydrosodée, l'hyperactivité du système rénine-angiotensine-aldostérone et du système nerveux sympathique ainsi que l'augmentation des médiateurs chimiques pro-inflammatoires (67). Ainsi, plusieurs éléments aggravants de la perte de fonction rénale pointent vers un effet de l'excès d'adiposité viscérale. En effet, plusieurs études ont rapporté des associations entre le syndrome métabolique et ses composantes avec l'insuffisance rénale chronique (75). Parmi celles-ci, une étude prospective de 10 ans conclut que le risque de développer une insuffisance rénale chronique est de 38% plus élevé chez les participants présentant le syndrome métabolique que ceux ne le présentant pas (76). Comme peu de données sont disponibles sur ce sujet, des études supplémentaires semblent nécessaires pour démontrer le lien direct entre l'accumulation de gras viscéral et l'incidence de maladies rénales.

Cancer

La relation entre plusieurs types de cancers et l'obésité est bien démontrée (77). L'accumulation de tissu adipeux au niveau viscéral a été associée à une augmentation du risque de développer certains types de cancers, de manière indépendante du gras corporel total (9). Ainsi, l'association entre l'obésité viscérale et le cancer colorectal est bien démontrée (78, 79). L'obésité viscérale a aussi été associée au cancer de la prostate (80) et oesophagique (81). Une méta-analyse réalisée par Chen et collaborateurs (82) a quantifié l'impact de l'adiposité centrale sur le risque du cancer du sein chez les femmes avant ou après la ménopause. Selon cette méta-analyse, la CT et le RTH seraient positivement liés au risque de développer un cancer du sein chez les femmes ménopausées [risque relatif (RR) :

1,06; intervalles de confiance de 95% (IC) : 1,04-1,09], alors que cet impact n'est pas observé chez les femmes préménopausées (82). De manière intéressante, la relation entre la CT et le risque de cancer devient significative, autant chez les femmes pré (RR : 1,09; 95%CI : 1,02 – 1,16) et postménopausée (RR : 1,05; 95%CI : 1,02 – 1,08) lorsque seules les études ayant ajusté pour l'IMC sont incluses dans les analyses (82). Cette relation n'est pas observée avec le RTH. Le cancer du sein étant un cancer hormono-dépendant, la relation entre l'adiposité et les hormones sexuelles peut jouer un rôle dans cette pathologie.

Beaucoup d'autres problèmes de santé reliés à l'obésité ont évidemment été documentés, dont l'apnée du sommeil, les problèmes reproductifs ou les déficits d'hormone de croissance (9). L'étude de la distribution des graisses est essentielle à la compréhension approfondie de ces situations pathologiques. . Ces différents constats concernant le dimorphisme sexuel de la distribution des graisses chez l'humain, ainsi que le changement de patron de distribution suite à la ménopause, ont amené l'hypothèse que les stéroïdes circulants peuvent avoir un impact important sur l'accumulation des graisses, ainsi que sa distribution. La prochaine section portera sur l'impact des estrogènes circulants, endogènes ou exogènes, sur l'accumulation de gras corporel, la distribution des graisses et le développement de maladies métaboliques chroniques.

2. Estrogènes circulants chez l'humain

Les estrogènes sont une classe hormonale stéroïdienne principalement sécrétée par les ovaires et typiquement associée à la reproduction et aux développements des caractéristiques secondaires sexuelles féminines (83). Par ailleurs, ces hormones jouent un très grand rôle dans le développement et le métabolisme chez la femme tout au long de la vie, autant à la ménarche qu'à la transition vers la ménopause. La présence des récepteurs des estrogènes (ER) α et β dans plusieurs tissus périphériques tels que les os, le cerveau et les glandes surrénales (84) laisse présager un plus grand rôle de ces hormones dans l'homéostasie

corporelle. Par ailleurs, les estrogènes sont déjà reconnus pour leur impact important dans certains types de cancers (85).

L'estradiol (E2) est l'estrogène le plus biologiquement actif et le plus important pour le métabolisme féminin (83). L'estrone (E1) et l'estriol (E3) sont deux autres estrogènes abondants, mais beaucoup moins actifs biologiquement que l'E2 (83). L'estrone-sulfate (E1-S) est, quant à lui, l'un des principaux métabolites estrogéniques (86), mais il sert aussi de réservoir et peut donc être converti en E1 ou en E2 (83).

Les estrogènes ne circulent pas librement dans le système circulatoire. En effet, la majorité de ceux-ci sont transportés grâce à la globuline liant les hormones sexuelles (SHBG) et l'albumine (87). Ainsi, la fraction dite « libre » d'E2 fait référence à la concentration plasmatique non liée du stéroïde, alors que la fraction « biodisponible » représente la fraction libre et jointe à l'albumine, celle-ci étant liée faiblement à la protéine et pouvant donc être utilisée par les cellules (87). Il a été estimé que 78% de l'E2 est liée à l'albumine et 20% à la SHBG chez l'homme (88). Ces concentrations sont de 60% et 37% respectivement chez la femme (88).

2.1 Estrogènes circulants chez la femme

Tel que mentionné précédemment, les estrogènes ont un impact important sur l'homéostasie métabolique et reproductrice chez la femme. Les prochaines sections porteront sur l'impact des taux d'estrogènes circulants chez la femme et leur adiposité, selon l'étape de vie.

2.1.1 Estrogènes et adiposité - femmes préménopausées

La période reproductrice chez la femme est caractérisée par un changement cyclique de la concentration plasmatique d'estrogènes. La concentration d'estrogènes circulants est donc grandement influencée par la phase du cycle menstruel. Le taux d'estrogènes plasmatique est généralement mesuré durant la phase folliculaire, cette phase se distinguant par une concentration circulante d'E2 plus basse et plus stable. Néanmoins, très peu d'études portent sur l'impact des

estrogènes, particulièrement l'E2, sur la distribution et l'accumulation des graisses chez la femme préménopausée.

Parmi les quelques études existantes, une corrélation négative entre le niveau d'E2 circulant à la phase folliculaire et l'adiposité a été observée (89, 90). Une étude réalisée chez un sous-groupe de la *Nurse Health Study II* rapporte ainsi une relation inverse entre l'IMC et l'E2 total mesuré pendant les phases lutéale et folliculaire du cycle menstruel (89). Cette association n'a pas été observée avec la CT, ni avec l'E2 libre (89). Des résultats similaires sont rapportés par Freeman et collaborateurs, la concentration plasmatique d'E2 étant négativement associée à l'IMC, la CT et le RTH chez les femmes préménopausées (90). Cependant, une étude réalisée sur 239 femmes pendant 2 cycles menstruels complets montre qu'une adiposité totale estimée par IMC est associée à un plus faible taux d'E2 biodisponible (91). Par contre, une plus grande adiposité centrale estimée par DXA est associée à un taux plus élevé d'E2 total (91).

En somme, des études supplémentaires sont nécessaires afin d'établir une relation définitive entre le taux d'estrogènes circulants et l'adiposité chez la femme préménopausée. Ces études sont toutefois difficiles à réaliser, car il est important de prendre en considération le moment du cycle menstruel.

2.1.2 Changements hormonaux associés à la ménopause

La ménopause est associée à un changement important au niveau hormonal. Les ovaires, l'organe sécrétoire d'estrogènes le plus important chez la femme fertile, cesse la sécrétion d'E2 (83). La fraction circulante d'E2 est donc générée par conversion enzymatique dans les tissus périphériques (92). Ce processus forme la majorité des estrogènes circulants après la ménopause (93). La présence de plusieurs enzymes de conversion stéroïdienne dans le tissu adipeux (94) laisse présager un rôle important de celui-ci dans la génération d'estrogènes chez la femme ménopausée. En effet, la conversion de l'androstènedione ($\Delta 4$) en E1 dans le tissu adipeux par une enzyme appelée l'aromatase est un phénomène connu depuis de nombreuses années (95).

Puisque le changement de milieu hormonal après la ménopause est important et qu'il existe parallèlement une redistribution des graisses au niveau abdominal (voir section 1.3, Dimorphisme sexuel chez l'humain), la relation hormones-adiposité est susceptible de changer. La prochaine section portera sur la relation entre les estrogènes circulants et l'adiposité chez la femme ménopausée.

2.1.3 Estrogènes endogènes chez la femme ménopausée

Certains chercheurs ont tenté d'observer la relation entre le taux d'estrogènes, particulièrement l'E2, et l'adiposité chez la femme ménopausée. Plusieurs études observent une association négative entre le taux d'estrogènes circulant (E2, E1 et parfois E1-S) et l'adiposité estimée par l'IMC (90, 96-100) ou par plis cutanés (101). Des corrélations positives ont aussi été observées entre E2, E1 et E1-S avec l'adiposité centrale, périphérique et totale mesurée par DXA (98). Tankò et collaborateurs (102) ont observé que les femmes ménopausées ayant une accumulation de graisse au niveau abdominal estimée par DXA ont un taux circulant d'E2 total ou biodisponible plus élevé que les femmes ayant une adiposité généralisée ou périphérique, et ce, en ajustant pour le gras corporel total. Tous ces chercheurs ont mesuré les estrogènes plasmatiques par dosage radio-immunologique (RIA) sauf Tankò et collaborateurs (102), qui ont utilisé l'immunoessai par électrochimiluminescence (ECLIA). Par ailleurs, une réanalyse effectuée à l'aide des données récoltées de 9 études différentes sur le cancer du sein observe une augmentation importante des concentrations d'estrogènes dans les catégories plus élevées d'IMC (103). Mongraw-Chaffin et collaborateurs (104) ont étudié les différences entre les quintiles d'E2 circulant et les aires de tissus adipeux viscérale et sous-cutanée mesurées par TDM. Une augmentation des deux mesures d'aires est observée avec une augmentation du quintile d'E2 (104). Le manque d'études utilisant des méthodes précises de mesure d'adiposité telles que la TDM ou l'IRM limite les conclusions possibles sur les estrogènes circulants endogènes et l'adiposité chez la femme ménopausée.

Les études longitudinales portant sur la perte de poids montrent des résultats discordants. Une sous-analyse réalisée à partir d'un essai clinique d'intervention

de perte de poids (moyenne de 7,7 kg sur 6 mois) incluant 278 femmes ménopausées montre une diminution de l'E2 total (-9,9%), de l'E2 libre (-13,4%) et de l'E1 (-5,7%) (105). Le pourcentage de diminution de l'E2 et l'E1 est de 1,6% et 1% par kilogramme de poids perdu, respectivement (105). Une étude récente réalisée par Kim et collaborateurs (106) porte sur les changements de concentration plasmatique de plusieurs stéroïdes lors d'un programme de perte de poids d'un an chez 555 diabétiques. Chez les femmes ménopausées (n=131), une association négative a été observée entre le changement d'aire de tissu adipeux sous-cutané et l'E1 plasmatique. Cette relation n'a pas été observée avec l'aire de tissu adipeux viscéral ni avec l'E2. Ces résultats s'expliquent probablement par le fait que c'est la masse totale de tissu adipeux, plutôt qu'un dépôt spécifique, qui influence les taux estrogéniques plasmatiques. Comme les femmes accumulent préférentiellement au niveau sous-cutané (voir section 1.3), seule la variation de ce dépôt semble affecter le taux d'E1 plasmatique dans cette étude. Le manque d'association entre la variation de la masse adipeuse et E2 pourrait s'expliquer par le fait que les taux circulants d'E2 sont beaucoup moins élevés que ceux d'E1, ce qui rend beaucoup plus difficile la détection de cette association.

La mesure des estrogènes plasmatiques demeure un défi chez les populations avec de faibles taux circulants, telles que les hommes, les personnes prenant des inhibiteurs de l'aromatase, les enfants et les femmes ménopausées (107). Par ailleurs, selon un consensus du conseil de la Société d'endocrinologie (*Endocrine Society*), les conclusions tirées des études réalisées sur ces populations sont limitées par la pauvre qualité et la variabilité des techniques de mesure utilisées (107). Ainsi, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est reconnue comme une méthode précise (108). Elle a cependant été largement remplacée par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (109-111).

La section précédente portait sur la concentration d'estrogènes endogènes. Cependant, la thérapie de remplacement hormonal peut générer des résultats différents, dus au mode d'administration ainsi qu'aux types et aux doses

d'estrogènes utilisées. La prochaine section portera sur les études cliniques évaluant l'impact de la thérapie de remplacement hormonal sur l'adiposité chez la femme.

2.1.4 Thérapie de remplacement hormonal

L'effet de la thérapie de remplacement hormonal sur l'adiposité de la femme ménopausée semble différer de celles des estrogènes endogènes. En effet, les études cliniques n'ont observé aucun effet (112, 113) ou une diminution de la masse grasse (114) mesurée par DXA. Par ailleurs, une revue systématique portant sur 38 essais randomisé-contrôlés a conclu qu'aucune différence de gain de poids n'est observée entre les femmes prenant la thérapie de remplacement hormonal et celles prenant le placebo (différence moyenne de poids : 0,03 kg; 95% CI :-0,61 à 0,67) (115). Cette analyse regroupe les essais cliniques des traitements aux estrogènes, à la progestérone ou combinés, administrés pendant un minimum de 3 mois dans un groupe de femmes péri ou postménopausées (115). Cependant, une méta-analyse publiée en 2006 a conclu que la thérapie de remplacement hormonal réduit significativement le tour de taille (-0,8%; CI : -1,2% à -0,4%) ainsi que le gras abdominal (-6,8%; CI :-11,8% à -1,9%) (116). Malgré les différents types d'estrogènes, la durée et le mode d'administration, il est généralement démontré que le supplément d'estrogènes exogènes chez la femme ménopausée entraîne une diminution ou n'a aucun effet sur la masse adipeuse.

2.3 Estrogènes et métabolisme

Certaines recherches réalisées *in vitro* et *in vivo* ont examiné l'impact des estrogènes sur plusieurs paramètres métaboliques, dont la résistance à l'insuline. L'impact des estrogènes sur différents tissus est généré par la liaison de l'hormone à ses récepteurs, ER α ou ER β , présent généralement dans le noyau cellulaire lorsque lié à l'hormone (84). De même, certains effets non génomiques, beaucoup plus rapides, sont obtenus par la liaison des estrogènes à une sous-population de ER α ou ER β présente sur la membrane cellulaire, ainsi qu'au récepteur estrogénique couplé à la protéine G 1 (GPER) (117). La présence de ces récepteurs dans différents tissus ainsi que leurs rôles parfois antagonistes (118)

complexifient les interactions observées entre ces stéroïdes et certains paramètres métaboliques. Cette section présentera les principaux travaux effectués sur ce sujet, qui sont majoritairement réalisés sur l'E2.

2.3.1 Prise alimentaire et gain de masse grasse

Des études démontrent que l'ovariectomie chez le rat entraîne une hyperphagie et une prise de poids, ce phénomène étant renversé par un traitement à l'E2 (119). Cependant, une étude chez des souris ovariectomisées et pairées selon un traitement placebo/E2 a démontré une prise de masse grasse abdominale chez les souris non traitées, et ce, de manière indépendante de la prise alimentaire (120). Les ER α et β sont présents dans le cerveau, notamment dans l'hypothalamus, un centre important de contrôle de l'appétit et de la prise alimentaire (83). Certaines études chez les souris montrent une diminution de la dépense énergétique lorsque ER α est bloqué (121, 122), alors que les résultats pour la prise alimentaire sont divergents (121, 122). Les études chez les souris ER β KO montrent une augmentation de la masse grasse sous une diète riche en gras (123). Ce phénomène serait attribuable à une augmentation de la transcription du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes γ (PPAR γ) lors de l'absence du récepteur (123). Mårtensson et collaborateurs observent que les souris femelles GPR-KO ont un poids plus faible que les souris contrôles (124). Cependant, cet effet est dû à une diminution de la croissance du squelette et non à une diminution de la masse adipeuse (124). Cet effet n'est pas observé chez les souris mâles (124). De manière contradictoire, une augmentation de la masse grasse totale, sous-cutanée et viscérale a été observée chez les souris mâles GPER-KO (125).

2.3.2 Lipolyse et lipogénèse

Les données actuellement disponibles chez l'animal et chez l'humain semblent démontrer que l'E2 a un effet anti-lipogénèse et pro-lipolyse sur les adipocytes chez les femelles, alors que les résultats sont discordants chez les mâles (126). D'Eon et collaborateurs ont observé une inhibition de l'expression des gènes lipolytiques dans le tissu adipeux, le foie et les muscles squelettiques chez les souris ovariectomisées et traitées à l'E2, comparativement aux animaux non traités

(120). Cette diminution de la lipogenèse pourrait s'expliquer par une diminution de l'expression de la lipoprotéine lipase (LPL) dans le tissu adipeux (120). Ce phénomène est aussi observé dans les adipocytes isolés de femmes traitées à l'E2 (127). Par contre, des doses plus faibles d'E2 entraînaient l'effet inverse, soit une augmentation de la LPL (127). Dans cette même étude, il a été observé que l'E2 entraînait une diminution de la lipase hormonosensible (HSL), cet effet étant aussi dose-dépendant, mais de manière moins marquée que pour la LPL (127). Des études supplémentaires sont nécessaires pour éclaircir ce phénomène. Concernant le rôle des ERs, les connaissances actuelles suggèrent que les récepteurs ER α et β ont des effets anti-lipogenèse et pro-lipolyse (128). Cependant, ER α augmente la sensibilité à l'insuline, alors que l'inverse est observé pour ER β (128). Cependant, la majorité des études sur cette relation ont été réalisées chez la souris (128).

2.3.3 Adipogenèse

Comme pour la lipolyse, l'impact de l'E2 sur l'adipogenèse semble différer selon le sexe (126). En effet, selon des études réalisées chez les rongeurs, l'E2 semble avoir un effet stimulant sur les adipocytes du tissu adipeux sous-cutané des femelles, alors que ces résultats ne sont pas observés ni sur le tissu adipeux interne ni chez le mâle (129). Chez les humains, il a aussi été observé que l'E2 a un effet plus prononcé sur la prolifération des préadipocytes chez les femmes que chez les hommes, et ce de manière plus importante sur les préadipocytes sous-cutanés que sur les préadipocytes viscéraux (130). De plus, l'effet maximal de l'E2 sur la prolifération a lieu dans un délai plus court chez les préadipocytes de femmes (24 à 48h) que ceux des hommes (48 à 72h) (130). Différentes hypothèses ont été évaluées pour expliquer ce phénomène, dont la différence de localisation du tissu adipeux ou le microenvironnement hormonal, ce qui pourrait expliquer les différences intersexuelles observées (25, 131). Comme les préadipocytes expriment seulement ER α , l'effet de E2 sur la différenciation adipocytaire est attribuable à ce récepteur (132). La présence de GPER dans le tissu adipeux est controversée (124, 133, 134). Cependant, l'activation de GPER par l'E2 dans des cellules 3T3-L1 diminue l'accumulation de lipides ainsi que la

différentiation des pré-adipocytes (134). Des études sont encore nécessaires pour élucider l'impact des estrogènes, plus précisément de l'E2, sur l'adipogenèse selon le sexe.

2.3.4 Sensibilité à l'insuline

Plusieurs études mécanistiques *in vitro* ou chez l'animal, ainsi que certaines observations chez les femmes ménopausées subissant une thérapie de remplacement hormonal montrent que les estrogènes ont un impact favorable sur la sensibilité à l'insuline, et ce, par divers mécanismes (128, 135). En effet, certaines études effectuées chez les femmes prenant de l'hormonothérapie démontrent un meilleur contrôle glycémique chez les diabétiques (136, 137). Parallèlement à ces résultats, certains chercheurs observent une augmentation de la sensibilité à l'insuline grâce à une diminution de la néoglucogenèse et de la glucogénolyse hépatique (138), une augmentation de la sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans (139, 140) ainsi que la prévention de l'apoptose des cellules bêta du pancréas (141) chez la souris. Des résultats semblables ont été observés chez une cohorte de femmes ménopausées diabétiques traitées à l'E2 (142). Cependant, l'effet des estrogènes sur la sensibilité à l'insuline peut être modulé de manière différente selon le ER. Chez la souris, une étude réalisée par Barros et collaborateurs (143) démontre que la prise musculaire de glucose peut être augmentée par ER α , celui-ci régulant positivement la présence de GLUT4 sur les membranes des cellules musculaires. Dans cette même étude, ER β a l'effet inverse, soit un effet suppresseur sur GLUT4 (143). Une étude réalisée chez la souris démontre aussi une diminution de la sensibilité à l'insuline chez les femelles GPR-KO, alors que les mâles ne sont pas affectés (124). Cet effet serait attribuable à une diminution de la sécrétion d'insuline dans les îlots du pancréas (124). De manière contradictoire, une augmentation de la résistance à l'insuline a été observée chez les souris mâles GPER-déficientes (125).

2.3.5 Adipokines

La relation entre l'E2 et la leptine a été examinée par plusieurs chercheurs. La leptine circulante a été associée positivement à l'E2 chez les femmes

préménopausées, mais cette association n'a pas été observée chez les femmes ménopausées après ajustement pour l'IMC (144). Par ailleurs, aucune autre association n'a été détectée avec les autres adipokines mesurées (144). L'incubation d'adipocytes murins avec de l'E2 entraîne une augmentation de l'expression du gène ob ainsi que de la sécrétion de leptine (145). Une variation de la leptine circulante durant le cycle menstruel a été observée dans la littérature, comparativement à un état stable chez les femmes ménopausées ou les hommes (146). Cependant, une étude récente rapportant des variations de leptine durant le cycle menstruel de femmes minces à obèses conclut que, bien qu'une concentration plus élevée de leptine est observée chez les femmes obèses, aucune association n'a été détectée entre l'E2 et la leptine (147). Des études supplémentaires, tenant en considération la masse grasse totale, sont nécessaires afin d'établir la nature de la relation entre la leptine et les estrogènes.

Peu d'études ont examiné la relation entre les estrogènes et d'autres adipokines, telles que l'adiponectine et la résistine (126). Parmi les études disponibles, les résultats sont équivoques concernant ces deux adipokines (126).

2.3.6 Cytokines inflammatoires

Plusieurs chercheurs ont tenté d'étudier la relation entre les estrogènes et la concentration plasmatique de cytokines pro-inflammatoires. Notamment, l'association entre la protéine C-réactive (CRP) et l'E2 a été étudiée par plusieurs chercheurs. Une augmentation de la CRP en réponse à l'instauration d'une thérapie de remplacement hormonal (148, 149) et de contraceptifs oraux (148) a été démontrée. De manière contradictoire, les estrogènes ont aussi été associés à une amélioration de certains autres marqueurs d'inflammation tels que l'homocystéine (149, 150) ou certaines protéines d'adhésion cellulaire (sICAM-1) (150). L'effet de la supplémentation estrogénique sur la CRP a été suggéré par plusieurs chercheurs comme un effet du premier passage des estrogènes au foie (148, 150). L'observation que la prise de contraceptifs oraux entraîne l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires hépatiques (fibrinogène, céruloplasmine), mais n'a aucun effet sur les cytokines pro-inflammatoires

périphériques (IL-6, sérum amyloïde A) abonde dans ce sens (148). De manière intéressante, une étude réalisée par Cossette et collaborateurs montre que l'E2 diminue la sécrétion de CRP ainsi que plusieurs autres cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, ICAM-1, VCAM-1) sur les cellules endothéliales humaines (151).

L'importance des estrogènes dans l'homéostasie métabolique n'est plus à démontrer. Cependant, leurs effets directs sur plusieurs phénomènes biologiques restent encore à être élucidés. L'effet différent des estrogènes selon le sexe de l'individu, la phase reproductrice de la femme (préménopause versus ménopause), l'aspect endogène ou exogène de l'hormone ainsi que l'impact parfois opposé des différents récepteurs complexifient l'étude de ces mécanismes. Dans le chapitre 1, nous avons réalisé une étude originale qui vise à clarifier l'association transversale entre les taux d'estrogènes, l'accumulation adipeuse et la résistance à l'insuline chez la femme ménopausée. Par ailleurs, la prochaine section portera sur le rôle d'autres hormones sexuelles, soit les androgènes, sur le métabolisme humain.

3. Androgènes circulants chez l'humain

Les androgènes, typiquement associés au développement du système reproducteur et des caractères sexuels secondaires chez l'homme (152), ont aussi suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs dans les dernières années. Notre équipe de recherche a réalisé une revue approfondie de la littérature sur l'impact des androgènes chez l'humain (6). Les principaux résultats et conclusions de cette revue seront présentés dans cette section.

La testostérone (T) est une hormone sexuelle produite majoritairement par les cellules de Leydig dans les testicules de l'homme (152). Ces cellules produisent aussi, en moins grande quantité, le $\Delta 4$ et la dihydrotestostérone (DHT) (152). Le $\Delta 4$ est un précurseur androgénique de la T. La DHT est un métabolite et un androgène beaucoup plus puissant que la T, bien qu'elle soit présente en moins grande quantité dans le système circulatoire (153). Chez la femme, la T circulante est produite par la conversion de précurseurs tels que le $\Delta 4$ par les tissus

périphériques (152). De plus, la déhydroépiandrostérone (DHEA) ainsi que son homologue sulfaté [déhydroépiandrostérone-sulfate (DHEA-S)], deux stéroïdes inactifs majoritairement produits par la glande surrénale, sont des précurseurs importants de la conversion stéroïdienne dans les tissus périphériques (154). Tel que mentionné précédemment, le tissu adipeux est un site de conversion de plusieurs stéroïdes qui est étudié depuis plusieurs années par de nombreuses équipes de recherche (voir figure suivante) (94).

Comme l'E2, la majorité de la T est liée à l'albumine ou à la SHBG, représentant respectivement 60-65% et 35-40% de la fraction circulante (155). Ainsi, la T peut être exprimée sous forme de T totale, T biodisponible (fraction libre et liée à l'albumine) ou T libre. La T libre peut être mesurée directement, ou estimée par une équation basée sur la masse moléculaire (156). De même, l'indice d'androgène libre (FAI), calculé par la division de la T totale par la concentration plasmatique de la SHBG (156) est aussi un indice couramment utilisé. Ainsi, la diversité d'expression de la T dans la littérature complexifie l'interprétation des résultats actuellement disponibles.

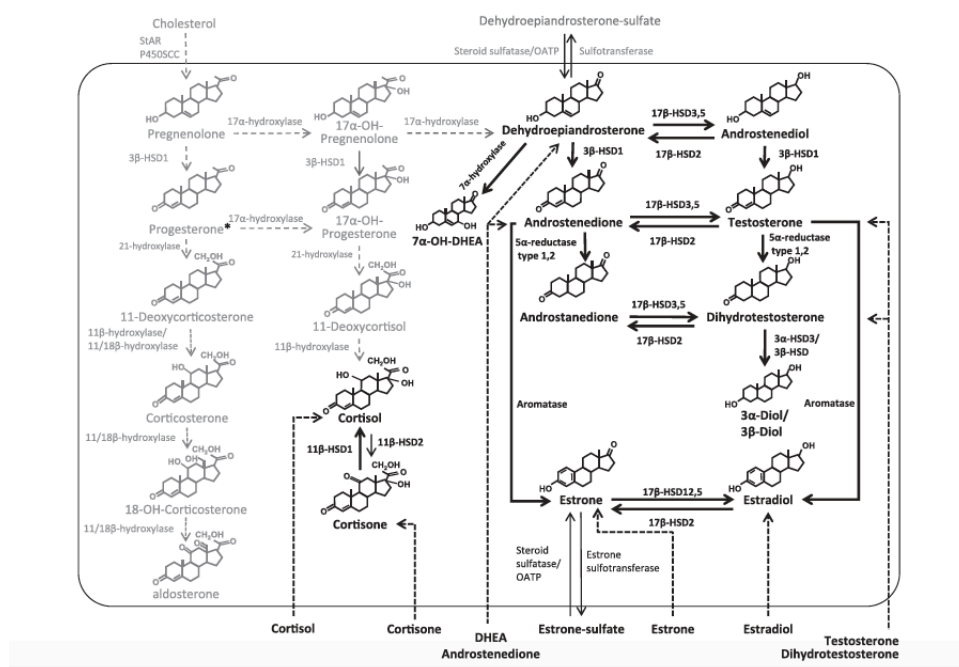


Schéma de chemins de conversions enzymatiques stéroïdiens dans les tissus adipeux humains. Tirée de Tchernof et collaborateurs (94).

Certaines considérations méthodologiques doivent ici être exposées. L'utilisation de méthodes de mesure standardisées permet de déterminer adéquatement la concentration plasmatique de la T chez l'homme, alors qu'une très grande variabilité est observée chez la femme (157). La T peut être mesurée par essai direct, ce qui inclut le RIA ou la méthode immuno-enzymatique par dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA) (156). La T peut être aussi mesurée par extraction ou par chromatographie, ces dernières méthodes étant plus précises, mais requérant des mesures de validation supplémentaires (156). Il a été suggéré par les auteurs que l'extraction ou la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse demeurent les méthodes les plus recommandées (156).

3.1 Androgènes circulants chez l'homme

Une association inverse entre l'adiposité, particulièrement l'accumulation au niveau abdominal, et le taux de T circulante chez l'homme est bien démontrée (6). De même, une augmentation du risque de développer le syndrome métabolique est observée lorsque le taux de T circulante est faible (158-160). Cette association a été validée par une méta-analyse incluant 20 études démontrant que les hommes souffrants du syndrome métabolique sont caractérisés par un taux de T circulante plus bas que ceux ne souffrant pas de ce syndrome (différence de moyenne de la T totale : -2,85; 95%CI : -3,34 à -2,36) (161). Certains auteurs ont aussi examiné la relation entre certains précurseurs stéroïdiens de la T, tels que la DHEA et la DHEA-S, et l'adiposité chez l'homme. La majorité des études démontrent une association négative entre l'obésité abdominale et le taux de DHEA circulant (162), alors que les résultats sont équivoques pour le DHEA-S (162).

Il est bien démontré que la thérapie de remplacement hormonal augmente la masse maigre et diminue la masse grasse chez l'homme, comme le montrent deux méta-analyses publiées en 2016 (163, 164). Cependant, la CT, l'IMC et la perte de poids ne semblent pas être affectés par la thérapie de remplacement hormonal selon les études cliniques randomisées contrôlées (164), alors qu'une diminution de ces mesures d'adiposité est observée dans les études observationnelles (163).

Suite à des sous-analyses effectuées par notre laboratoire, nous offrons comme explication que ces différences s'expliqueraient par l'hétérogénéité des caractéristiques initiales des participants des études cliniques et observationnelles dont l'âge, l'IMC et la valeur de T initiale (6). Ainsi, les hommes ayant moins de 60 ans, avec un IMC supérieur à 30 kg/m² et une valeur de T initiale plus faible répondraient mieux au traitement de remplacement hormonal (6). Ces résultats pointent vers l'importance de certaines caractéristiques des participants dans la réponse à la thérapie de remplacement hormonal, ce qui peut complexifier grandement l'interprétation des données probantes actuelles.

3.2 Androgènes circulants chez la femme

L'impact des androgènes circulants chez la femme fait l'objet de controverse. En effet, une idée répandue est que les androgènes sont associés à une augmentation de la masse grasse, particulièrement la masse grasse abdominale, chez la femme. Une légère augmentation de la masse grasse couplée avec une redistribution des graisses au niveau abdominal chez la femme est observée suite à la ménopause, comme il a été mentionné précédemment (voir section 1.3 Dimorphisme sexuel chez l'humain). Comme la ménopause est caractérisée par une diminution majeure des estrogènes par les ovaires (83), le ratio androgènes/estrogènes circulant se retrouve augmenté, supportant ainsi l'hypothèse que les androgènes chez la femme sont associés à une accumulation de gras abdominal plus importante. De plus, plusieurs études démontrant une association positive entre la masse grasse totale et le taux d'androgènes circulants chez la femme ont comme population des femmes souffrant du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) (6). Ce syndrome est caractérisé par une anovulation chronique et une concentration anormalement élevée d'androgènes dans le sang (83). Dans ce contexte pathologique, incluant des concentrations inhabituelles d'androgènes chez la femme, il est impossible de prétendre que ces résultats sont transposables aux femmes sans ovaires polykystiques.

Dans notre revue de la littérature, nous avons rapporté que les résultats d'études transversales mesurant la relation entre la T totale circulante et l'accumulation

abdominale ne sont pas cohérents (6). Par ailleurs, une étude réalisée par Janssen et collaborateurs (165) chez 359 femmes ne démontre pas d'association entre la T totale et l'adiposité viscérale mesurée par TDM. De plus, deux études longitudinales (166, 167) ne voient pas de relations entre le changement de concentration de T circulante et la variation de RTH (167) ou le tissu adipeux viscéral mesurée par TDM (166). Il est cependant à noter que Vaidya et collaborateurs (167) observent une association positive entre la T totale et la masse grasse viscérale de manière transversale. Ainsi, il est impossible d'établir une relation définitive entre la T totale et l'accumulation de gras abdominal chez la femme en santé avec les données actuellement disponibles dans la littérature.

Les résultats sont beaucoup plus concordants concernant la T libre. La majorité des études transversales démontre une relation positive entre sa concentration plasmatique et l'accumulation au niveau abdominal (6). De même, 2 études longitudinales ont démontré une association positive entre la T libre et le tissu adipeux viscéral (165, 168). Cependant, une étude longitudinale observe une relation inverse entre la T libre et l'augmentation de graisse viscérale sur 2 ans (166). Comme décrit précédemment, la T libre peut être estimée ou mesurée de manière diverse, par exemple en utilisant le taux de SHBG circulant. L'hétérogénéité dans les méthodes d'estimation de la T libre ainsi que l'association inverse bien connue entre la SHBG et l'adiposité (169) sont des facteurs confondants dans ces résultats.

Certains chercheurs se sont penchés sur la relation entre la T libre ou totale et l'adiposité totale, souvent estimée avec l'IMC. Ainsi, la majorité des études observent une relation positive entre la T libre et l'IMC (170-174). Cependant, les études longitudinales démontrent des résultats plus conflictuels. Janssen et collaborateurs ont observé que le changement de tissus adipeux viscéral et sous-cutané, mais non le changement de masse grasse totale, était relié positivement à la T biodisponible (175). De même, une étude longitudinale sur une période de 14 ans montre une association transversale entre la T libre et l'IMC et la CT, mais cette association ne perdure pas dans le temps (176). Jones et collaborateurs ont

plutôt observé, sur une période de 6 ans, que la T libre et totale était diminuée chez les femmes ayant perdu du poids durant cette période, alors qu'aucun changement n'a été observé pour les femmes ayant subi un gain de poids (177). Tel que mentionné précédemment, les limites reliées à l'estimation de la T libre peuvent expliquer partiellement ce phénomène. Pour ce qui est de la T totale, la majorité des études n'observent pas de relation entre cette mesure et l'IMC (172, 176, 178-180).

Concernant les autres androgènes circulants, la grande majorité des études rapportant le lien entre le $\Delta 4$ et l'adiposité abdominale n'ont pas trouvé d'association entre ces deux variables (6). Les 3 études ayant examiné le lien entre le taux de DHT et l'adiposité ont trouvé que sa concentration plasmatique est associée négativement à l'accumulation de graisse au niveau viscéral (181-183).

Ainsi, la relation entre le taux d'androgènes circulants chez la femme en santé et l'adiposité demeure équivoque dans la littérature actuelle. La grande hétérogénéité dans la conception des études ainsi que les limites méthodologiques, principalement reliées à la mesure des stéroïdes plasmatiques, sont des facteurs confondants dans les observations présentement rapportées.

3.3 Androgènes et métabolisme

3.3.1 Lipolyse et lipogenèse

La littérature actuelle sur l'impact des androgènes sur la lipolyse et la lipogenèse du tissu adipeux chez le mâle présente des résultats discordants (126). Certaines études montrent que la T entraîne une diminution de la lipolyse stimulée par les catécholamines dans le tissu adipeux viscéral chez le rat (184). Certains investigateurs observent plutôt une augmentation de la réponse lipolytique chez le rat (185) et l'humain (186). De même, certaines études chez l'humain et les rongeurs montrent que la T entraîne une inhibition de la lipogenèse dans le tissu viscéral des rats mâles (187) ainsi qu'une diminution de l'activité de la LPL abdominale chez l'homme (186). Cependant, Varlamov et collaborateurs (188) n'observent pas de différence dans l'expression de gènes liés à la synthèse des

triglycérides [acide gras synthase et triglycéride lipase (TGL)] entre les primates mâles castrés et ceux ayant reçu une injection de T. Concernant le précurseur stéroïdien DHEA, il a été observé chez le rat mâle une augmentation de la lipolyse (189, 190) grâce à une augmentation de l'expression de la HSL et de la TGL (190). L'effet des androgènes sur la lipogénèse et la lipolyse est aussi équivoque chez les femelles. Les rates ovariectomisées et traitées au DHEA ont une activité de la LPL diminuée et une activité de la HSL augmentée (191). La concentration plasmatique de plusieurs androgènes [T, $\Delta 4$ et androstérone (ADT)] a été augmentée chez les rates subissant un traitement au DHEA (191). De même, les adipocytes sous-cutanés de femmes traités au DHEA-S ont une lipolyse augmentée à 2 heures d'incubation (192). Cependant, Dicker et collaborateurs ont observé que la testostérone diminuait la lipolyse induite par les catécholamines dans les préadipocytes sous-cutanés de femmes (193). Une étude chez les macaques femelles montre que la relation entre la lipolyse et la T peut varier durant le cycle menstruel (194). La lipolyse basale des adipocytes viscéraux a été inhibée dans la phase lutéale du cycle, ce phénomène n'ayant pas été observé pour les adipocytes sous-cutanés (194). Ces résultats laissent présager que le ratio androgènes/estrogènes peut affecter leur impact sur le métabolisme et l'homéostasie métabolique, et ce, de manière différente selon le dépôt. En somme, des études supplémentaires sont nécessaires afin d'expliquer clairement la relation entre les androgènes et la lipogénèse et la lipolyse. Les études à venir sur ce sujet devront tenir en compte l'effet du sexe, car ce dernier semble avoir un effet confondant dans cette relation.

3.3.2 Adipogénèse

Les données probantes actuelles tendent à démontrer que les androgènes ont généralement un effet inhibiteur sur l'adipogénèse (126) et diminuent la différenciation des préadipocytes en adipocytes (195). Il a été observé que la T diminuait l'adipogénèse chez le rat en diminuant PPAR γ et un de ses facteurs transcriptionnels, le *zinc-finger protein transcription factor* (ZAC1) (196). Le même phénomène a été observé avec la DHT (196, 197). La diminution de l'adipogénèse

par le DHEA a aussi été observée, mais dans les préadipocytes omentaux seulement (198).

3.3.3 Adipokines

Certains chercheurs ont tenté d'élucider la relation entre la sécrétion de leptine et la concentration d'androgènes. Une étude réalisée *in vitro* a montré que la DHT diminue l'expression du gène ob dans les adipocytes de rat, même si la diminution de sécrétion de leptine n'est pas significative (145). Par contre, dans cette même étude, la castration des rats entraîne une diminution de la transcription du gène ob dans le tissu adipeux sous-cutané, alors que l'inverse est observé dans le tissu adipeux viscéral (145). Ces résultats suggèrent que les androgènes peuvent avoir un impact spécifique dans chaque dépôt. Chez l'humain, une diminution de la sécrétion de leptine et de l'expression du gène ob ont été observées lorsque des adipocytes d'hommes ont été exposés à des doses supra-physiologiques de DHT, mais pas dans les adipocytes provenant de femmes (199). Cependant, une augmentation de la sécrétion de leptine a été observée dans les adipocytes féminins lorsqu'ils étaient exposés à la T (199). Il a été observé que la T et la DHT diminuent la sécrétion de leptine dans les adipocytes sous-cutanés d'adolescents (200). De même, le ratio leptine/IMC est négativement corrélé avec la concentration plasmatique de T chez les garçons, ce phénomène n'étant pas observé chez les jeunes filles (200). Concernant les précurseurs androgéniques, une augmentation de la sécrétion de la leptine provenant des adipocytes féminins a été observée lors de l'exposition au DHEA (199). De manière similaire, le DHEAS augmente l'expression du gène ob dans les adipocytes viscéraux de femmes préménopausées (201). De manière intéressante, l'utilisation d'inhibiteurs d'aromatase bloque l'effet de la T sur la sécrétion de la leptine (199), suggérant que la conversion de la T en E2 peut expliquer cette relation. Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'éclaircir ces mécanismes et d'améliorer notre compréhension de l'impact du genre dans la relation entre les androgènes et la leptine.

La relation entre l'adiponectine et les androgènes est elle aussi controversée. Le traitement des adipocytes 3T3L-1 avec de la T entraîne une diminution de la sécrétion d'adiponectine (202). De manière similaire, la castration chez la souris entraîne une augmentation de l'adiponectine, ce phénomène étant résorbé par l'injection de T (202). Une étude n'a observé aucun effet de la T sur la sécrétion d'adiponectine dans les adipocytes, alors que l'ajout de sérum provenant de sujets masculins diminuait la sécrétion d'adiponectine (203). Ainsi, des études supplémentaires sont nécessaires afin d'élucider cette relation.

L'importance de l'obésité viscérale, et donc de la distribution des graisses, dans les pathologies associées à l'obésité n'est plus à démontrer. Une partie du rôle des hormones sexuelles dans ce phénomène est connu, bien que les mécanismes sous-jacents sont toujours à être élucidés. De même, l'impact des androgènes et des estrogènes sur l'homéostasie métabolique est établi, bien que plusieurs disparités soient observées dans les études sur les mécanismes d'action. La précision et la spécificité des méthodes de mesures, l'impact du sexe de l'individu, la balance hormonale et les rôles parfois conflictuels des récepteurs rendent l'étude et la mise en lumière de ce phénomène difficile. Ceci est particulièrement vrai chez la femme, où la ménopause semble avoir un impact sur le rôle des stéroïdes dans l'organisme. Ainsi, le **chapitre 1** de ce mémoire portera sur l'impact des estrogènes circulants sur la distribution des graisses ainsi que sur les altérations métaboliques chez la femme ménopausée. Le **chapitre 2** discutera plutôt sur l'impact des androgènes sur la distribution des graisses chez la femme préménopausée.

Objectifs et hypothèses

Objectif général

L'objectif général de ce mémoire est de définir la relation entre les niveaux circulants d'hormones stéroïdiennes et la distribution des graisses chez la femme, ainsi que leurs liens avec les facteurs de risque cardiométabolique.

Notre hypothèse générale est que l'adiposité chez la femme est associée à la concentration plasmatique d'estrogènes et d'androgènes. Ces patrons d'associations pointent vers l'importance de la conversion des stéroïdes dans les tissus adipeux.

Ce mémoire est séparé en deux chapitres spécifiques, chacun d'entre eux traitera d'un objectif spécifique différent.

Objectifs spécifiques

Chapitre 1 : L'impact des estrogènes circulants sur la masse adipeuse et sur les altérations métaboliques chez la femme ménopausée

L'objectif spécifique de ce chapitre est d'examiner la relation entre les taux estrogéniques circulants et l'adiposité chez la femme ménopausée. Nous émettons l'hypothèse que la concentration d'E2 circulant chez la femme ménopausée est proportionnelle à la masse grasse totale, ce qui explique le lien entre l'E2 et les altérations des paramètres métaboliques.

Chapitre 2 : Les taux de stéroïdes circulants et le phénotype du tissu adipeux chez la femme préménopausée

L'objectif spécifique de ce chapitre est d'observer le patron d'hormones stéroïdiennes circulant, leurs précurseurs et leurs métabolites, relatif à l'obésité abdominale chez la femme préménopausée. Nous émettons l'hypothèse que l'obésité abdominale est associée à une diminution des marqueurs de synthèse d'androgènes et leurs métabolites. Ces modifications sont des déterminants importants de la présence concomitante d'altérations métaboliques.

Chapitre 1 : L'impact des estrogènes circulants sur la masse adipeuse et sur les altérations métaboliques chez la femme ménopausée

Geneviève B. Marchand, Anne-Marie Carreau, John S Weisnagel, Jean Bergeron, Fernand Labrie, Simone Lemieux et André Tchernof

L'article composant ce chapitre s'intitule:

Increased body fat mass explains the positive association between circulating estradiol and insulin resistance in postmenopausal women

Cet article sera publié dans le journal :

American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism

Il est présentement disponible en prépublication sous forme électronique.

Résumé

La relation entre le taux d'estrogènes circulants et les facteurs de risque cardiométabolique tels que la résistance à l'insuline est équivoque chez la femme ménopausée. Il a été rapporté qu'une concentration élevée d'estradiol (E2) prédit une augmentation du risque de développer le diabète de type II dans cette population. Nous avons examiné les associations entre les taux estrogéniques, l'adiposité et les variables de risque cardiométabolique incluant la résistance à l'insuline chez les femmes ménopausées. 101 participantes en santé (moyenne \pm DS: âge 57 ± 4 ans; IMC $27,9 \pm 4,8$ kg/m²) ont été incluses dans ces analyses. 15 stéroïdes et métabolites plasmatiques ont été mesurés par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. La sensibilité à l'insuline a été mesurée grâce à un clamp euglycémique-hyperinsulinémique. La composition corporelle ainsi que la distribution des graisses ont été déterminées par pesée hydrostatique et tomodynamométrie, respectivement. Le profil lipidique ainsi que les taux de cytokines circulants ont aussi été examinés. L'E2 circulant était positivement associé avec toutes les mesures d'adiposité ($r=0,62$ à $0,42$; $p<0,0001$) sauf le RTH. L'E2 était aussi positivement corrélé avec le VLDL-cholestérol, au contenu en triglycérides dans le plasma, les VLDL et les HDL ($r=0,31$ à $0,24$; $p<0,02$) ainsi qu'avec le hs-CRP et l'IL-6 ($r=0,52$ et $0,29$; $p<0,005$) et négativement associé au taux d'HDL-cholestérol, l'adiponectine et la sensibilité à l'insuline ($r=-0,36$ à $-0,20$; $p<0,02$). Après ajustement pour le pourcentage de masse grasse, les corrélations entre l'E2 et les variables de risque métabolique n'étaient plus significatives. Des résultats similaires ont été observés pour les taux circulants d'estrone (E1) et d'estrone-sulfate (E1-S). En conclusion, les concentrations d'estrogènes circulants sont proportionnelles à la masse adipeuse chez les femmes ménopausées, même si elles restent en concentration faible. La résistance à l'insuline ainsi que des altérations du profil lipidique et de la concentration des cytokines sont observées lorsque le taux d'estrogènes plasmatique est plus élevé, mais ces différences sont expliquées par la variation concomitante de la masse grasse.

Increased body fat mass explains the positive association between circulating estradiol and insulin resistance in postmenopausal women

Geneviève B Marchand^{a,b}, Anne-Marie Carreau^{b,c}, S John Weisnagel^d, Jean Bergeron^d, Fernand Labrie^e, Simone Lemieux^{a,f}, André Tchernof^{a,b}

^a School of Nutrition, Laval University, Quebec City, Canada, ^bQuebec Heart and Lung Institute, Quebec City, Canada, ^cDepartment of Medicine, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Canada ^dCHU de Quebec-Université Laval Research Center, Quebec City, Canada, ^eEndoceutics Inc, Quebec City, Canada, ^fInstitute of Nutrition and Functional Foods, Quebec City, Canada

Email addresses: genevieve.marchand@criucpq.ulaval.ca; Anne-Marie.Carreau@USherbrooke.ca; john.weisnagel@crchudequebec.ulaval.ca; jbergeron_4@sympatico.ca; fernand.labrie@endoceutics.com; Simone.Lemieux@fsaa.ulaval.ca; andre.tchernof@criucpq.ulaval.ca

Running head: Estradiol and insulin resistance in postmenopausal women

Keywords: Estrogens, postmenopausal women, body composition, hyperinsulinemic-euglycemic clamp, computed tomography

Address for correspondence: Andre Tchernof, Ph.D.
Quebec Heart and Lung Institute - Laval University
2725 Chemin Sainte-Foy (Y-4323)
Québec, PQ
CANADA G1V 4G5
Tel: 418-656-8711
Email: andre.tchernof@criucpq.ulaval.ca

Abstract

The relationship between circulating estrogen levels and cardiometabolic risk factors such as insulin resistance is unclear in postmenopausal women. High estradiol (E2) levels have been reported to predict increased risk of type 2 diabetes in this population. We aimed to examine associations among estrogen levels, adiposity measurements and cardiometabolic risk variables including insulin resistance in postmenopausal women. 101 healthy participants (mean±SD: age 57±4 years; BMI 27.9±4.8 kg/m²) were included in the analysis. Fifteen plasma steroids or metabolites were measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Insulin sensitivity was assessed with a hyperinsulinemic-euglycemic clamp. Body composition and fat distribution were determined with hydrostatic weighing and computed tomography respectively. Blood lipids and circulating cytokines were also measured. Circulating E2 was positively correlated with all adiposity indices (r=0.62 to 0.42, p<0.0001) except waist-to-hip ratio. E2 was positively correlated with VLDL-cholesterol, plasma-, VLDL- and HDL-triglyceride levels (r=0.31 to 0.24, p<0.02) as well as with hs-CRP and IL-6 (r=0.52 and 0.29, p<0.005) and negatively with HDL-cholesterol, adiponectin and insulin sensitivity (r=-0.36 to -0.20, p<0.02). With adjustments for percent body fat, correlations between E2 and metabolic risk variables were no longer significant. Similar results were observed for circulating estrone (E1) and estrone-sulfate (E1-S) levels. In conclusion, circulating estrogen concentrations are proportional to adipose mass in postmenopausal women although they remain in the low range. Insulin resistance as well as altered blood lipids and cytokines are observed when circulating estrogen levels are high within that range, but these differences are explained by concomitant variation in total adiposity.

Introduction

Estrogens play important roles in the development and function of the reproductive system in women, but the presence of estrogen receptors in a variety of peripheral, non-reproductive tissues, notably in the liver, skeletal muscle, central nervous system and adipose tissue (16) suggests a crucial role of these steroids in metabolic homeostasis. The two most biologically important estrogens in women are estradiol (E2) and estrone (E1) (41), whereas E1-S is one of the major circulating estrogen metabolites (45). The menopause transition is characterized by important alterations in circulating hormones, including a substantial decrease in ovarian estrogen secretion (6). In postmenopausal women, positive correlations were reported between E2 or E1 concentrations and adiposity estimates such as the body mass index (BMI) or waist circumference (WC) (3,18). Conversely, intervention studies with estrogen therapy in postmenopausal women have shown either a decrease in (21) or no effect on (10,12) body fat mass. In the scant data available for E1, some studies show a decrease in plasma E1 concentration with weight loss (49) or a positive correlation between plasma E1 level and BMI (34,37). A study with E1-S reported similar results (34).

The association between plasma estrogen concentrations and cardiometabolic alterations, including insulin resistance, has also been investigated. Estrogens may improve insulin response or insulin sensitivity through various mechanisms such as increased insulin synthesis in Langerhans islets, higher GLUT4 expression in skeletal muscle or decreased hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis (16,38), although these effects may be dependent on time since menopause (43). A recent meta-analysis coupled with a longitudinal study concluded that total circulating E2 was positively associated with the risk of type 2 diabetes in postmenopausal women independently of BMI (40). A commentary on the latter study proposed that aside from the belief that estrogens impair carbohydrate metabolism, circulating E2 in postmenopausal women may not be the driver of estrogen action, but the reflection of leakage from extragonadal synthesis sites including an expanded adipose tissue mass (36). This hypothesis has not been directly tested.

The relationship between circulating androgens and adipose accumulation in women is quite equivocal, likely because of methodological limitations, as we observed in a previous literature survey (11). A positive correlation is often reported between free testosterone (T) and abdominal fat accumulation in women without androgen excess (19,20,23,39), but we have reported a negative relationship between circulating dihydrotestosterone (DHT) levels and visceral fat accumulation (11).

In the present study, we examined the relationships among plasma estrogen levels, adiposity indices and cardiometabolic risk variables including insulin resistance in postmenopausal women. Other steroids were also examined. Based on available data, we tested the hypothesis that total body fat mass explains the positive association between circulating estrogen levels and measurements of insulin resistance in postmenopausal women.

Subjects and methods

Subjects

In this cross-sectional study, 131 postmenopausal women were recruited through the local newspapers of Quebec City, Canada. This is a secondary analysis of a study primarily aimed at estimating the relative contribution of visceral adiposity and insulin resistance to cardiometabolic risk (44). All subjects provided written, informed consent in accordance with the Ethics Committee of the CHU de Québec Medical Center-Université Laval. Eligibility criteria were the following: postmenopausal (absence of menses for at least one year), weight stability, no hormonal therapy or other medication for chronic diseases (coronary heart disease, dyslipidemia, diabetes, endocrine diseases). Women included in this study were generally healthy, and therefore, were not under treatment for the above-mentioned conditions except hypothyroidism treated with a stable dose of thyroxine. Five women without a previous diabetes diagnosis presented hyperglycemia at the time of testing. Circulating follicle-stimulating hormone level was measured to confirm menopausal status (between 28 and 127 IU/L). Twelve participants were excluded from the present analysis because circulating hormone levels could not be measured. Moreover, despite excluding women using hormone therapy, a small number of participants had estrogen levels that were not consistent with a lack of hormone therapy. A total 14 participants were excluded from the study: 5 participants had high plasma E2 levels (111.16 to 644.66 pg/mL); 8 participants were excluded based on a value of $E2 \geq 20$ pg/mL, which corresponds to levels that are at least twofold higher than the values for normal postmenopausal levels (10 pg/mL) as determined by the Mayo Clinics criteria (1). A previous study has shown that the 95th percentile of E2 levels in postmenopausal women not taking hormone therapy is 9.3 pg/mL (29), consistent with the Mayo Clinics cutoff; 1 woman was excluded based on a value of $E2 \geq 12.4$ pg/mL (upper 99% tolerance limit with 95% confidence) and serum DHEA ≤ 3.13 ng/mL (mean plus one SD) as determined in a previous study of postmenopausal women not using hormonal therapy (29). They were excluded from the analysis because they could mask or

impact the association between endogenous estrogens and metabolic variables. Participants whose menopause resulted from hysterectomy with total oophorectomy (n=3) or hormonal therapy (n=1) were also excluded. A total of 101 postmenopausal women were included in this study.

Body composition and fat distribution

Anthropometric measurements (height, body weight, waist and hip circumferences) were obtained with standard procedures as described previously (42). Body composition measurements were obtained from body density measured by the hydrostatic weighing technique, as previously described (42). Briefly, body density was obtained with the mean of 6 measurements of the participant's body density by complete immersion in a hydrostatic tank. Pulmonary residual volume was measured with the helium dilution method before immersion. Percent body fat was calculated with the Siri equation and total body fat was obtained by multiplying percent body fat with body weight. Computed tomography (CT) was used for the measurement of abdominal and mid-thigh adipose tissue cross-sectional areas, as described (17,42). Patients were examined in the supine position with arms stretched above the head. A skeleton radiograph was used to establish the scanning position. Measurements at the L4-L5 vertebrae level and at half distance between iliac crest and knee were performed. Tissue with attenuation between -30 to -190 Hounsfield units was considered as fat. Fat area surrounded by the muscle wall in the abdominal cavity was considered as visceral fat. Subcutaneous fat was obtained by the subtraction of visceral fat from total abdominal fat area. All measurements were performed with a GE High Speed Advantage scanner (GE Medical Systems, Milwaukee, WI).

Oral glucose tolerance test (OGTT)

On the morning of a 12h-fast, a 75g OGTT was performed and blood samples were collected through a venous catheter from an antecubital vein at -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 and 180 min in EDTA-containing tubes.

Hyperinsulinemic-euglycemic clamp

The hyperinsulinemic-euglycemic clamp, as developed by DeFronzo et al. (13) was used to determine insulin sensitivity, as previously described (44). After a 12h fast, insulin (Humulin R 40; 40 mU/m²/min) was perfused for 2h and plasma glucose levels were monitored every 5 min using a glucometer (Bayer Corporation, inc. Tarrytown, NY) and later confirmed by enzymatic method (46). 20% dextrose IV perfusion was adjusted to achieve euglycemia. Steady state was attained after 2 hours. Plasma insulin concentration was later documented by radioimmunoassay in blood samples taken at 10-min intervals and stored at -20°C. Glucose disposal rate (GDR) was determined by dividing the glucose infusion rate during the last 30 min of the clamp by body weight in kilograms. Insulin sensitivity (MI) was calculated by dividing GDR by the mean insulin concentration during the last 30 min of the clamp.

Plasma measurements

During the OGTT, plasma glucose and insulin concentrations were measured at each time point with an enzymatic method (46) and a radioimmunoassay with polyethylene glycol separation (14), respectively. C-peptide was also measured with a polyclonal antibody and ethylene glycol precipitation by a modification of the Heding method (14,22). Free fatty acids (FFA) were measured spectrophotometrically in the fasting state (Wako Chemicals, Neuss, Germany).

Blood samples were collected on the morning of the clamp. A total of 15 steroids and metabolites were measured in plasma by liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (24,25). These steroids and/or metabolites are androstenedione (Δ 4), androstenediol (Δ 5), DHEA, DHT, E1, E2, T, androstenediol-glucuronide (AD17G), androsterone-glucuronide (ADTG), ethiocholanolone-glucuronide (ETIOG), androsterone-sulfate (ADT-S), dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S), E1-S, allopregnanolone-sulfate (AlloP-S) and pregnenolone-sulfate (Preg-S). Samples were submitted to liquid-liquid or solid phase extraction before being injected into the LC-MS/MS system as

described (24,25). Validation was performed according to FDA guidelines. Mean circulating steroid values of the participants were 470 ± 191 pg/mL for $\Delta 4$, 308 ± 142 pg/mL for $\Delta 5$, 2704 ± 1420 pg/mL for DHEA, 45.8 ± 24.2 pg/mL for DHT, 23.2 ± 9.9 pg/mL for E1, 5.21 ± 3.30 pg/mL for E2, 159 ± 82 pg/mL for T, 624 ± 404 ng/mL for AD17G, 15.6 ± 9.5 pg/mL for ADTG, 19.4 ± 9.1 pg/mL for ETIOG, 298 ± 174 pg/mL for ADT-S, 248 ± 216 pg/mL for E1-S, 1.10 ± 0.94 pg/ml for AlloP-S and 22.3 ± 13.3 pg/mL for Preg-S.

Triglycerides (TG) and total cholesterol (TC) measurements were performed as previously described (35) using enzymatic techniques (Randox Laboratories, Crumlin, U.K). Lipoprotein fractions including very-low-density lipoproteins (VLDL), low-density lipoproteins (LDL) and high-density lipoproteins (HDL) were isolated by ultracentrifugation and precipitation (7). High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) was measured in plasma using latex-enhanced high sensitivity assay with Behring Nephelometer BN-100 (Behring Diagnostic, Westwood, MA). Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and adiponectin concentrations were assessed by ELISA with a Quantikine HS Immunoassay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Statistical analyses

Incremental area under the curve (IAUC) of glucose, insulin and C-peptide responses during OGTT were calculated. To elucidate the relationship between circulating estrogens and insulin resistance, insulinogenic index (IGI; $\text{Insulin 30 min} - \text{basal} / \text{Glucose 30 min} - \text{basal}$), disposition index (DI; IGI / MI) and adipose tissue insulin resistance index (adipo-IR; $\text{baseline FFA} \times \text{fasting insulin}$) were calculated. Pearson correlations were computed to quantify associations between adiposity indexes or cardiometabolic risk variables and steroid levels. For visual representation, further analyses of estrogen levels were performed by stratifying the sample into tertiles of E2, E1 or E1-S. Differences in IAUC, MI, baseline FFA, circulating cytokine levels or the lipid profile among estrogen tertiles were determined by ANOVA and the Tukey's HSD post hoc test. Partial correlation analyses were performed to adjust for concomitant variation in percent body fat.

Moreover, stepwise multivariate linear regression models were used to adjust associations between steroid levels and metabolic risk variables for adiposity indexes. Box-Cox or \log_{10} transformation was used for nonnormal distributions, as determined with the Shapiro-Wilk test. P-values ≤ 0.05 were considered significant. All statistical analyses were performed with JMP or SAS software (SAS Institute, Cary, NC).

Results

Population characteristics

Population characteristics are shown in Table 1. Mean age was 57 ± 4 years (range: 48-68). Women were overweight with an average BMI of 27.9 ± 4.8 kg/m². Average values for plasma lipid concentrations fell within the normal ranges. Mean fasting blood glucose and blood pressure were also in the normal range.

Adiposity, metabolic alterations and circulating estrogen concentrations

Pearson correlations of levels of steroids or metabolites with adiposity or metabolic parameters are presented in Table 2. Plasma E2 concentration was positively and significantly correlated with all adiposity measurements except for the waist-to-hip ratio. E2 levels were 3.26 ± 1.24 , 4.55 ± 2.81 and 8.00 ± 3.53 pg/mL in normal weight, overweight and obese women respectively ($p < 0.0001$). In each of these BMI categories, mean adipose tissue mass was 19, 28 and 39 kg respectively. The ratios of E2 concentrations divided by adipose tissue mass were 0.18, 0.16 and 0.20 pg/mL per kg of body fat in lean, overweight and obese women respectively.

Positive correlations were also observed with metabolic parameters such as fasting FFA, blood lipids, pro-inflammatory cytokines and adipo-IR. Negative correlations were detected between E2 level and HDL-C as well as MI. Much like E2, E1 concentration was positively and significantly correlated with all adiposity indexes, except the waist-to-hip ratio. Circulating E1 was also positively correlated with fasting FFA, some blood lipid indexes, adipo-IR and pro-inflammatory cytokine concentrations. A negative correlation was found with MI. Plasma E1-S levels were also significantly and positively correlated with all adiposity measurements. Plasma E1-S levels were significantly and positively correlated with many metabolic parameters, namely, fasting FFA, adipo-IR, pro-inflammatory cytokine levels, glucose IAUC during the OGTT, and blood lipids. E1-S was also negatively correlated with MI, HDL-C and adiponectin concentration.

Differences in metabolic parameters according to plasma E2 concentration tertiles are shown in Figure 1. Women in the upper E2 tertile were characterized by higher fasting FFA, lower MI, higher adipo-IR, an altered lipid profile and higher pro-inflammatory cytokines. For E1 (Figure 2), women in the upper tertile had significantly higher fasting FFA, HDL-TG, hs-CRP and lower MI. Participants in the upper E1S tertile (Figure 3) had higher glucose IAUC during the OGTT, higher fasting FFA, lower MI, higher adipo-IR, an altered lipid profile and higher levels of inflammatory cytokines.

Correlations between E2 and metabolic parameters were adjusted for percent body fat mass as shown in Figure 4. All correlations were no longer significant after this adjustment. After adjustment of correlations between E1 and metabolic parameters for total body fat percentage, only the associations between circulating E1 and hs-CRP or HDL-TG remained significant. Finally, the positive correlations between E1-S levels and concentrations of TG, VLDL-C and VLDL-TG also remained significant after the adjustment. Multivariate linear regression analyses shown in Table 3 were consistent with these findings. Body fat percentage explained between 17 and 37% of the variance in metabolic parameters when this variable was included along with circulating E2 in the models. In the majority of the models, E2 concentration did not have a significant contribution to metabolic parameters, except for plasma levels of TG, VLDL-TG and hs-CRP. Similarly, percent body fat explained 17-37% of the variance in metabolic parameters when circulating E1 was included in the models. The contribution of E1 was significant for plasma levels of VLDL-C, HDL-TG and hs-CRP. Regarding E1-S, percent body fat again explained 17-37% of the variance in metabolic parameters. E1-S had a significant contribution to the variance in fasting FFA, MI, Adipo-IR, HDL-C and IL-6.

Other steroids

Correlations between androgens, androgen/estrogen metabolites or precursors and adiposity or metabolic parameters are shown in Table 2. Levels of some androgens and their metabolites ($\Delta 5$, DHEA, ADTG) were negatively correlated with age. Moreover, positive correlations were observed between androgen

precursors ($\Delta 5$, DHEA, DHEAS) as well as glucuronide conjugates (ETIOG, ADTG, AD17G) and fat-free mass. Even if some positive correlations were observed between levels of androgens, precursors and/or metabolites with adiposity or metabolic parameters, no specific pattern could be established when circulating levels of these steroids and adiposity indexes or risk variables were examined.

Discussion

The present data show lower clamp-measured insulin sensitivity in women with higher plasma estrogen concentrations. Higher plasma estrogen concentrations were also linked to altered blood lipids and a proinflammatory cytokine profile. However, strong and positive correlations were concomitantly observed between circulating estrogens and all indexes of overall adiposity. Most of the associations between high estrogen levels and markers of altered metabolic homeostasis were explained by concomitant variation in percent body fat, suggesting a statistical contribution of adiposity to both estrogen concentrations and metabolic variables. To our knowledge, this is the first study to precisely evaluate the link between estrogens, adiposity and insulin resistance in postmenopausal women.

A highly accurate method (hydrostatic weighing) was used to estimate body fat mass, which allows, for the first time, the possibility of estimating the amount of E2 generated in the circulation as a function of total adipose tissue mass. These ratios were, on average, fairly constant in lean, overweight and obese women, suggesting that circulating estrogen concentrations are, indeed, proportional to adipose mass. However, levels clearly remain in the very low range, as demonstrated before (28). This may explain previous discrepancies in studies using less sensitive methods for estrogen measurements and anthropometric assessments of adiposity levels (3,37,50). The impact at the tissue or cell level of hormones synthesized locally through intracrine mechanisms remains of great interest for continuing research on intra-adipose synthesis of active hormones. Interestingly, the activity of aromatase is upregulated with increasing age (9) but in this study, no correlation was found between the circulating E2-to-fat-mass ratio and age. Moreover, associations between estrogens and adiposity were systematically stronger with indicators of total adiposity compared with indicators of abdominal fat accumulation, suggesting that circulating estrogens were more closely associated with total, rather than visceral, body fat mass. Our group already reported that aromatase mRNA expression is not higher (and even tends to be lower) in visceral adipose tissue than in the subcutaneous fat compartment (4).

In our study, circulating estrogen levels were positively correlated with insulin resistance. However, these associations were mostly absent when adjustment was made for percent body fat. These results suggest that total fat mass is the main factor in relation to insulin resistance and circulating estrogens in postmenopausal women. Many studies have reported a positive correlation between body fat mass and plasma E2 concentrations in women (2,3,8,18,37). Moreover, a recent meta-analysis has shown a positive relation between circulating E2 and type 2 diabetes in postmenopausal women (40). In that study, the relation was still significant when adjustment was made for BMI. In our study, women were tested with more precise methods for body composition and adipose tissue distribution, as well as insulin sensitivity and hormone concentrations. Discrepancies in the literature could also partly be explained by the assay method for plasma E2. A consensus statement by the Council of The Endocrine Society proposed that conclusions drawn from epidemiological studies are limited by the variability and quality of the assays used (47). E2 measurement is especially challenging for individuals with very low E2 concentrations such as patients taking aromatase inhibitors, children, men or postmenopausal women (47). Gas chromatography coupled with mass spectrometry is recognized as an accurate method (26), but it has been largely replaced by tandem mass spectrometry coupled with liquid chromatography (24,30,31).

Although most associations between plasma estrogen levels and metabolic parameters were dependent on percent body fat, some significant correlations persisted between blood lipids and E1-S concentrations in our sample. One previous study observed a positive correlation between blood TG and E1-S in African American premenopausal women but not in Caucasians after adjusting for BMI (32). Postmenopausal women treated with 0.625 mg of E1-S per day for 12 days had significantly higher blood TG and VLDL-C levels (33). More studies are obviously needed to assess the impact of E1-S on the lipid profile. Presumably, these effects are less dependent on fat mass both from the statistical and physiological standpoints than those of E2 and E1. One possible explanation is the longer half-life of E1-S (48) possibly providing a more representative portrait of

long-term estrogen exposure. In our study, we observed that correlations with metabolic parameters remained significant for E1-S, but not with the two other estrogens, suggesting that the association among metabolic alterations, adiposity and estrogens could differ slightly from an estrogen to another. This could explain prior discrepancies in the literature on estrogens and insulin resistance or glucose tolerance.

In the present sample, plasma levels of many androstanes were positively correlated with some adipose tissue markers, but results were inconsistent and not generalized to all androgens and androgen precursors or metabolites. In a literature survey, we concluded that discrepancies in the current literature prevent any firm conclusion regarding a positive relationship between androgens and abdominal fat accumulation in healthy, nonhyperandrogenic women (11). Our group already reported a negative relation between circulating DHT and visceral fat accumulation (11), but that result was not observed in the present study. The most consistent observation regarding androgens was the positive correlation between androgen precursors or glucuronide metabolites and fat-free mass. One interventional study reported an increase in thigh muscle mass with a 12-month DHEA therapy in postmenopausal women (15). It was also reported that ADTG was correlated with fat-free mass gain (5). Moreover, we observed a negative correlation between levels of many steroids and age or time since menopause. Decreases in circulating C19 steroids with increasing age have been described (27). The importance of androgen metabolism in relation to body composition and body fat distribution needs to be reexamined in healthy women.

Limitations of the study should be acknowledged. The cross-sectional design does not allow us to conclude on causality effects in the estrogen-adiposity-insulin sensitivity relationship. Considering the fact that our sample comprised Caucasian women, results cannot be extended to other populations. Moreover, specific criteria were used to exclude women possibly taking some form of hormone replacement therapy. Although this has the advantage of excluding exogenous sources of estrogens, it may also slightly underestimate the amount of estrogens measured in

each BMI category as well as the correlations with adiposity and metabolic parameters. The precise methods used to measure adiposity, circulating hormones and insulin sensitivity are significant strengths of the study.

In conclusion, circulating estrogen levels are related to reduced insulin sensitivity, altered blood lipids and a proinflammatory cytokine profile in postmenopausal women. However, these associations are mainly explained by concomitant differences in total adiposity. Circulating estrogen concentrations are proportional to adipose mass, but they remain clearly in the very low range.

Acknowledgements

We thank Sofia Laforest and Serge Simard for contributions to this study.

Funding

This work was supported in part by funds from the Canadian Institutes of Health Research and the Heart and Stroke Foundation of Canada. G.B. Marchand was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, *Diabète Québec* and the Canadian Institutes of Health Research. A.-M. Carreau was funded by *Fond de recherche du Québec – Santé* and Canadian Diabetes Association.

Disclosures

F. Labrie is President of Endoceutics Inc. A. Tchernof receives research grant support from Johnson & Johnson Medical Companies for studies unrelated to this manuscript.

Abbreviations

Δ 4: androstenedione; Δ 5: androstenediol; AD17G: androstanediol-glucuronide; Adipo-IR: adipose tissue insulin resistance index; ADTG: androsterone-glucuronide; ADTS: androsterone-sulfate; AlloP-S: allopregnanolone-sulfate; BMI: body mass index; DHEA: dehydroepiandrosterone; DHEAS: dehydroepiandrosterone-sulfate; DHT: dihydrotestosterone; DI: disposition index; E1: estrone; E1-S: estrone-sulfate; E2: estradiol; ER: estrogens receptor; ETIOG:

ethiocholanolone-glucuronide; FFA: free fatty acids; GDR: glucose disposal rate; HDL: high-density lipoproteins; hs-CRP: high sensitive C-reactive protein; IAUC: incremental area under the curve; IGI: insulinogenic index; IL-6: interleukin-6; LC-MS/MS: liquid chromatography and tandem mass spectrometry; LDL: low-density lipoproteins; MI: Insulin sensitivity; OGTT: oral glucose tolerance test; PCOS: polycystic ovary syndrome; Preg-S: pregnenolone-sulfate; T: testosterone; TC: total cholesterol; TG: Triglycerides; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; VLDL: very-low-density lipoproteins; WC: waist circumference.

References

1. Estradiol, Serum. Mayo Medical Laboratories [Online]. 2017;. Accessed 2 nov. 2017 <https://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Overview/81816>.
2. Barbosa JC, Shultz TD, Filley SJ, Nieman DC. The relationship among adiposity, diet, and hormone concentrations in vegetarian and nonvegetarian postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 1990;51:798-803.
3. Bezemer ID, Rinaldi S, Dossus L, et al. C-peptide, IGF-I, sex-steroid hormones and adiposity: a cross-sectional study in healthy women within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes Control*. 2005;16:561-572.
4. Blouin K, Veilleux A, Luu-The V, Tchernof A. Androgen metabolism in adipose tissue: recent advances. *Molecular and cellular endocrinology*. 2008;301:97-103.
5. Bouchard C, Tchernof A, Tremblay A. Predictors of body composition and body energy changes in response to chronic overfeeding. *International journal of obesity (2005)*. 2014;38:236-242.
6. Burger HG. The menopause: when it is all over or is it? *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 1994;34:293-295.
7. Burstein M, Samaille J. [On a rapid determination of the cholesterol bound to the serum alpha- and beta-lipoproteins]. *Clin Chim Acta*. 1960;5:609.
8. Castracane VD, Kraemer GR, Ogden BW, Kraemer RR. Interrelationships of serum estradiol, estrone, and estrone sulfate, adiposity, biochemical bone markers, and leptin in post-menopausal women. *Maturitas*. 2006;53:217-225.
9. Cleland WH, Mendelson CR, Simpson ER. Effects of aging and obesity on aromatase activity of human adipose cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1985;60:174-177.
10. Cooper BC, Burger NZ, Toth MJ, Cushman M, Sites CK. Insulin resistance with hormone replacement therapy: associations with markers of inflammation and adiposity. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196:123 e121-127.
11. Côté J, Lessard J, Mailloux J, Laberge P, Rhéaume C, Tchernof A. Circulating 5 α -dihydrotestosterone and abdominal adipocyte characteristics in healthy women. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2012;12:391-400.
12. Dedeoglu EN, Erenus M, Yoruk P. Effects of hormone therapy and tibolone on body composition and serum leptin levels in postmenopausal women. *Fertility and sterility*. 2009;91:425-431.
13. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979;237:E214-223.
14. Desbuquois B, Aurbach GD. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1971;33:732-738.
15. Diamond P, Cusan L, Gomez JL, Belanger A, Labrie F. Metabolic effects of 12-month percutaneous dehydroepiandrosterone replacement therapy in

- postmenopausal women. *The Journal of endocrinology*. 1996;150 Suppl:S43-50.
16. Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *The Journal of endocrinology*. 2012;212:3-12.
 17. Ferland M, Despres JP, Tremblay A, et al. Assessment of adipose tissue distribution by computed axial tomography in obese women: association with body density and anthropometric measurements. *The British journal of nutrition*. 1989;61:139-148.
 18. Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Gracia CR. Obesity and reproductive hormone levels in the transition to menopause. *Menopause*. 2010;17:718-726.
 19. Goss AM, Darnell BE, Brown MA, Oster RA, Gower BA. Longitudinal associations of the endocrine environment on fat partitioning in postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 2012;20:939-944.
 20. Guthrie JR, Dennerstein L, Taffe JR, et al. Central abdominal fat and endogenous hormones during the menopausal transition. *Fertility and sterility*. 2003;79:1335-1340.
 21. Hansen RD, Raja C, Baber RJ, Lieberman D, Allen BJ. Effects of 20-mg oestradiol implant therapy on bone mineral density, fat distribution and muscle mass in postmenopausal women. *Acta Diabetol*. 2003;40 Suppl 1:S191-195.
 22. Heding LG. Radioimmunological determination of human C-peptide in serum. *Diabetologia*. 1975;11:541-548.
 23. Janssen I, Powell LH, Kazlauskaitė R, Dugan SA. Testosterone and visceral fat in midlife women: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN) fat patterning study. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 2010;18:604-610.
 24. Ke Y, Bertin J, Gonthier R, Simard JN, Labrie F. A sensitive, simple and robust LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of seven androgen- and estrogen-related steroids in postmenopausal serum. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;144 Pt B:523-534.
 25. Ke Y, Gonthier R, Isabelle M, et al. A rapid and sensitive UPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of serum androsterone glucuronide, etiocholanolone glucuronide, and androstan-3 α , 17 β diol 17-glucuronide in postmenopausal women. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015;149:146-152.
 26. Labrie F, Belanger A, Belanger P, et al. Androgen glucuronides, instead of testosterone, as the new markers of androgenic activity in women. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2006;99:182-188.
 27. Labrie F, Belanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82:2396-2402.
 28. Labrie F, Belanger A, Pelletier G, Martel C, Archer DF, Utian WH. Science of intracrinology in postmenopausal women. *Menopause*. 2017;24:702-712.

29. Labrie F, Cusan L, Gomez JL, et al. Effect of intravaginal DHEA on serum DHEA and eleven of its metabolites in postmenopausal women. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2008;111:178-194.
30. Labrie F, Ke Y, Gonthier R, Belanger A. Letter to the Editor: Superior Mass Spectrometry-Based Estrogen Assays Should Replace Immunoassays. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100:L86-87.
31. Labrie F, Ke Y, Gonthier R, Belanger A. Why both LC-MS/MS and FDA-compliant validation are essential for accurate estrogen assays? *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015;149:89-91.
32. Lamon-Fava S, Barnett JB, Woods MN, et al. Differences in serum sex hormone and plasma lipid levels in Caucasian and African-American premenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90:4516-4520.
33. Luciano AA, Miller BE, Schoenenfeld MJ, Schaser RJ, Ogen/Provera Study G. Effects of estrone sulfate alone or with medroxyprogesterone acetate on serum lipoprotein levels in postmenopausal women. *Obstet Gynecol*. 2001;97:101-108.
34. Mahabir S, Baer DJ, Johnson LL, et al. Usefulness of body mass index as a sufficient adiposity measurement for sex hormone concentration associations in postmenopausal women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2006;15:2502-2507.
35. Major GC, Piche ME, Bergeron J, Weisnagel SJ, Nadeau A, Lemieux S. Energy expenditure from physical activity and the metabolic risk profile at menopause. *Med Sci Sports Exerc*. 2005;37:204-212.
36. Mauvais-Jarvis F. Is Estradiol a Biomarker of Type 2 Diabetes Risk in Postmenopausal Women? *Diabetes*. 2017;66:568-570.
37. McTiernan A, Wu L, Chen C, et al. Relation of BMI and physical activity to sex hormones in postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 2006;14:1662-1677.
38. Meyer MR, Clegg DJ, Prossnitz ER, Barton M. Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011;203:259-269.
39. Mongraw-Chaffin ML, Anderson CA, Allison MA, et al. Association between sex hormones and adiposity: qualitative differences in women and men in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100:E596-600.
40. Muka T, Nano J, Jaspers L, et al. Associations of Steroid Sex Hormones and Sex Hormone-Binding Globulin With the Risk of Type 2 Diabetes in Women: A Population-Based Cohort Study and Meta-analysis. *Diabetes*. 2017;66:577-586.
41. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45:S116-124.
42. Pascot A, Despres JP, Lemieux I, et al. Contribution of visceral obesity to the deterioration of the metabolic risk profile in men with impaired glucose tolerance. *Diabetologia*. 2000;43:1126-1135.

43. Pereira RI, Casey BA, Swibas TA, Erickson CB, Wolfe P, Van Pelt RE. Timing of Estradiol Treatment After Menopause May Determine Benefit or Harm to Insulin Action. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100:4456-4462.
44. Piche ME, Weisnagel SJ, Corneau L, Nadeau A, Bergeron J, Lemieux S. Contribution of abdominal visceral obesity and insulin resistance to the cardiovascular risk profile of postmenopausal women. *Diabetes*. 2005;54:770-777.
45. Purdy RH, Engel LL, Oncley JL. The characterization of estrone sulfate from human plasma. *J Biol Chem*. 1961;236:1043-1050.
46. Richterich R, Kuffer H, Lorenz E, Colombo JP. [The determination of glucose in plasma and serum (hexokinase-glucose-6-phosphate dehydrogenase method) with the Greiner electronic selective analyzer GSA II (author's transl)]. *Z Klin Chem Klin Biochem*. 1974;12:5-13.
47. Rosner W, Hankinson SE, Sluss PM, Vesper HW, Wierman ME. Challenges to the measurement of estradiol: an endocrine society position statement. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98:1376-1387.
48. Ruder HJ, Loriaux L, Lipsett MB. Estrone sulfate: production rate and metabolism in man. *The Journal of clinical investigation*. 1972;51:1020-1033.
49. Stolzenberg-Solomon RZ, Falk RT, Stanczyk F, et al. Sex hormone changes during weight loss and maintenance in overweight and obese postmenopausal African-American and non-African-American women. *Breast Cancer Res*. 2012;14:R141.
50. Tworoger SS, Eliassen AH, Missmer SA, et al. Birthweight and body size throughout life in relation to sex hormones and prolactin concentrations in premenopausal women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2006;15:2494-2501.

Table 1. Study sample characteristics (n=101)

	Mean \pm SD	Range (min-max)
Age (years)	57 \pm 4	48 - 68
Time since menopause (years)	8.6 \pm 6.9	0.3 - 32
Anthropometric variables		
Weight (kg)	71 \pm 13	48 - 122
Waist circumference (cm) ^a	89 \pm 12	66 - 119
BMI (kg/m ²)	27.9 \pm 4.8	19.0 - 48.2
Metabolic parameters		
Cholesterol (mmol/L)	5.53 \pm 0.90	3.46 - 7.48
LDL cholesterol (mmol/L)	3.63 \pm 0.81	1.47 - 5.64
HDL cholesterol (mmol/L)	1.41 \pm 0.36	0.88 - 2.69
Triglyceride (mmol/L)	1.29 \pm 0.65	0.51 - 3.50
Systolic blood pressure (mmHg) ^b	130 \pm 15	105 - 170
Diastolic blood pressure (mmHg) ^b	82 \pm 7	60 - 100
Insulin (at the OGTT) (pmol/L) ^a	73.9 \pm 33.2	0.0 - 185.0
Fasting glucose (at the OGTT) (mmol/L)	5.57 \pm 0.79	3.85 - 9.50
Estrogen concentrations		
Estradiol (pg/mL)	5.21 \pm 3.30	1.41 - 17.14
Estrone (pg/mL)	23.23 \pm 9.87	7.59 - 66.48
Estrone-sulfate (pg/mL)	248.17 \pm 215.93	32.82 - 1385.46

^a n=97, ^b n=95

Table 2. Pairwise correlations between levels of steroids or steroid metabolites and age, time since menopause, adiposity measurements as well as metabolic parameters (n=101)

	E2	E1	E1-S	Δ4	Δ5	DHEA	DHEAS	T	DHT	ETIOG	ADTG	AD17G	ADTS
Age (years)	0.10	0.24*	0.16	-0.07	-0.23*	-0.22*	-0.15	0.12	-0.09	-0.18	-0.21*	-0.14	-0.06
Time since menopause (years) ^a	0.02	0.04	-0.04	-0.16	-0.08	-0.15	-0.10	-0.06	-0.11	-0.13	-0.10	-0.04	-0.19
Anthropometric parameters and body composition													
BMI (kg/m ²)	0.62***	0.54***	0.57***	0.06	0.12	0.05	0.11	0.02	-0.12	-0.10	0.13	-0.02	0.21*
Waist Circumference (cm) ^a	0.49***	0.41***	0.56***	0.02	0.15	0.12	0.15	-0.03	-0.11	-0.02	0.19	0.05	0.23*
Waist-to-hip ratio	0.13	0.07	0.33**	-0.10	0.02	0.06	0.09	-0.16	-0.12	-0.10	0.01	-0.02	0.15
Fat-free mass (kg) ^b	0.16	0.19	0.23*	0.12	0.28*	0.31*	0.29*	-0.07	0.08	0.24*	0.28*	0.22*	0.19
Fat mass (kg) ^b	0.53***	0.50***	0.49***	0.10	0.18	0.09	0.11	0.05	-0.07	-0.01	0.17	0.06	0.17
%Body fat ^b	0.56***	0.51***	0.48***	0.08	0.10	0.01	0.03	0.08	-0.10	-0.08	0.10	-0.0002	0.13
Adipose tissue area (cm²)													
Subcutaneous ^c	0.57***	0.50***	0.49***	0.11	0.14	0.08	0.13	0.08	-0.05	0.05	0.25*	0.09	0.26*
Visceral ^c	0.42***	0.30*	0.47***	0.01	0.07	0.07	0.08	-0.02	-0.11	-0.06	0.08	0.02	0.15
Mid-thigh ^d	0.60***	0.56***	0.42***	0.19	0.18	0.12	0.16	0.21*	0.09	0.04	0.26*	0.13	0.30*
Metabolic parameters													
IAUC glucose (mM x min)	0.17	0.17	0.34**	-0.12	0.004	-0.04	0.09	-0.13	-0.06	-0.11	0.05	0.06	0.15
IAUC insulin (mM x min) ^e	0.07	0.002	0.10	-0.09	-0.05	-0.03	-0.04	-0.05	-0.06	-0.21*	-0.14	-0.07	0.03
IAUC c-peptid (mM x min)	0.02	-0.04	0.04	-0.04	-0.03	-0.01	0.03	-0.12	-0.02	-0.11	0.02	0.03	0.09
Fasting free fatty acid (mM) ^a	0.25*	0.31*	0.20*	-0.02	-0.04	-0.16	-0.11	0.08	-0.10	-0.17	0.02	-0.06	-0.13
Insulin sensitivity (MI) ^f	-0.36**	-0.29*	-0.38***	0.005	-0.04	0.02	-0.05	-0.02	0.10	0.14	-0.04	-0.09	-0.16
Insulinogenic index (IGI) ^c	-0.09	-0.13	-0.14	0.01	-0.05	-0.004	-0.10	0.04	-0.04	-0.13	-0.11	-0.11	-0.05
Disposition Index (DI) ^b	0.12	0.06	0.11	-0.01	-0.05	-0.04	-0.05	0.03	-0.10	-0.17	-0.04	-0.03	0.04
Adipo-IR ^c	0.28*	0.24*	0.29*	0.002	-0.07	-0.07	-0.06	0.02	-0.12	-0.13	0.06	-0.01	0.01
Triglycerides (nM)	0.31*	0.27*	0.36**	0.09	0.07	0.08	0.08	-0.01	-0.15	0.04	0.07	0.05	0.06
VLDL-cholesterol (nM)	0.30*	0.26*	0.33**	0.13	0.13	0.13	0.11	0.03	-0.08	0.05	0.11	0.08	0.10
VLDL-triglycerides (nM)	0.31*	0.27*	0.36**	0.09	0.09	0.08	0.09	0.002	-0.14	0.02	0.08	0.07	0.08
LDL-cholesterol (nM)	-0.10	-0.15	-0.13	-0.15	-0.16	-0.17	-0.19	-0.12	-0.22*	-0.06	-0.11	-0.18	-0.21*
LDL-triglycerides (nM)	0.14	0.12	0.22*	-0.002	-0.02	0.003	0.05	-0.16	-0.16	0.03	0.001	-0.06	-0.03
HDL-cholesterol (nM)	-0.23*	-0.11	-0.22*	-0.04	-0.13	-0.13	-0.14	0.12	0.002	-0.0006	-0.15	-0.11	-0.09
HDL-triglycerides (nM)	0.24*	0.30*	0.25*	0.14	-0.05	0.003	-0.08	0.03	-0.18	0.02	0.02	-0.10	-0.04
hs-CRP (mg/L) ^c	0.52***	0.46***	0.40***	0.13	0.12	0.10	0.11	0.07	-0.02	-0.11	0.08	0.07	0.06
IL-6 (pg/mL) ^a	0.29*	0.25*	0.32*	0.01	0.04	0.002	-0.05	0.03	-0.11	-0.18	-0.03	-0.15	-0.06
TNF-α (pg/mL)	0.13	0.15	0.22*	-0.003	-0.06	-0.09	0.02	0.09	-0.15	-0.07	-0.08	-0.13	0.02
Adiponectin (μg/mL)	-0.20*	-0.19	-0.35**	-0.13	-0.22*	-0.27*	-0.26*	0.07	0.03	-0.07	-0.16	-0.14	-0.19

p ≤ 0.0001, * p ≤ 0.001, ** p ≤ 0.05. ^an=100, ^bn=98, ^cn=96, ^dn=93, ^en=97, ^fn=99. Abbreviations: E2, estradiol; E1, estrone; E1-S, estrone-sulfate; Δ4, androstenedione; Δ5, androstenediol; DHEA, dehydroepiandrosterone; DHEAS, dehydroepiandrosterone-sulfate; T, testosterone; DHT, dihydrotestosterone; ETIOG, ethiocholanolone-glucuronide; ADTG, androsterone-glucuronide; AD17G, androstanediol-glucuronide; ADTS, androsterone-sulfate; BMI, Body mass index; IAUC: incremental area under the curve; adipo-IR, adipose tissue insulin resistance index; VLDL: very-low-density lipoproteins; LDL: low-density lipoproteins; HDL: high-density lipoproteins; hs-CRP: high sensitive C-reactive protein; IL-6: interleukin-6; TNF-α: tumor necrosis factor alpha. All metabolic variables except age, waist circumference, body fat percentage, adipose tissue areas, free fatty acids and LDL-cholesterol were transformed. Time since menopause, IAUC, MI, Adipo-IR, triglycerides, IL-6 and TNF-α were transformed with the Box Cox formula while the others were log-transformed. All steroid levels were log-transformed, except E2, T, DHEAS and ADTS, which were transformed with the Box-Cox formula.

Table 3. Multivariate regression models establishing the contribution of each estrogen and body fat percentage to the variance in metabolic parameters

	E2		E1		E1-S	
	r ²	p-value	r ²	p-value	r ²	p-value
Model 1 – IAUC glucose						
Estrogen	-	-	-	-	0.11	0.001
Percent fat	-	-	-	-	0.01	0.25
Model 2 - fasting FFA						
Estrogen	0.0006	0.79	0.02	0.18	0.0004	0.84
Percent fat	0.17	≤ 0.0001	0.17	≤ 0.0001	0.17	≤ 0.0001
Model 3 - MI						
Estrogen	0.01	0.25	0.003	0.57	0.03	0.05
Percent fat	0.19	≤ 0.0001	0.19	≤ 0.0001	0.19	≤ 0.0001
Model 4 - Adipo-IR						
Estrogen	0.0006	0.79	0.002	0.63	0.0007	0.78
Percent fat	0.22	≤ 0.0001	0.22	≤ 0.0001	0.22	≤ 0.0001
Model 5 - TG						
Estrogen	0.10	0.002	0.02	0.17	0.15	0.0001
Percent fat	0.02	0.16	0.08	0.004	0.01	0.20
Model 6 - VLDL-C						
Estrogen	0.09	0.002	0.07	0.01	0.12	0.0004
Percent fat	0.01	0.30	0.02	0.14	0.01	0.31
Model 7 - VLDL-TG						
Estrogen	0.10	0.002	0.02	0.18	0.14	0.0001
Percent fat	0.02	0.18	0.08	0.004	0.01	0.21
Model 8 - LDL-TG						
Estrogen	-	-	-	-	0.07	0.01
Percent fat	-	-	-	-	0.0008	0.78
Model 9 - HDL-C						
Estrogen	0.006	0.43	-	-	0.009	0.33
Percent fat	0.07	0.01	-	-	0.07	0.01
Model 10 - HDL-TG						
Estrogen	0.07	0.008	0.08	0.001	0.08	0.004
Percent fat	0.01	0.30	0.007	0.41	0.01	0.25
Model 11 - hs-CRP						
Estrogen	0.04	0.02	0.03	0.02	0.01	0.15
Percent fat	0.37	≤ 0.0001	0.37	≤ 0.0001	0.37	≤ 0.0001
Model 12 - IL-6						
estrogen	0	0.97	0	0.95	0.009	0.29
Percent fat	0.25	≤ 0.0001	0.25	≤ 0.0001	0.25	≤ 0.0001
Model 13 – Estrogen						
L4-L5 visceral fat area	0.0001	0.91	0.01	0.24	0.02	0.13
Percent body fat	0.30	≤ 0.0001	0.24	≤ 0.0001	0.23	≤ 0.0001

In each model, the metabolic parameter was used as the dependent variables. Percent body fat and the estrogen level was used as the independent variables. In model 13, the dependent variable was the estrogen level and the independent variables were L4-L5 visceral fat area and percent body fat. Models were not computed if the univariate correlations were not significant.

Figure headings

Figure 1: Markers of glucose tolerance, insulin sensitivity and metabolic homeostasis as a function of circulating E2 concentration tertiles. (A) Oral glucose tolerance test (OGTT); (B) hyperinsulinemic-euglycemic clamp; (C) Insulin sensitivity indices; (D) blood lipids; and (E) circulating adipokines. Basic characteristics for tertiles 1, 2 and 3 respectively are: (mean±SD) 57±4, 58±4 and 57±5 years of age; 62.5±8.3, 71.1±9.2 and 79.2±13.5 kg total body weight; 82.9±10.5, 90.0±8.4 and 96.4±12.1 cm waist circumference; 24.8±3.0, 27.4±3.4 and 31.5±5.1 kg/m² BMI. FFA: free fatty acids; MI: insulin sensitivity as measured during the clamp; IGI: insulinogenic index; DI: disposition index; Adipo-IR: adipose tissue insulin resistance index; TG: triglycerides; VLDL-C: very-low-density lipoprotein cholesterol; VLDL-TG: very-low-density lipoprotein triglycerides; HDL-TG: high-density lipoprotein triglycerides; hs-CRP: high sensitivity C-reactive protein; IL-6: interleukin 6 *p≤0.05 **p≤0.01 ***p≤0.001 ****p≤0.0001

Figure 2: Markers of glucose tolerance, insulin sensitivity and metabolic homeostasis as a function of circulating E1 concentration tertiles. (A) OGTT; (B) hyperinsulinemic-euglycemic clamp; (C) Insulin sensitivity indices; (D) blood lipids; and (E) circulating adipokines. Basic characteristics for tertiles 1, 2 and 3 respectively are: (mean±SD) 56±4, 57±5 and 58±4 years of age; 63.8±8.9, 71.2±10.9 and 77.9±13.4 kg total body weight; 84.0±10.9, 89.5±11.1 and 94.8±10.8 cm waist circumference; 24.9±3.1, 27.9±4.1 and 30.9±5.0 kg/m² BMI. *p≤0.05 **p≤0.01 ***p≤0.001 ****p≤0.0001

Figure 3: Markers of glucose tolerance, insulin sensitivity and metabolic homeostasis as a function of circulating E1-S concentration tertiles. (A) OGTT; (B) hyperinsulinemic-euglycemic clamp; (C) Insulin sensitivity indices; (D) blood lipids; and (E) circulating adipokines. Basic characteristics for tertiles 1, 2 and 3 respectively are: (mean±SD) 57±4, 57±5 and 57±4 years of age; 64.1±10.4, 69.7±9.8, 79.2±12.5 kg total body weight; 82.7±10.4, 87.7±9.4 and 97.9±10.1 cm

waist circumference; 25.0 ± 3.6 , 27.3 ± 3.4 and 31.4 ± 4.8 kg/m² BMI. * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$
*** $p \leq 0.001$ **** $p \leq 0.0001$

Figure 4: Pairwise correlations between plasma E2, E1 as well as E1-S and metabolic parameters, before and after statistical adjustment for body fat mass percentage. Vertical dotted line represent significance thresholds. MI: insulin sensitivity.

Figure 1

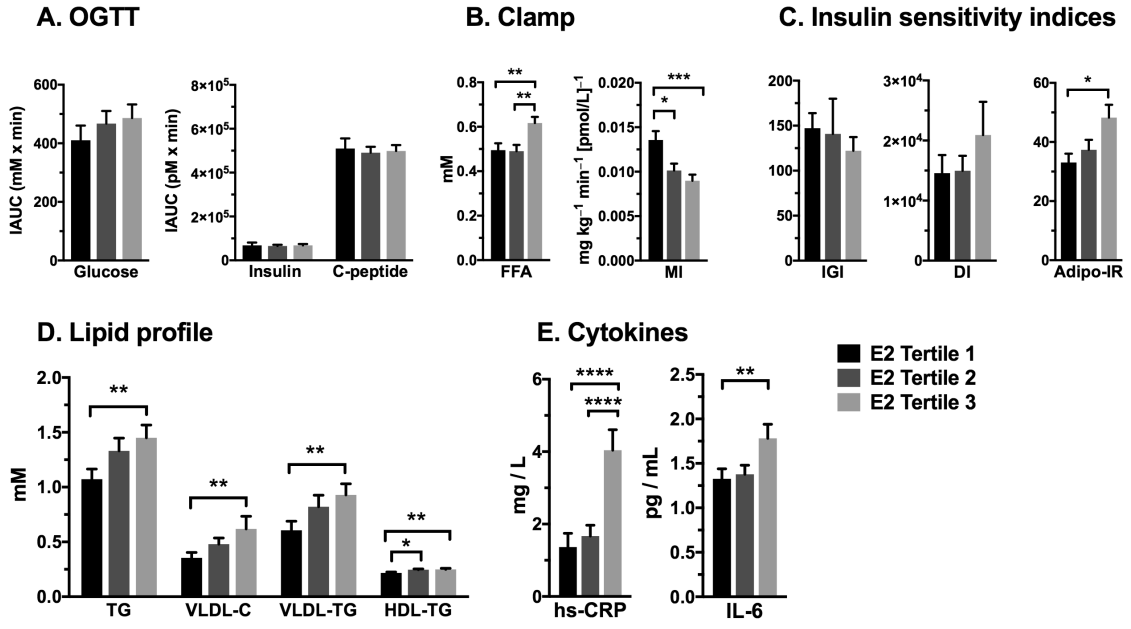


Figure 2

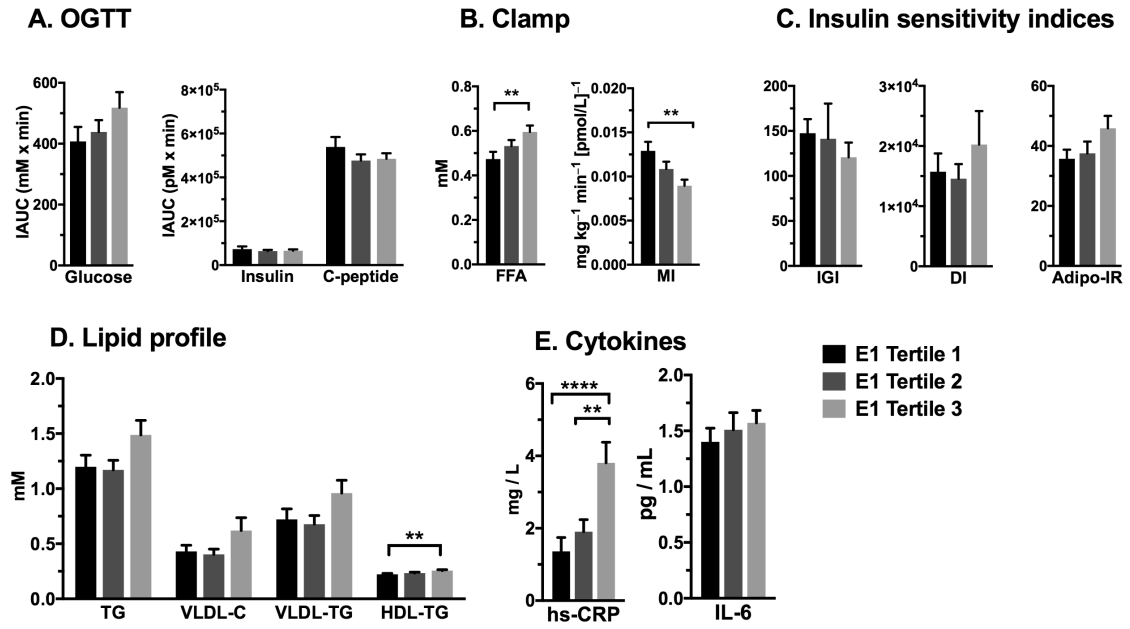


Figure 3

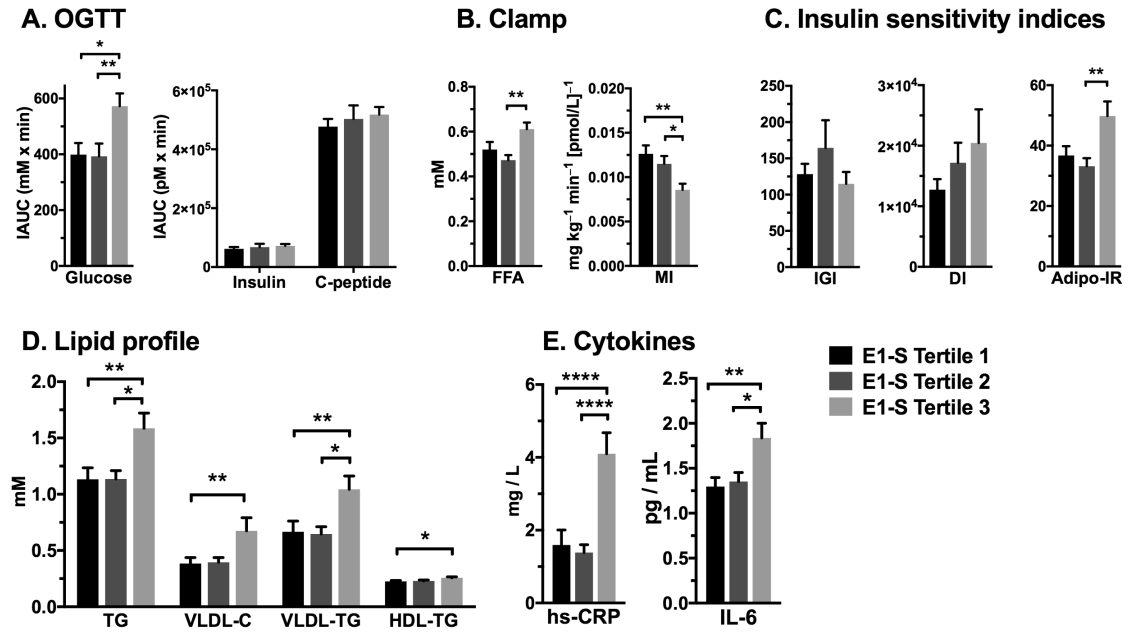
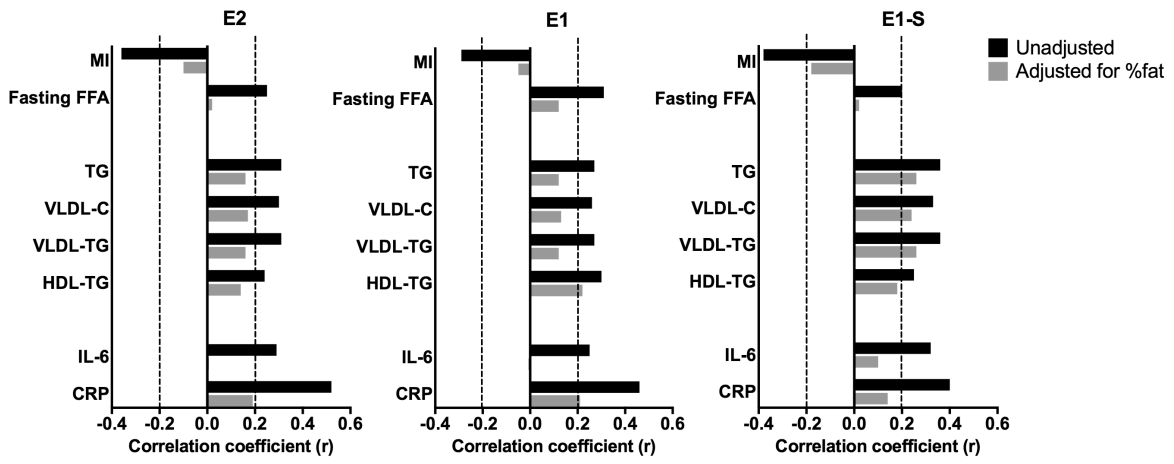


Figure 4



Chapitre 2 : Les taux de stéroïdes circulants et le phénotype du tissu adipeux chez la femme préménopausée

Geneviève B Marchand, Anne-Marie Carreau, Sofia Laforest, Julie-Anne Côté, Marleen Daris, Katherine Cianflone, Cornelia Prehn, Jerzy Adamski, André Tchernof

L'article composant ce chapitre s'intitule:

Circulating steroid levels as correlates of adipose tissue phenotype in premenopausal women

Cet article sera publié dans le journal :

Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation

Il est présentement disponible en prépublication sous forme électronique.

Résumé

La relation entre les altérations reliées à l'obésité et le profil circulant d'hormones stéroïdiennes demeure équivoque chez la femme. Notre objectif est d'identifier les stéroïdes circulants associés à une augmentation de l'adiposité et une dysfonction adipeuse chez les femmes préménopausées. Dans un échantillon de 42 femmes préménopausées (âge 46 ± 3 ans; IMC $27,1 \pm 4,2$ kg/m²), 19 stéroïdes plasmatiques ont été quantifiés par ESI-LC-MS/MS. La composition corporelle et la distribution des graisses ont été mesurées par absorptiométrie biphotonique à rayons X et par tomomodensitométrie, respectivement. Des marqueurs de fonction adipocytaire tels que la distribution de la taille des adipocytes, l'atténuation radiologique et l'infiltration de macrophages ont aussi été analysés dans des échantillons de tissus adipeux sous-cutané et viscéral obtenus chirurgicalement. Plusieurs corrélations négatives ont été observées entre des mesures d'adiposité telles que l'IMC, le pourcentage de gras ou l'aire de tissu adipeux abdominal totale et les niveaux plasmatiques d'androstènedione ($r = -0,33$ à $-0,39$; $p \leq 0,04$), d'androstérone ($r = -0,30$ à $-0,38$; $p \leq 0,05$) et du précurseur stéroïdien prégnénone ($r = -0,36$ à $-0,46$; $p \leq 0,02$). Une hypertrophie adipocytaire viscérale a été observée chez les patientes avec un taux faible de prégnénone ($p < 0,05$). L'atténuation radiologique du tissu adipeux viscéral, un marqueur potentiel de la taille adipocytaire, était aussi positivement corrélée avec la concentration de prégnénone ($r = 0,33$; $p < 0,05$). Des niveaux faibles de prégnénone étaient reliés à une augmentation de l'infiltration de macrophages dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané ($p < 0,05$). Les niveaux plasmatiques d'androgènes et de leurs précurseurs étaient plus faibles chez les femmes ayant une plus grande adiposité et une hypertrophie adipocytaire viscérale. Un taux faible de prégnénone circulante pourrait être un marqueur de dysfonction adipocytaire.

Circulating steroid levels as correlates of adipose tissue phenotype in premenopausal women

Geneviève B Marchanda,b,c, Anne-Marie Carreauc,d, Sofia Laforesta,b,c, Julie-Anne Côtéa,b,c, Marleen Darisa, Katherine Cianflonec, Cornelia Prehne, Jerzy Adamskie,f,g, André Tchernofa,b,c

^a Endocrinology and Nephrology, CHU de Quebec Medical Center, 2705 Boulevard Laurier, Quebec City, QC G1V 42G, Canada ^b School of Nutrition, Laval University, 2425 Rue de l'Agriculture, Quebec City, QC G1V 0A6, Canada ^c Quebec Heart and Lung Institute, 2725 Chemin Ste-Foy, Quebec City, QC G1V 4G5, Canada, ^d Division of Endocrinology, Department of Medicine, Sherbrooke University, 2500 Boulevard de l'Université, Sherbrooke, QC J1K 2R1, Canada, ^e Helmholtz Zentrum München, Institute of Experimental Genetics, Genome Analysis Center, Neuherberg, Ingolstädter Landstrabe 1, 85764 Oberschleibheim, Germany ^f Lehrstuhl für Experimentelle Genetik, Technische Universität München, 85356 Freising-Weihenstephan, Germany ^g German Center for Diabetes Research (DZD), 85764 München-Neuherberg, Germany

Email address: genevieve.marchand@criucpq.ulaval.ca; Anne-Marie.Carreau@USherbrooke.ca; sofia.laforest@criucpq.ulaval.ca; julie-anne.cote@criucpq.ulaval.ca; marleen.daris@fmed.ulaval.ca; katherine.cianflone@criucpq.ulaval.ca; prehn@helmholtz-muenchen.de; adamski@helmholtz-muenchen.de; andre.tchernof@criucpq.ulaval.ca

Running head: Steroids and adipose phenotype in women

Address for correspondence: Andre Tchernof, Ph.D.
Quebec Heart and Lung Institute – Laval University
2725 Chemin Sainte-Foy, Y4212
Quebec City, Quebec,
Canada G1V 4G5
Tel: 418-656-8711
Email: andre.tchernof@criucpq.ulaval.ca

Abstract

Background: Obesity-related alterations in the circulating steroid hormone profile remain equivocal in women. Our objective was to identify circulating steroid levels that relate to increased adiposity and altered adipose phenotype in premenopausal women. **Materials and methods:** In a sample of 42 premenopausal women (age 46 ± 3 years; body mass index (BMI) 27.1 ± 4.2 kg/m²), 19 plasma steroids were quantified by electrospray ionization-liquid chromatography-tandem mass spectroscopy (ESI-LC-MS/MS). Body composition and fat distribution were assessed by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) and computed tomography (CT), respectively. Markers of adipose tissue function including adipocyte size distributions, radiological attenuation and macrophage infiltration were also analyzed in surgically obtained visceral and subcutaneous fat samples. **Results:** Many negative correlations were observed between adiposity measurements such as BMI, body fat percentage or total abdominal adipose tissue area and plasma levels of androstenedione ($\Delta 4$) ($r=-0.33$ to -0.39 , $p\leq 0.04$), androsterone (ADT) ($r=-0.30$ to -0.38 , $p\leq 0.05$) and plasma levels of steroid precursor pregnenolone (PREG) ($r=-0.36$ to -0.46 , $p\leq 0.02$). Visceral adipocyte hypertrophy was observed in patients with low PREG concentrations ($p<0.05$). Visceral adipose tissue radiologic attenuation, a potential marker of adipocyte size, was also positively correlated with PREG levels ($r=0.33$, $p<0.05$). Low levels of PREG were related to increased number of macrophages infiltrating visceral and subcutaneous adipose tissue ($p<0.05$). **Conclusion:** Plasma levels of androgens and their precursors are lower in women with increased adiposity and visceral adipocyte hypertrophy. Low circulating PREG concentration may represent a marker of adipose tissue dysfunction.

Keywords: adipocyte, androstanes, computed tomography

Introduction

Excess fat accumulation on anatomical structures such as the greater omentum or mesentery, termed visceral obesity, is associated with dyslipidemia, insulin resistance and a chronic, low-grade inflammatory state in both men and women [1]. Visceral obesity also closely relates to many markers of altered adipose tissue function including adipocyte hypertrophy [2], low X-ray attenuation [3] and macrophage infiltration [4].

The sex dimorphism in body fat distribution, with predominant visceral fat accumulation in men compared to women [1, 5-8] suggests an important role of sex steroid hormones. But how endogenous steroid hormone levels relate to body fatness, fat distribution and markers of adipose tissue dysfunction remains poorly understood, especially in women. A general assumption is that abdominal, visceral obesity in women is associated with high circulating levels of androgens [9-12], but this conclusion mainly reflects observations in women suffering from the polycystic ovary syndrome (PCOS), a condition that may not be comparable to that of women without androgen excess [13]. Studies in non-PCOS women with abdominal obesity have yielded widely conflicting results, as we critically reviewed in [14]. We concluded that methodological limitations as well as variation in study design make it impossible to draw clear conclusions regarding the relation between androgens and adiposity or body fat distribution in women [14]. Among the small number of studies available on dihydrotestosterone (DHT) and androstenedione ($\Delta 4$), the levels of these steroids were either negatively related or unrelated to measurements of abdominal adiposity [14]. Discrepancies in the literature were also observed regarding the relationship between total adiposity, often estimated with the body mass index (BMI), and circulating androgens in women. Some studies observed a positive relationship between testosterone (T) and BMI [15, 16] while others did not [17, 18]. No association was observed between BMI and other androstanes, such as $\Delta 4$ and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) [16-18], except one study which showed a positive relation with DHEAS [15]. In studies using more precise methods for adiposity estimation, namely dual-energy X-ray

absorptiometry (DXA) [19] or bioimpedance [20] and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for steroid measurements [21], no association was observed between total adiposity and levels of T [19, 21] or other androstanes [20]. Further studies are clearly needed to address discrepancies in the circulating steroid hormone profile of healthy women as a function of total or regional adiposity measurements.

In this study, we examined the circulating steroid hormone profiles of premenopausal women to investigate their association with total adiposity, fat distribution and markers of visceral as well as subcutaneous adipose tissue dysfunction. Based on available data [14] and a previous investigation [22], we tested the hypothesis that body fatness and adipose tissue dysfunction markers relate negatively to circulating levels of steroid precursors as well as androgen and androgen metabolite levels.

Subjects and methods

Subjects

Fifty-nine women scheduled for total hysterectomies, with or without salpingo-oophorectomy or cauterization of endometrial lesions were recruited. Women receiving oral contraceptives interrupted their treatment at least 4 weeks before blood sampling. Women suffering from cancer, Cushing syndrome, hyperthyroidism, diabetes, PCOS, having important weight variation in the past year, and who were younger than 35 or older than 60 years, were excluded. All subjects provided written informed consent in accordance to the Ethics Committee of CHU de Québec Medical Center-Université Laval. Menopausal status was determined with a questionnaire and plasma follicle stimulating hormone levels measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (ALPCO, Salem, USA). Postmenopausal women and women receiving gonadotropin-releasing hormone agonist treatment (n=17) were excluded, which allowed 42 premenopausal women for analyses.

Body composition and fat distribution

Body fat mass, fat percentage and lean body mass values were obtained by DXA using a Hologic QDR-4500A densitometer and Whole-body fan beam software V8.269:3 (Hologic, Bedford, MA). Computed tomography (CT) was used as previously described [23] for subcutaneous and visceral adipose tissue cross-sectional area measurements with a GE Light Speed 1.1 CT scanner (GE Medical Systems, Milwaukee, WI). An attenuation range of -190 to -30 Hounsfield units was used for quantification of adipose tissue. Mean adipose tissue attenuation was also assessed as a marker of adipose tissue radiological density [3].

Steroid hormone quantification

Plasma samples were used for the analysis of the following 19 steroids which were quantified using an extended version of the Absolute/*IDQ*TM Stero17 Kit and liquid

chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-LC-MS/MS): aldosterone (A), Δ 4, androsterone (ADT), corticosterone (CORT), cortisol (F), cortisone (E), 11-deoxycorticosterone (11-DOC), 11-deoxycortisol (11-deoxy), dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEAS, DHT, estradiol, estrone, etiocholanolone (Et), 17 α -hydroxyprogesterone (17-OH-P), progesterone, T, pregnenolone (PREG), pregnanediol. Detailed methods were previously described [24]. Assay validation was performed by the manufacturer according to FDA guidelines [25]. All steroid values were above the lower limit of quantification (LLOQ) except for the following: 14 participants for 11-DOC, 19 participant for Et and 10 participants for DHT. Estradiol, estrone, progesterone and pregnanediol were not examined due to potential menstrual cycle variation. Mean \pm standard deviation (SD) plasma levels of circulating steroids in our sample were 2863 \pm 1451 nM for DHEAS, 10.0 \pm 7.5 nM for DHEA, 2.5 \pm 1.2 nM for Δ 4, 0.7 \pm 0.2 nM for ADT, 0.3 \pm 0.3 nM for Et, 0.54 \pm 0.36 nM for T, 0.40 \pm 0.26 nM for DHT, 4.5 \pm 2.7 nM for PREG, 2.3 \pm 1.9 nM for 17-OH-P, 0.16 \pm 0.12 nM for 11-DOC, 0.82 \pm 0.59 nM for 11-deoxy, 13.1 \pm 12.0 nM for CORT; 0.61 \pm 0.36 nM for A; 585.9 \pm 219.8 nM for F and 64.7 \pm 15.9 nM for E.

Plasma cytokines

Plasma Interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) levels were measured with Quantikine HS ELISA kits (R&D, Minneapolis, MN, USA). Plasma leptin and adiponectin levels were analyzed with Human Leptin kit (EMD Millipore, St.Charles, MI, USA) and Human adiponectin ELISA kit (B-Bridge, Japan) respectively. Microplates were read with the Infinite M1000 (Tecan, Mauriceville, NC, USA).

Adipose tissue sampling, cell sizing and macrophage infiltration

measurements

Subcutaneous fat samples were collected in the lower abdomen at the surgical incision site. Visceral fat samples were taken from the distal portion of the greater omentum. Adipocyte diameters were determined in a subsample (n=28) by

histological analysis [26]. Briefly, 50–100 mg of the tissue was fixed in formalin, paraffin-embedded and mounted on histological slides and hematoxylin/eosin-stained or used for macrophage detection with immunohistochemical detection (see section below). The slides were scanned at 20X magnification using a NanoZoomer Hamamatsu scanner (Hamamatsu Photonics, KK, Systems Division). The smallest and the largest diameters of 250 adipocytes per sample were manually measured using CaloPix software (Tribvn, Chatillon, France) and the mean of these two values was used for analyses.

Total macrophage number (defined by the number of CD68+ cells) was assessed on a population subsample (n=28). Immunohistochemical detection was performed with the avidin-biotin peroxidase method (ABCYS Biospa, Milan, Italy) [27] and staining visualization with diaminobenzidine (Dako Cytokation). Macrophage infiltration was expressed as the number of macrophages per 100 adipocytes. Details of the measurement method were previously published [28, 29].

Statistical analyses

Participants were subdivided in subgroups of BMI [lean (<25 kg/m²), overweight (25-29.9 kg/m²) or obese (≥30 kg/m²)]. Comparison of steroid levels among these subgroups was performed with analysis of variance (ANOVA) and Tukey's honest significant difference (HSD) post-hoc test. Pairwise correlation coefficients were computed to assess associations between plasma hormone levels and adiposity measurements. For steroids that were significantly related to multiple adiposity measurements, the sample was subdivided in 2 subgroups based on median of the distribution of each steroid. The Kolmogorov-Smirnov test was used to investigate the differences in adipocyte diameter distributions between the low and high steroid subgroups. Student's t tests were used to assess the difference between these subgroups for cytokines and macrophage infiltration. Variables with a non-normal distribution as determined by a Shapiro-Wilk test were log₁₀- or Box-Cox-transformed. Distributions of attenuation measurements could not be normalized. Spearman's rank correlations were computed to investigate the relationship

between these variables and plasma steroid levels. Statistical analyses were performed with JMP and SAS software (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Results

Study population characteristics and BMI-related differences

Anthropometric and metabolic characteristics of the participants are shown in **Table 1**. A large range of BMI and other adiposity values was observed, but women were slightly overweight on average. Plasma levels of selected steroids in BMI subgroups are shown in **Figure 1**. Several steroids tended to be reduced with increasing BMI, and significance was reached for $\Delta 4$ and PREG. A trend was observed for T. No other steroids were different as a function of BMI categories (not shown).

Adiposity measurements and androgen or androgen precursor/metabolite levels

Correlations observed between plasma steroid concentrations and total or regional adiposity measurements and adipocyte mean diameters are shown in **Tables 2** and **3**. Several negative correlations were found between adiposity measurements and plasma levels of $\Delta 4$. DHEA and ADT were negatively correlated with waist circumference and ADT level was also negatively correlated with abdominal subcutaneous fat area. DHT was negatively correlated with percent body fat and a trend was observed with BMI. Trends for negative correlations were observed between DHEAS, DHEA or T and some adiposity measurements. Interestingly, visceral adipocyte cell size was negatively correlated with plasma levels of $\Delta 4$ and T while no correlation was observed with subcutaneous adipocyte cell size. A trend for a negative correlation was also observed between ADT or DHT level and visceral adipocyte diameter.

Adiposity measurements and circulating steroid precursors, mineralocorticoids or glucocorticoids

Circulating levels of steroid precursor PREG were significantly and negatively correlated with all adiposity measurements, including visceral and subcutaneous fat area. 17-OH-P showed no significant correlation with adiposity indices, but a

trend for a negative correlation was found with BMI. Trends for negative associations were also observed between plasma levels of mineralocorticoid precursor 11-DOC and BMI or abdominal subcutaneous fat area. Mean adipocyte diameter was not associated with these steroids, except for a trend for a negative correlation between visceral adipocyte size and PREG level. No significant correlation was observed between anthropometric parameters or mean adipocyte diameters and C21 steroid levels.

Markers of adipose tissue function

Additional significant associations between levels of androstanes and markers of adipose tissue dysfunction were observed. A trend was observed in visceral adipocyte size distribution for T and DHT, where the adipocyte size distribution seemed shifted to the right in the low T and DHT subgroups ($p < 0.10$, data not shown). This suggests a tendency for adipocyte hypertrophy in the visceral fat compartment with low circulating T and DHT. A significantly higher macrophage infiltration in visceral fat was also detected for the lower circulating ADT subgroup ($p < 0.05$). None of these results were observed in the subcutaneous fat depot. Plasma leptin concentration was significantly higher in the low DHT and low $\Delta 4$ subgroup ($p < 0.05$, data not shown). No other trend or significant association was detected for androstanes as a function of adipose tissue function markers.

Regarding the low- and high-PREG subgroups (**Figure 2**) a shift to the right in visceral adipocyte size distribution was observed in the low PREG level subgroup. A significant positive correlation between PREG and visceral adipose tissue attenuation was also found, consistent with the previous finding that low radiologic attenuation is a marker of adipocyte hypertrophy. Even if no significant difference was observed in circulating leptin, macrophage infiltration in visceral and subcutaneous adipose tissue was higher in participants with lower circulating PREG levels. None of these results were observed in subcutaneous adipose tissue.

Discussion

We assessed plasma steroid profile alterations in relation to obesity, body fat distribution and markers of adipose tissue function in premenopausal women. We hypothesized that body fatness and adipose tissue dysfunction markers relate negatively to circulating levels of steroid precursors as well as androgen and androgen metabolite levels. Our findings partly confirmed our initial hypothesis. We found that increased total adiposity was associated with lower levels of androgens, androgen precursors or metabolites, including $\Delta 4$ and ADT as well as adrenal steroid precursor PREG. In general, this circulating steroid profile was more closely related to markers of total body fat accumulation rather than specific abdominal or visceral fat accumulation. Yet, the association of low PREG levels with markers of adipose tissue dysfunction was more pronounced in visceral fat, even if higher macrophage infiltration was also detected in subcutaneous fat tissue in the low-PREG subgroup.

Available literature shows that circulating androgen levels are low in obese or abdominally obese men (reviewed in [14]). This association is much more equivocal in women [14]. Negative relationships between circulating DHT levels in women and adiposity indices have been reported [14], including in one women sample from our group [30]. Even if the DHT levels were negatively associated with only on adiposity measurements (percent body fat), some adipose tissue function markers were still negatively related to DHT, namely leptin level and visceral adipocyte diameter distribution. The current analysis was done in a sample of women that was different from those previously studied, and hormone level measurements were performed in a different center with a distinct methodological approach, thereby excluding technical issues related to steroid hormone level measurements. We also report here that total T levels were not increased with visceral obesity. Considering our clear failure to find increased circulating androgen levels in abdominally obese women from two completely distinct samples, the generalized assumption that high androgen levels are associated with an android

body fat distribution pattern should be critically re-examined, at least in women without androgen excess.

Despite significantly higher adiposity in women with lower androgens and precursors, not all adipose tissue function markers (notably cytokine plasma concentrations) were significant correlates of steroids in the present study. Yet, adipocyte diameter frequency distribution, a marker of adipose tissue function [31], was shifted toward adipocyte hypertrophy with low circulating levels of PREG. PREG level was also positively correlated with visceral adipose tissue radiologic attenuation. Our group previously reported a negative correlation between attenuation and adipocyte size, suggesting that attenuation could actually reflect adipocyte size [3]. We also observed lower macrophage numbers in visceral and subcutaneous adipose tissue in women with high PREG levels. The physiological mechanism underlying these associations remains unknown. Leptin has been shown to inhibit steroidogenic acute regulatory (StAR) protein both at the mRNA and protein levels in primary rat adrenocortical cells without affecting the expression of the P450 side-chain cleavage enzyme [32], which would be consistent with the present findings. In addition, leptin deficient mice have fatty ovaries with low StAR protein also suggesting impaired ovarian steroidogenesis in the obese state [33]. However, findings are not unanimous. Adipocyte-conditioned medium as well as IL-1 β , the latter which is frequently increased in the obese state, were found to stimulate StAR and/or steroidogenesis in adrenocortical cells [34, 35]. More studies are needed to clarify the mechanistic basis of the associations observed in the present study.

Conflicting results in the literature may arise from methodological issues. Immunoassays used in the majority of studies are less reliable to measure androgens in women than GC- or LC-MS/MS [36]. Furthermore, the populations examined may be difficult to compare. Some studies included hyperandrogenic women while others did not. Obesity level and menopausal status of the samples may also have led to conflicting results [37, 38]. The effect of age *per se* may also influence findings owing to age-related decreases in DHEA, Δ 4 and T, which are

concomitant with increased central fat accumulation, supporting the possibility that low androgen levels would be observed in women with high adiposity [39, 40]. Our sample had a mean age of 45.8 ± 3.4 years (i.e. late premenopausal age range), which may explain some discrepancies with studies in younger premenopausal women [38, 41]. Moreover, most studies described the relation between T or free T with adiposity, but few studies examined other circulating androgens [14]. In the scant data available, other androgens do not seem to be positively linked to increased adiposity [14]. The frequent observation that free T is positively correlated with adiposity in women could be partly explained by the well-known inverse relation between sex-hormone binding globulin (SHBG) and abdominal adiposity [14], this transporter often being used to estimate the unbound T fraction. Our study detected no association between T and adiposity indices, except for a negative trend with visceral adiposity. It cannot be excluded that previous studies reporting no association between T and adiposity could have yielded results similar to ours, had they assessed a full steroid profile as opposed to T levels alone.

Low $\Delta 4$ concentration was also related to higher macrophage number in visceral adipose tissue. Limited power may have impaired our ability to detect significant differences in macrophage infiltration in stratifications based on other steroids. Published data on the association between circulating androgens and adipocyte size are scarce. Two studies did not find any association between total T, $\Delta 4$, DHEAS and adipocyte size in women [42, 43], whereas one study observed a positive correlation between percent free T and fat cell volume [43]. More studies are needed to evaluate the functional impact of androgens on adipose tissue function.

Circulating androgen metabolites are interesting measures of androgenicity or overall androgen exposure. It has been observed that levels of 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol-glucuronide, a metabolite of DHT, are positively associated with visceral fat accumulation in men [44]. Moreover, consistent with the notion of an origin in adipose tissue, levels of this metabolite increase with weight gain [45], and decrease with weight loss [46]. Unfortunately, 3α -reduced metabolites could not be

examined in the present study. Further investigation will be needed to address this question in women.

This study has some limitations. To gain access to intra-abdominal adipose tissue, women were recruited through a gynecological surgery schedule and were not all cycling normally. However, apart from their gynecological condition, they were generally healthy and showed no sign of PCOS. Abnormal menstrual cycling was then assumed to result from gynecological anomalies. The small sample also represents a limitation of this study. The limited number of participants in the obese class II and III also limits the conclusion regarding this specific population. However, considering the important difficulties of accessing human adipocytes, we suggest that our study brings a significant contribution to the scant literature on circulating androgens and adipose tissue function markers in women. Trends were observed between some steroids and adiposity measurements, which may be related to sample size. These near-significant results support the main finding of the study that increased overall adiposity, rather visceral fat accumulation, is related to lower levels of androgens and adrenal steroid precursors in premenopausal women. This study is based on precise measurement techniques in a non-PCOS population and emphasizes the need to critically revise the general assumption that higher circulating androgen concentrations are found in conjunction with abdominal obesity in women.

Acknowledgements

We acknowledge the contribution of gynecologists, nurses, radiology technicians and the collaboration of participants. We express gratitude to Dr. Werner Römisch-Margl, Maria Kugler and Katharina Faschinger for their support with metabolomics assays at the Genome Analysis Center, Helmholtz Zentrum München.

Funding

Supported in part by funds from the Canadian Institutes of Health Research and a grant from the German Federal Ministry of Education and Research to the German Center for Diabetes Research (DZD e.V.). GBM was funded by the Natural

Sciences and Engineering Research Council of Canada, Diabète Québec and the Canadian Institutes of Health Research. AMC and SL were funded by Fond de recherche du Québec – Santé. JAC was funded by Alexander Graham Bell Canada Graduate Scholarships – Doctoral Program.

Disclosure statement

A.T. receives research grant support from Johnson & Johnson Medical Companies and Medtronic for studies unrelated to this manuscript. No author declared a conflict to interest.

Abbreviations

$\Delta 4$: Androstenedione; A: Aldosterone; ADT: Androsterone; 11-DOC: 11-deoxycorticosterone; 11-deoxy: 11-deoxycortisone; 17 OH-P: 17 α -hydroxyprogesterone; BMI: Body mass index; CORT: Corticosterone; CT: Computed tomography; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; DHEA: Dehydroepiandrosterone; DHEAS: Dehydroepiandrosterone sulphate; DHT: Dihydrotestosterone; DXA: Dual-energy X-ray absorptiometry; E: Cortisone; ESI-LC-MS/MS: Liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry; Et: Etiocholanolone; F: Cortisol; IL-6: Interleukin 6; PCOS: Polycystic ovary syndrome; PREG: Pregnenolone; SD: Standard deviation; T: Testosterone; TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

References

1. Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiological reviews*. 2013;93(1):359-404.
2. Michaud A, Laforest S, Pelletier M, Nadeau M, Simard S, Daris M, Leboeuf M, Vidal H, Geloën A, Tchernof A. Abdominal adipocyte populations in women with visceral obesity. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2016;174(2):227-39.
3. Cote JA, Nazare JA, Nadeau M, Leboeuf M, Blackburn L, Despres JP, Tchernof A. Computed tomography-measured adipose tissue attenuation and area both predict adipocyte size and cardiometabolic risk in women. *Adipocyte*. 2016;5(1):35-42.
4. Michaud A, Drolet R, Noel S, Paris G, Tchernof A. Visceral fat accumulation is an indicator of adipose tissue macrophage infiltration in women. *Metabolism: clinical and experimental*. 2012;61(5):689-98.
5. Ross R, Shaw KD, Rissanen J, Martel Y, de Guise J, Avruch L. Sex differences in lean and adipose tissue distribution by magnetic resonance imaging: anthropometric relationships. *Am J Clin Nutr*. 1994;59(6):1277-85.
6. Kuk JL, Lee S, Heymsfield SB, Ross R. Waist circumference and abdominal adipose tissue distribution: influence of age and sex. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(6):1330-4.
7. Lemieux S, Prud'homme D, Bouchard C, Tremblay A, Despres JP. Sex differences in the relation of visceral adipose tissue accumulation to total body fatness. *Am J Clin Nutr*. 1993;58(4):463-7.
8. Enzi G, Gasparo M, Biondetti PR, Fiore D, Semisa M, Zurlo F. Subcutaneous and visceral fat distribution according to sex, age, and overweight, evaluated by computed tomography. *Am J Clin Nutr*. 1986;44(6):739-46.
9. Evans DJ, Barth JH, Burke CW. Body fat topography in women with androgen excess. *International journal of obesity*. 1988;12(2):157-62.
10. Hauner H, Ditschuneit HH, Pal SB, Moncayo R, Pfeiffer EF. Fat distribution, endocrine and metabolic profile in obese women with and without hirsutism. *Metabolism: clinical and experimental*. 1988;37(3):281-6.
11. Pasquali R, Casimirri F. The impact of obesity on hyperandrogenism and polycystic ovary syndrome in premenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1993;39(1):1-16.
12. Glintborg D, Andersen M, Hagen C, Frystyk J, Hulstrom V, Flyvbjerg A, Hermann AP. Evaluation of metabolic risk markers in polycystic ovary syndrome (PCOS). Adiponectin, ghrelin, leptin and body composition in hirsute PCOS patients and controls. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2006;155(2):337-45.
13. Tziomalos K, Katsikis I, Papadakis E, Kandaraki EA, Macut D, Panidis D. Comparison of markers of insulin resistance and circulating androgens between women with polycystic ovary syndrome and women with metabolic syndrome. *Hum Reprod*. 2013;28(3):785-93.

14. Tchernof A, Brochu D, Maltais-Payette I, Fouad Mansour M, Marchand GB, Carreau A-M, Kepeluto J. Androgens and the regulation of body fat distribution in humans. *Comprehensive Physiology*. Pending revision.
15. Nagata C, Wada K, Nakamura K, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K. Associations of body size and reproductive factors with circulating levels of sex hormones and prolactin in premenopausal Japanese women. *Cancer Causes Control*. 2011;22(4):581-8.
16. Schilling C, Gallicchio L, Miller SR, Langenberg P, Zacur H, Flaws JA. Relation of body mass and sex steroid hormone levels to hot flushes in a sample of mid-life women. *Climacteric*. 2007;10(1):27-37.
17. Lukanova A, Lundin E, Zeleniuch-Jacquotte A, Muti P, Mure A, Rinaldi S, Dossus L, Micheli A, Arslan A, Lenner P, Shore RE, Krogh V, Koenig KL, Riboli E, Berrino F, Hallmans G, Stattin P, Toniolo P, Kaaks R. Body mass index, circulating levels of sex-steroid hormones, IGF-I and IGF-binding protein-3: a cross-sectional study in healthy women. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2004;150(2):161-71.
18. Gannage-Yared MH, Chedid R, Abs L. Relation between androgens and cardiovascular risk factors in a young population. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;74(6):720-5.
19. Janssen I, Powell LH, Jasielec MS, Kazlauskaite R. Covariation of change in bioavailable testosterone and adiposity in midlife women. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2015;23(2):488-94.
20. Baglietto L, English DR, Hopper JL, MacInnis RJ, Morris HA, Tilley WD, Krishnan K, Giles GG. Circulating steroid hormone concentrations in postmenopausal women in relation to body size and composition. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;115(1):171-9.
21. Clifton S, Macdowall W, Copas AJ, Tanton C, Keevil BG, Lee DM, Mitchell KR, Field N, Sonnenberg P, Bancroft J, Mercer CH, Wallace AM, Johnson AM, Wellings K, Wu FC. Salivary Testosterone Levels and Health Status in Men and Women in the British General Population: Findings from the Third National Survey of Sexual Attitudes and Lifestyles (Natsal-3). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(11):3939-51.
22. Côté J, Lessard J, Mailloux J, Laberge P, Rhéaume C, Tchernof A. Circulating 5 α -dihydrotestosterone and abdominal adipocyte characteristics in healthy women. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2012;12(2):391-400.
23. Deschenes D, Couture P, Dupont P, Tchernof A. Subdivision of the subcutaneous adipose tissue compartment and lipid-lipoprotein levels in women. *Obesity research*. 2003;11(3):469-76.
24. Breier M, Wahl S, Prehn C, Ferrari U, Sacco V, Weise M, Grallert H, Adamski J, Lechner A. Immediate reduction of serum citrulline but no change of steroid profile after initiation of metformin in individuals with type 2 diabetes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2017;174:114-9.
25. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. 2013:28 pages.

26. Laforest S, Michaud A, Paris G, Pelletier M, Vidal H, Geloën A, Tchernof A. Comparative analysis of three human adipocyte size measurement methods and their relevance for cardiometabolic risk. *Obesity* (Silver Spring, Md). 2017;25(1):122-31.
27. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981;29(4):577-80.
28. Michaud A, Tordjman J, Pelletier M, Liu Y, Laforest S, Noel S, Le Naour G, Bouchard C, Clement K, Tchernof A. Relevance of omental pericellular adipose tissue collagen in the pathophysiology of human abdominal obesity and related cardiometabolic risk. *International journal of obesity* (2005). 2016;40(12):1823-31.
29. Canello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, Coussieu C, Basdevant A, Bar Hen A, Bedossa P, Guerre-Millo M, Clement K. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes*. 2006;55(6):1554-61.
30. Cote JA, Lessard J, Mailloux J, Laberge P, Rheume C, Tchernof A. Circulating 5 α -dihydrotestosterone, abdominal obesity and adipocyte characteristics in women. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2012;12(2):391-400.
31. Laforest S, Labrecque J, Michaud A, Cianflone K, Tchernof A. Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2015:1-13.
32. Cherradi N, Capponi AM, Gaillard RC, Pralong FP. Decreased expression of steroidogenic acute regulatory protein: a novel mechanism participating in the leptin-induced inhibition of glucocorticoid biosynthesis. *Endocrinology*. 2001;142(8):3302-8.
33. Serke H, Nowicki M, Kosacka J, Schroder T, Kloting N, Bluher M, Kallendrusch S, Spaniel-Borowski K. Leptin-deficient (ob/ob) mouse ovaries show fatty degeneration, enhanced apoptosis and decreased expression of steroidogenic acute regulatory enzyme. *International journal of obesity* (2005). 2012;36(8):1047-53.
34. Krug AW, Vleugels K, Schinner S, Lamounier-Zepter V, Ziegler CG, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M. Human adipocytes induce an ERK1/2 MAP kinases-mediated upregulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and an angiotensin II-sensitization in human adrenocortical cells. *International journal of obesity* (2005). 2007;31(10):1605-16.
35. Tkachenko IV, Jaaskelainen T, Jaaskelainen J, Palvimo JJ, Voutilainen R. Interleukins 1 α and 1 β as regulators of steroidogenesis in human NCI-H295R adrenocortical cells. *Steroids*. 2011;76(10-11):1103-15.
36. Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(2):405-13.
37. Casson PR, Toth MJ, Johnson JV, Stanczyk FZ, Casey CL, Dixon ME. Correlation of serum androgens with anthropometric and metabolic indices in healthy, nonobese postmenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(9):4276-82.

38. Keller JL, Casson PR, Toth MJ. Relationship of androgens to body composition, energy and substrate metabolism and aerobic capacity in healthy, young women. *Steroids*. 2011;76(12):1247-51.
39. Davis SR, Worsley R. Androgen treatment of postmenopausal women. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;142:107-14.
40. Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Belanger A, Simard J, Lin SX, Pelletier G. Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. *Endocrine reviews*. 2003;24(2):152-82.
41. De Simone M, Verrotti A, Iughetti L, Palumbo M, Farello G, Di Cesare E, Bernabei R, Rosato T, Lozzi S, Criscione S. Increased visceral adipose tissue is associated with increased circulating insulin and decreased sex hormone binding globulin levels in massively obese adolescent girls. *Journal of endocrinological investigation*. 2001;24(6):438-44.
42. Garaulet M, Perex-Llamas F, Fuente T, Zamora S, Tebar FJ. Anthropometric, computed tomography and fat cell data in an obese population: relationship with insulin, leptin, tumor necrosis factor-alpha, sex hormone-binding globulin and sex hormones. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2000;143(5):657-66.
43. Evans DJ, Hoffmann RG, Kalkhoff RK, Kissebah AH. Relationship of androgenic activity to body fat topography, fat cell morphology, and metabolic aberrations in premenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1983;57(2):304-10.
44. Tchernof A, Labrie F, Belanger A, Prud'homme D, Bouchard C, Tremblay A, Nadeau A, Despres JP. Androstane-3alpha,17beta-diol glucuronide as a steroid correlate of visceral obesity in men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(5):1528-34.
45. Pritchard J, Despres JP, Gagnon J, Tchernof A, Nadeau A, Tremblay A, Bouchard C. Plasma adrenal, gonadal, and conjugated steroids before and after long-term overfeeding in identical twins. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(9):3277-84.
46. Pritchard J, Despres JP, Gagnon J, Tchernof A, Nadeau A, Tremblay A, Bouchard C. Plasma adrenal, gonadal, and conjugated steroids following long-term exercise-induced negative energy balance in identical twins. *Metabolism: clinical and experimental*. 1999;48(9):1120-7.

Figure headings

Figure 1: Plasma steroid concentrations as a function of BMI categories. BMI units in kg/m² *p≤0.1 **p≤0.05 ***p≤0.01

Figure 2: Visceral adipocyte diameter distributions in low-versus-high PREG subgroups (A), correlations between PREG and visceral attenuation (B) and markers of adipose tissue function in the low-versus-high PREG subgroups (C). Visceral adipocyte diameter and macrophages: n=13 in each group; Leptin: n=21 in each group; *p≤0.1 **p≤0.05 ***p≤0.01.

Figure 1

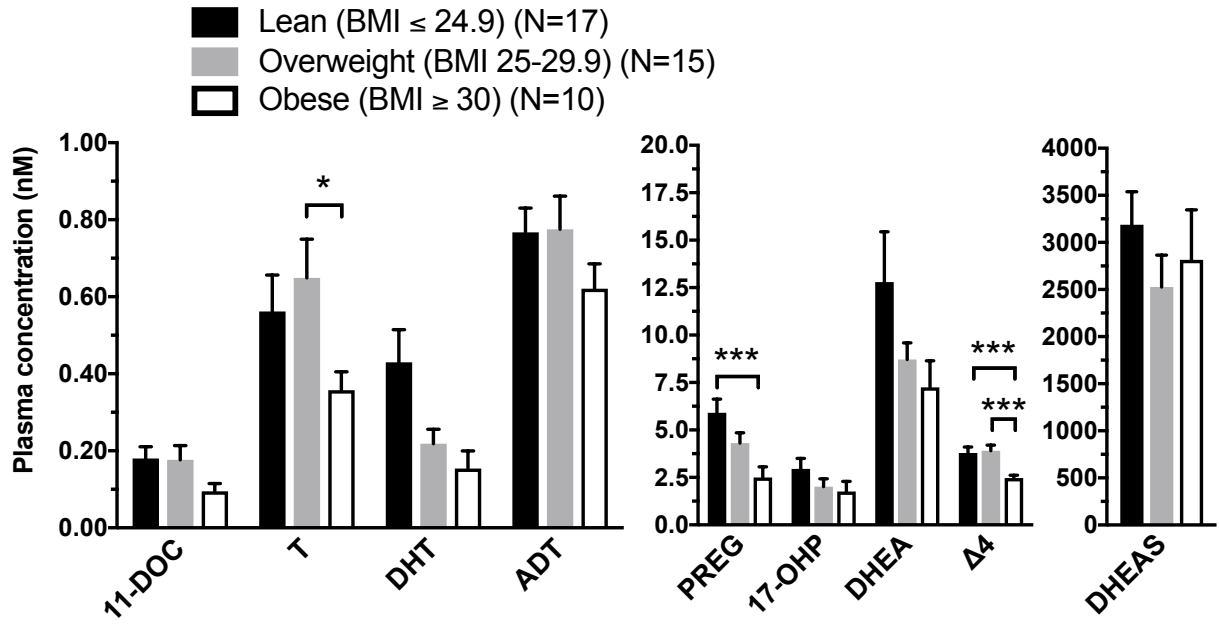


Figure 2

PREG

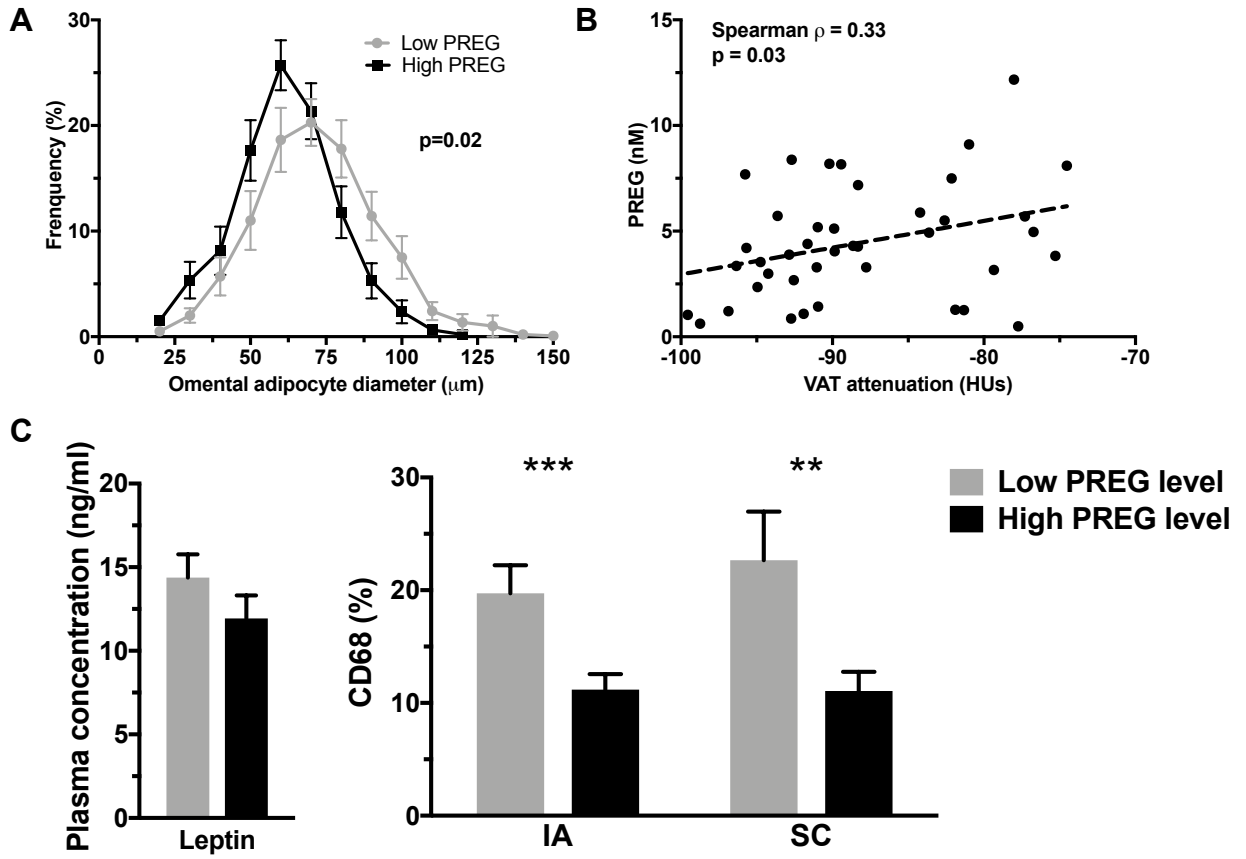


Table 1. Population characteristics (n=42)

	Mean	±	SD	Range (min-max)
Age (years)	45.8	±	3.4	38.2 – 52.3
Anthropometrics and body composition				
Waist circumference (cm)	92.7	±	11.3	72.5 – 123.5
BMI (kg/m ²)	27.1	±	4.2	20.2 – 37.0
Fat mass (kg)	25.5	±	7.3	12.4 – 43.6
Lean body mass (kg)	43.2	±	4.9	35.6 – 55.3
Total body fat percentage (%)	35.3	±	5.0	22.7 – 43.9

Abbreviations: BMI, body mass index; SD: standard deviation.

Table 2. Pairwise correlation coefficients between circulating levels of androgens, androgen precursors or metabolites and adiposity measurements

	DHEAS	DHEA ¹	Δ4	ADT	Et ⁴	T	DHT ³
Anthropometrics parameters							
BMI	-0.17	-0.30 ^c	-0.38 ^b	-0.23	-0.11	-0.10	-0.32 ^c
Waist circumference	-0.24	-0.36 ^b	-0.38 ^b	-0.38 ^b	-0.10	-0.15	-0.23
Percent body fat	-0.29 ^c	-0.28 ^c	-0.39 ^b	-0.28 ^c	-0.16	-0.06	-0.37 ^a
Abdominal tissue areas							
Subcutaneous ¹	-0.20	-0.28 ^c	-0.33 ^b	-0.30 ^b	-0.13	-0.08	-0.27
Visceral ¹	-0.05	-0.17	-0.35 ^b	-0.26 ^c	-0.10	-0.26 ^c	-0.16
Adipocyte mean diameters							
Visceral ²	-0.21	-0.24	-0.45 ^b	-0.34 ^c	-0.10	-0.48 ^a	-0.36 ^c
Subcutaneous ³	-0.20	-0.13	-0.30	-0.28	-0.04	-0.29	-0.15

^a p ≤ 0.01 ^b p ≤ 0.05 ^c p ≤ 0.1. ¹n=41 ²n=28 ³n=36 ⁴n=38. Abbreviations: DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate; DHEA, dehydroepiandrosterone; Δ4, androstenedione; ADT: androsterone; Et: etiocholanolone; T: testosterone; DHT, dihydrotestosterone. BMI and visceral abdominal tissue area were log-transformed. All steroid levels were log-transformed, except DHT which was transformed with the Box Cox formula.

Table 3. Pairwise correlation coefficients between circulating levels of adrenal steroid precursors, mineralocorticoids or glucocorticoids and adiposity measurements

	PREG	17-OH-P	11-DOC	11-deoxy	CORT	A ²	F	E
Anthropometric parameters								
BMI	-0.43 ^a	-0.26 ^c	-0.26 ^c	-0.19	-0.21	-0.02	-0.07	-0.05
Waist circumference	-0.46 ^a	-0.24	-0.22	-0.17	-0.14	-0.12	-0.11	-0.16
Percent body fat	-0.36 ^b	-0.19	-0.21	-0.24	-0.07	-0.12	-0.18	-0.17
Abdominal tissue area								
Subcutaneous ¹	-0.41 ^a	-0.21	-0.26 ^c	-0.24	-0.14	-0.06	-0.18	-0.19
Visceral ¹	-0.38 ^b	-0.19	-0.19	-0.17	-0.20	0.02	0.01	-0.11
Adipocyte mean diameters								
Visceral ²	-0.36 ^c	-0.32	-0.24	-0.16	-0.10	0.14	0.10	-0.22
Subcutaneous ³	-0.27	-0.20	-0.18	-0.05	-0.01	0.15	-0.06	-0.25

^a p ≤ 0.01 ^b p ≤ 0.05 ^c p ≤ 0.1. ¹ n=41 ² n=28 ³ n=26. Abbreviations: PREG: pregnenolone; 17-OH-P: 17-OH-progesterone; 11-DOC: 11-deoxycorticosterone; 11-deoxy: 11-deoxycortisone; CORT: corticosterone; A: aldosterone; F: cortisol; E: cortisone. BMI and visceral abdominal tissue area were log-transformed. All steroids were log-transformed, except pregnenolone which was transformed with the Box Cox formula

Conclusion

L'accumulation de graisse au niveau viscéral a un impact important sur l'incidence de plusieurs altérations métaboliques et maladies chroniques reliées à l'obésité (9). Le dimorphisme sexuel observé chez l'humain dans la distribution des graisses témoigne de l'importance des stéroïdes dans ce phénomène (6). La clarification de la relation entre les hormones sexuelles et la distribution des graisses ainsi que l'identification des mécanismes sous-jacents résulteraient en une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'accumulation de gras viscéral (6).

Nous avons étudié la relation entre la concentration plasmatique d'estrogènes ainsi que de plusieurs autres composés stéroïdiens et la distribution des graisses chez la femme ménopausée. Nos résultats démontrent que les estrogènes endogènes circulants (E2, E1, E1-S) sont fortement reliés à l'accumulation de graisse totale, la résistance à l'insuline et plusieurs altérations de paramètres métaboliques. Cependant, nous avons observé que l'impact des estrogènes sur les paramètres métaboliques était majoritairement expliqué par la variation concomitante de masse grasse. Par la suite, nous avons investigué la relation entre la concentration plasmatique de plusieurs androstanes et la distribution des graisses ainsi que la dysfonction du tissu adipeux chez la femme préménopausée. Plusieurs mesures d'adiposité étaient négativement associées à certains androgènes ($\Delta 4$, ADT, DHT) et précurseurs stéroïdiens (prégnénolone). Certains marqueurs de dysfonction adipocytaire, notamment le diamètre adipocytaire moyen viscéral et l'atténuation radiologique viscérale étaient négativement associés à la prégnénolone ou à la DHT. Ces associations étant particulièrement importantes avec la concentration plasmatique de prégnénolone, nous avons conclu qu'un faible taux de ce précurseur surrénalien pouvait être un marqueur de dysfonction adipocytaire.

À notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir comparé des patrons hormonaux mesurés à l'aide de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, une technique de mesure reconnue par l'*Endocrine Society* comme fournissant des données plus fiables que d'autres

techniques (107, 156), avec la masse grasse. De même, nous avons utilisé une méthode (TDM) permettant de différencier les deux dépôts de tissu adipeux abdominal, ce qui nous a permis de vérifier l'impact de ces différents stéroïdes sur la distribution des graisses. De plus, nous avons eu accès à des échantillons de graisse sous-cutanée et viscérale de femmes préménopausées minces à obèses, ce qui est un atout majeur dans cette étude. Ainsi, ces recherches apportent des éléments intéressants à la littérature actuelle sur la distribution des graisses et les hormones sexuelles chez la femme.

Forces et limites

Certaines limites doivent être soulevées. Ces données étant transversales, il est impossible d'établir une relation de cause à effet entre la distribution des graisses et la concentration plasmatique de stéroïdes. De plus, nos cohortes étant exclusivement composées de femmes, il est inadéquat de transposer ces résultats aux hommes. Comme les concentrations d'hormones ont été mesurées au niveau systémique, nous ne pouvons prétendre que les changements de concentrations hormonales sont exclusivement dus à la variation de masse grasse. Il est cependant important de noter que le tissu adipeux et la peau sont deux sites importants de conversion hormonale (83). Concernant notre deuxième étude, certaines associations auraient pu demeurer indétectables du fait du nombre restreint de sujets (n=42). Par ailleurs, certaines corrélations n'étaient pas significatives, probablement en raison d'un manque de puissance (voir les tableaux 2A et 2B, chapitre 2). Il est aussi important de mentionner que cette même cohorte était composée de femmes subissant une chirurgie gynécologique. Ainsi, il est possible que ces femmes présentent un patron hormonal différent du patron des femmes n'ayant pas ce type de complications. Cependant, la concentration moyenne de stéroïdes circulants se retrouvait dans les valeurs normales (voir chapitre 2, section *Subjects and methods*). Il est difficile d'avoir accès à du tissu adipeux viscéral et sous-cutané de femmes minces à obèses. Cette étude nous a donc permis d'obtenir des échantillons difficiles à acquérir autrement.

Tel que mentionné précédemment, l'utilisation d'une technique précise et spécifique pour mesurer la concentration plasmatique de stéroïdes est une force importante de notre étude. Ceci est d'autant plus important avec la population à l'étude, puisque celle-ci a de très faibles taux plasmatiques d'hormones, rendant ainsi difficile la détection du stéroïde et la précision essentielle. Ces concentrations ont aussi été mesurées dans les deux cohortes par deux centres différents (soit grâce à nos collaborateurs Dr Jerzy Adamski à Munich et Dr Fernand Labrie à Québec), ce qui évite que les résultats soient attribuables à la duplication d'une erreur méthodologique. De même, l'utilisation de la TDM nous a permis d'avoir les aires totale, sous-cutanée et viscérale de tissus adipeux, ce qui est une force majeure de notre étude. L'utilisation de critères stricts afin de déterminer si les femmes ménopausées étaient susceptibles de prendre une thérapie de remplacement hormonal nous a aussi permis de nous assurer que nous mesurons la relation entre les estrogènes endogènes et la masse grasse.

Perspectives

Plusieurs composantes de la conversion hormonale dans le tissu adipeux demandent d'être étudiées plus en profondeur. Notamment, il serait intéressant de comparer les concentrations plasmatiques de stéroïdes avec celles retrouvées dans le tissu adipeux. Ainsi, il serait pertinent de déterminer si de plus hauts taux de stéroïdes dans le tissu adipeux se reflètent par des taux plus élevés au niveau plasmatique. Il a été suggéré par Blouin et collaborateurs que les androgènes pourraient avoir un effet physiologique biphasique (159). Ce phénomène implique qu'il existerait une fenêtre physiologique dans laquelle les hormones sexuelles auraient un effet sur le métabolisme, cet effet différant dans un contexte de doses supra-physiologiques ou déficientes (159). Ce phénomène a par ailleurs été observé avec la DHT, son effet sur l'expression de la HSL dans les adipocytes sous-cutanés étant stimulateur ou inhibiteur selon la dose (204). Ce même effet biphasique sur la HSL et la LPL a été observé avec l'E2 dans les adipocytes sous-cutanés également (127). Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier ces effets des androgènes et des estrogènes sur la dysfonction adipocytaire *in vitro*. Il

serait aussi pertinent de valider cette hypothèse *in vivo*, en comparant les résultats entre des populations ayant des doses largement différentes d'hormones plasmatiques (exemple : femmes ménopausées versus femmes ménopausées prenant une thérapie de remplacement hormonal). Ces études pourraient réconcilier les disparités observées entre les femmes préménopausées et ménopausées. Finalement, il serait très intéressant et pertinent d'étudier davantage l'effet de la prégnénolone sur la dysfonction du tissu adipeux. Effectuer des études *in vitro* sur l'impact direct de ce stéroïde sur différents paramètres du métabolisme adipocytaire de même que sur la conversion des stéroïdes serait une avenue prometteuse dans la compréhension des phénomènes biochimiques entourant la relation entre la distribution des graisses et le statut hormonal chez l'humain.

Contexte nutritionnel

Dans l'extrapolation de ces résultats dans un contexte clinique, l'impact de la diète sur la distribution des graisses ou sur la concentration plasmatique hormonale est une question intéressante.

Durant ma maîtrise, j'ai pu participer à l'élaboration d'une revue de la littérature et à l'écriture d'un chapitre de livre concernant l'impact de la consommation de macro ou micronutriments sur la distribution des graisses (205). Nous avons observé dans la littérature actuelle que certains nutriments, comme le fructose, les acides gras trans et l'alcool, pouvaient être associés à une accumulation préférentielle de tissu adipeux au niveau abdominal (205). Cependant, les devis des études (souvent transversales), la difficulté à isoler l'effet d'un seul nutriment ainsi que la quantité assez faible d'études réalisées sur chacun des nutriments ne permettent pas d'affirmer un lien direct entre leur consommation et la distribution des graisses. Nous croyons beaucoup plus plausible que la diète ait un effet indirect sur la distribution des graisses. La diète peut positivement ou négativement affecter le bilan d'énergie, ce surplus ou déficit pouvant ensuite influencer la distribution des graisses selon le sexe et la génétique propre à chaque individu (205).

Certains chercheurs ont tenté de déterminer l'impact de la diète sur la concentration plasmatique d'hormones. Les phytoestrogènes font partie des nutriments les plus étudiés dans ce domaine. En effet, ces molécules présentes dans les végétaux ont une structure similaire aux estrogènes, ce qui leur permet de se lier aux ERs, particulièrement au ER β (206). Les phytoestrogènes sont divisés en plusieurs sous-catégories, dont les flavonoïdes, les isoflavones et les lignanes, ces deux dernières étant les plus étudiées (207). Une élégante étude de Morisset et collaborateurs montre que la consommation de lignanes serait associée à une masse grasse totale plus faible ainsi qu'une meilleure sensibilité à l'insuline (208). Plus récemment, Aubertin-Leheudre et collaborateurs ont tenté de déterminer la différence de concentrations plasmatiques d'estrogènes entre les femmes ménopausées omnivores et végétariennes (209). Ces chercheurs ont rapporté une concentration plasmatique moyenne plus faible d'E2, d'E1-S et d'E2 libre dans le groupe de femmes végétariennes (209). Cependant, ces femmes avaient en moyenne un poids et un IMC plus faibles que les femmes omnivores, suggérant que la masse grasse a pu interférer dans ces résultats (209). Il est cependant intéressant d'observer que certains composés alimentaires (la consommation de gras totaux, de fibres et le ratio gras totaux/fibres) sont associés à certains métabolites urinaires estrogéniques, malgré l'ajustement pour l'IMC (209). Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'élucider la relation entre la diète et la concentration plasmatique d'estrogènes. Parallèlement à ce phénomène, une revue de littérature par Morisset et collaborateurs portant sur la relation entre la diète et les androgènes plasmatiques conclut qu'aucune relation claire ne peut être actuellement démontrée entre les deux paramètres (210).

En résumé, les données probantes actuelles présentées ainsi que les deux articles originaux décrits dans ce mémoire démontrent sans équivoque que le tissu adipeux joue un rôle important dans la régulation du taux plasmatique d'hormones sexuelles. Une meilleure caractérisation de ce phénomène permettrait une compréhension plus poussée de la physiopathologie de l'obésité ainsi que de la distribution des graisses chez l'humain.

Bibliographie

1. Organisation mondiale de la santé. Obésité: Prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale. Genève: 2003.
2. Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. Indices of relative weight and obesity. *J Chronic Dis*. 1972;25:329-43.
3. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obesity research*. 1998;6 Suppl 2:51S-209S.
4. Agence de la santé publique du Canada. Institut canadien d'information sur la santé. Obésité au Canada: Rapport conjoint de l'Agence de la santé publique du Canada et de l'Institut canadien d'information sur la santé. 2011.
5. Shen W, Wang Z, Punyanita M, Lei J, Sinav A, Kral JG, Imielinska C, Ross R, Heymsfield SB. Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obesity research*. 2003;11:5-16.
6. Tchernof A, Brochu D, Maltais-Payette I, Fouad Mansour M, Marchand GB, Carreau A-M, Kepeleto J. Androgens and the regulation of body fat distribution in humans. *Comprehensive Physiology*. Pending revision.
7. Hu F. Measurements of Adiposity and Body Composition. . In: Hu F, editor. *Obesity Epidemiology*. New York City: Oxford University Press; 2008. p. 53-83.
8. Sjostrom L, Kvist H, Cederblad A, Tylen U. Determination of total adipose tissue and body fat in women by computed tomography, 40K, and tritium. *Am J Physiol*. 1986;250:E736-45.
9. Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiological reviews*. 2013;93:359-404.
10. Borkan GA, Gerzof SG, Robbins AH, Hults DE, Silbert CK, Silbert JE. Assessment of abdominal fat content by computed tomography. *Am J Clin Nutr*. 1982;36:172-7.
11. Klopfenstein BJ, Kim MS, Krisky CM, Szumowski J, Rooney WD, Purnell JQ. Comparison of 3 T MRI and CT for the measurement of visceral and subcutaneous adipose tissue in humans. *Br J Radiol*. 2012;85:e826-30.
12. Kullberg J, Brandberg J, Angelhed JE, Frimmel H, Bergelin E, Strid L, Ahlstrom H, Johansson L, Lonn L. Whole-body adipose tissue analysis: comparison of MRI, CT and dual energy X-ray absorptiometry. *Br J Radiol*. 2009;82:123-30.
13. Seidell JC, Bakker CJ, van der Kooy K. Imaging techniques for measuring adipose-tissue distribution--a comparison between computed tomography and 1.5-T magnetic resonance. *Am J Clin Nutr*. 1990;51:953-7.
14. Wells JC. Sexual dimorphism of body composition. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007;21:415-30.
15. Vague J. La différenciation sexuelle; facteur déterminant des formes de l'obésité. *Presse Med*. 1947;55:339.
16. Tchernof A. Sex differences in energy balance, body composition and body fat distribution. In: Brown F, Wyckoff J, Tsatsoulis A, editors. *Diabetes in women: Pathophysiology and Therapy*, 2009.

17. Lovejoy JC, Champagne CM, de Jonge L, Xie H, Smith SR. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. *International journal of obesity*. 2008;32:949-58.
18. Guthrie JR, Dennerstein L, Taffe JR, Lehert P, Burger HG. The menopausal transition: a 9-year prospective population-based study. The Melbourne Women's Midlife Health Project. *Climacteric*. 2004;7:375-89.
19. Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Benussi C, De Simone L, Genazzani AR. Climacteric modifications in body weight and fat tissue distribution. *Climacteric*. 1999;2:37-44.
20. Stefanska A, Bergmann K, Sypniewska G. Metabolic Syndrome and Menopause: Pathophysiology, Clinical and Diagnostic Significance. *Adv Clin Chem*. 2015;72:1-75.
21. Despres JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A, Bouchard C. Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis*. 1990;10:497-511.
22. Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism: clinical and experimental*. 1987;36:54-9.
23. Michaud A, Laforest S, Pelletier M, Nadeau M, Simard S, Daris M, Leboeuf M, Vidal H, Geloën A, Tchernof A. Abdominal adipocyte populations in women with visceral obesity. *European journal of endocrinology*. 2016;174:227-39.
24. Veilleux A, Caron-Jobin M, Noel S, Laberge PY, Tchernof A. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. *Diabetes*. 2011;60:1504-11.
25. Tchoukalova YD, Koutsari C, Karpayk MV, Votruba SB, Wendland E, Jensen MD. Subcutaneous adipocyte size and body fat distribution. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:56-63.
26. Laforest S, Labrecque J, Michaud A, Cianflone K, Tchernof A. Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2015:1-13.
27. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Ryden M, Frisen J, Bernard S, Arner P. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*. 2010;59:105-9.
28. Drolet R, Richard C, Sniderman AD, Mailloux J, Fortier M, Huot C, Rheaume C, Tchernof A. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *International journal of obesity*. 2008;32:283-91.
29. Laforest S, Labrecque J, Michaud A, Cianflone K, Tchernof A. Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2015;52:301-13.
30. Carobbio S, Pellegrinelli V, Vidal-Puig A. Adipose Tissue Function and Expandability as Determinants of Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol*. 2017;960:161-96.
31. Bluher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009;117:241-50.

32. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol.* 2016;7:30.
33. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation.* 2003;112:1796-808.
34. Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumie A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes.* 2004;53:1285-92.
35. Michaud A, Drolet R, Noel S, Paris G, Tchernof A. Visceral fat accumulation is an indicator of adipose tissue macrophage infiltration in women. *Metabolism: clinical and experimental.* 2012;61:689-98.
36. Sun K, Tordjman J, Clement K, Scherer PE. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab.* 2013;18:470-7.
37. Michaud A, Tordjman J, Pelletier M, Liu Y, Laforest S, Noel S, Le Naour G, Bouchard C, Clement K, Tchernof A. Relevance of omental pericellular adipose tissue collagen in the pathophysiology of human abdominal obesity and related cardiometabolic risk. *International journal of obesity.* 2016;40:1823-31.
38. Kabon B, Nagele A, Reddy D, Eagon C, Fleshman JW, Sessler DI, Kurz A. Obesity decreases perioperative tissue oxygenation. *Anesthesiology.* 2004;100:274-80.
39. Lolmede K, Durand de Saint Front V, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumie A. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity.* 2003;27:1187-95.
40. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. 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.* 2007;293:E1118-28.
41. Sommer G, Kralisch S, Stangl V, Vietzke A, Kohler U, Stepan H, Faber R, Schubert A, Lossner U, Bluher M, Stumvoll M, Fasshauer M. Secretory products from human adipocytes stimulate proinflammatory cytokine secretion from human endothelial cells. *J Cell Biochem.* 2009;106:729-37.
42. Labrecque J, Laforest S, Michaud A, Biertho L, Tchernof A. Impact of Bariatric Surgery on White Adipose Tissue Inflammation. *Can J Diabetes.* 2017;41:407-17.
43. Ohlson LO, Larsson B, Svardsudd K, Welin L, Eriksson H, Wilhelmsen L, Bjorntorp P, Tibblin G. The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes.* 1985;34:1055-8.
44. Pascot A, Despres JP, Lemieux I, Bergeron J, Nadeau A, Prud'homme D, Tremblay A, Lemieux S. Contribution of visceral obesity to the deterioration of the metabolic risk profile in men with impaired glucose tolerance. *Diabetologia.* 2000;43:1126-35.

45. Boyko EJ, Fujimoto WY, Leonetti DL, Newell-Morris L. Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care*. 2000;23:465-71.
46. Shah RV, Murthy VL, Abbasi SA, Blankstein R, Kwong RY, Goldfine AB, Jerosch-Herold M, Lima JA, Ding J, Allison MA. Visceral adiposity and the risk of metabolic syndrome across body mass index: the MESA Study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014;7:1221-35.
47. Smith U, Kahn BB. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. *Journal of internal medicine*. 2016;280:465-75.
48. Rasouli N, Molavi B, Elbein SC, Kern PA. Ectopic fat accumulation and metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*. 2007;9:1-10.
49. Kim JI, Huh JY, Sohn JH, Choe SS, Lee YS, Lim CY, Jo A, Park SB, Han W, Kim JB. Lipid-overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation. *Mol Cell Biol*. 2015;35:1686-99.
50. Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*. 2001;409:729-33.
51. Lumeng CN, Deyoung SM, Saltiel AR. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292:E166-74.
52. Kloting N, Graham TE, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Wason CJ, Fasshauer M, Schon MR, Stumvoll M, Bluher M, Kahn BB. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab*. 2007;6:79-87.
53. Meisinger C, Ruckert IM, Rathmann W, Doring A, Thorand B, Huth C, Kowall B, Koenig W. Retinol-binding protein 4 is associated with prediabetes in adults from the general population: the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg (KORA) F4 Study. *Diabetes Care*. 2011;34:1648-50.
54. Moraes-Vieira PM, Yore MM, Dwyer PM, Syed I, Aryal P, Kahn BB. RBP4 activates antigen-presenting cells, leading to adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance. *Cell Metab*. 2014;19:512-26.
55. Norseen J, Hosooka T, Hammarstedt A, Yore MM, Kant S, Aryal P, Kiernan UA, Phillips DA, Maruyama H, Kraus BJ, Usheva A, Davis RJ, Smith U, Kahn BB. Retinol-binding protein 4 inhibits insulin signaling in adipocytes by inducing proinflammatory cytokines in macrophages through a c-Jun N-terminal kinase- and toll-like receptor 4-dependent and retinol-independent mechanism. *Mol Cell Biol*. 2012;32:2010-9.
56. Despres JP. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update. *Circulation*. 2012;126:1301-13.
57. Lewis GF. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol*. 1997;8:146-53.
58. Klop B, Elte JW, Cabezas MC. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*. 2013;5:1218-40.
59. Lamarche B, Uffelman KD, Carpentier A, Cohn JS, Steiner G, Barrett PH, Lewis GF. Triglyceride enrichment of HDL enhances in vivo metabolic

- clearance of HDL apo A-I in healthy men. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103:1191-9.
60. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 2006;444:875-80.
 61. Stamler R, Stamler J, Riedlinger WF, Algera G, Roberts RH. Weight and blood pressure. Findings in hypertension screening of 1 million Americans. *Jama*. 1978;240:1607-10.
 62. Poirier P, Lemieux I, Mauriege P, Dewailly E, Blanchet C, Bergeron J, Despres JP. Impact of waist circumference on the relationship between blood pressure and insulin: the Quebec Health Survey. *Hypertension*. 2005;45:363-7.
 63. Thomas GN, Critchley JA, Tomlinson B, Anderson PJ, Lee ZS, Chan JC. Obesity, independent of insulin resistance, is a major determinant of blood pressure in normoglycemic Hong Kong Chinese. *Metabolism: clinical and experimental*. 2000;49:1523-8.
 64. Hayashi T, Boyko EJ, Leonetti DL, McNeely MJ, Newell-Morris L, Kahn SE, Fujimoto WY. Visceral adiposity and the prevalence of hypertension in Japanese Americans. *Circulation*. 2003;108:1718-23.
 65. Foster MC, Hwang SJ, Porter SA, Massaro JM, Hoffmann U, Fox CS. Fatty kidney, hypertension, and chronic kidney disease: the Framingham Heart Study. *Hypertension*. 2011;58:784-90.
 66. Nagase M, Yoshida S, Shibata S, Nagase T, Gotoda T, Ando K, Fujita T. Enhanced aldosterone signaling in the early nephropathy of rats with metabolic syndrome: possible contribution of fat-derived factors. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17:3438-46.
 67. Laville M. [Renal consequences of obesity]. *Nephrol Ther*. 2011;7:80-5.
 68. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106:3143-421.
 69. Larsson B, Svardsudd K, Welin L, Wilhelmsen L, Bjorntorp P, Tibblin G. Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984;288:1401-4.
 70. Lapidus L, Bengtsson C, Larsson B, Pennert K, Rybo E, Sjostrom L. Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984;289:1257-61.
 71. Dagenais GR, Yi Q, Mann JF, Bosch J, Pogue J, Yusuf S. Prognostic impact of body weight and abdominal obesity in women and men with cardiovascular disease. *American heart journal*. 2005;149:54-60.
 72. Katzmarzyk PT, Church TS, Janssen I, Ross R, Blair SN. Metabolic syndrome, obesity, and mortality: impact of cardiorespiratory fitness. *Diabetes Care*. 2005;28:391-7.
 73. Lee JJ, Pedley A, Hoffmann U, Massaro JM, Fox CS. Association of Changes in Abdominal Fat Quantity and Quality With Incident Cardiovascular Disease

- Risk Factors. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016;68:1509-21.
74. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet*. 2017;389:1238-52.
 75. Joyce T, Chirino YI, Natalia MT, Jose PC. Renal damage in the metabolic syndrome (MetSx): Disorders implicated. *Eur J Pharmacol*. 2018;818:554-68.
 76. Huh JH, Yadav D, Kim JS, Son JW, Choi E, Kim SH, Shin C, Sung KC, Kim JY. An association of metabolic syndrome and chronic kidney disease from a 10-year prospective cohort study. *Metabolism: clinical and experimental*. 2017;67:54-61.
 77. Basen-Engquist K, Chang M. Obesity and cancer risk: recent review and evidence. *Curr Oncol Rep*. 2011;13:71-6.
 78. Larsson SC, Wolk A. Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr*. 2007;86:556-65.
 79. Yamamoto S, Nakagawa T, Matsushita Y, Kusano S, Hayashi T, Irokawa M, Aoki T, Korogi Y, Mizoue T. Visceral fat area and markers of insulin resistance in relation to colorectal neoplasia. *Diabetes Care*. 2010;33:184-9.
 80. von Hafe P, Pina F, Perez A, Tavares M, Barros H. Visceral fat accumulation as a risk factor for prostate cancer. *Obesity research*. 2004;12:1930-5.
 81. Ryan AM, Duong M, Healy L, Ryan SA, Parekh N, Reynolds JV, Power DG. Obesity, metabolic syndrome and esophageal adenocarcinoma: epidemiology, etiology and new targets. *Cancer Epidemiol*. 2011;35:309-19.
 82. Chen GC, Chen SJ, Zhang R, Hidayat K, Qin JB, Zhang YS, Qin LQ. Central obesity and risks of pre- and postmenopausal breast cancer: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Obes Rev*. 2016;17:1167-77.
 83. Bulun SE. Physiology and pathology of the female reproductive axis. In: Melmed S, S. PK, Larsen RP, M. KH, editors. *Williams textbook of endocrinology*. 13th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016.
 84. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*. 2003;3:281-92.
 85. Chen GG, Zeng Q, Tse GM. Estrogen and its receptors in cancer. *Med Res Rev*. 2008;28:954-74.
 86. Purdy RH, Engel LL, Oncley JL. The characterization of estrone sulfate from human plasma. *J Biol Chem*. 1961;236:1043-50.
 87. Nguyen TD, Dolomie-Fagour L, Georges A, Corcuff JB. [What about bioavailable estradiol?]. *Ann Biol Clin*. 2008;66:493-7.
 88. Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1981;53:58-68.
 89. Tworoger SS, Eliassen AH, Missmer SA, Baer H, Rich-Edwards J, Michels KB, Barbieri RL, Dowsett M, Hankinson SE. Birthweight and body size throughout life in relation to sex hormones and prolactin concentrations in premenopausal women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2006;15:2494-501.

90. Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Gracia CR. Obesity and reproductive hormone levels in the transition to menopause. *Menopause*. 2010;17:718-26.
91. Yeung EH, Zhang C, Albert PS, Mumford SL, Ye A, Perkins NJ, Wactawski-Wende J, Schisterman EF. Adiposity and sex hormones across the menstrual cycle: the BioCycle Study. *International journal of obesity*. 2013;37:237-43.
92. Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Belanger A, Simard J, Lin SX, Pelletier G. Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. *Endocrine reviews*. 2003;24:152-82.
93. Grodin JM, Siiteri PK, MacDonald PC. Source of estrogen production in postmenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1973;36:207-14.
94. Tchernof A, Mansour MF, Pelletier M, Boulet MM, Nadeau M, Luu-The V. Updated survey of the steroid-converting enzymes in human adipose tissues. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015;147:56-69.
95. MacDonald PC, Edman CD, Hemsell DL, Porter JC, Siiteri PK. Effect of obesity on conversion of plasma androstenedione to estrone in postmenopausal women with and without endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 1978;130:448-55.
96. Castracane VD, Kraemer GR, Ogden BW, Kraemer RR. Interrelationships of serum estradiol, estrone, and estrone sulfate, adiposity, biochemical bone markers, and leptin in post-menopausal women. *Maturitas*. 2006;53:217-25.
97. McTiernan A, Wu L, Chen C, Chlebowski R, Mossavar-Rahmani Y, Modugno F, Perri MG, Stanczyk FZ, Van Horn L, Wang CY, Women's Health Initiative I. Relation of BMI and physical activity to sex hormones in postmenopausal women. *Obesity*. 2006;14:1662-77.
98. Mahabir S, Baer DJ, Johnson LL, Hartman TJ, Dorgan JF, Campbell WS, Clevidence BA, Taylor PR. Usefulness of body mass index as a sufficient adiposity measurement for sex hormone concentration associations in postmenopausal women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2006;15:2502-7.
99. Bezemer ID, Rinaldi S, Dossus L, Gils CH, Peeters PH, Noord PA, Bueno-de-Mesquita HB, Johnsen SP, Overvad K, Olsen A, Tjonneland A, Boeing H, Lahmann PH, Linseisen J, Nagel G, Allen N, Roddam A, Bingham S, Khaw KT, Kesse E, Tehard B, Clavel-Chapelon F, Agudo A, Ardanaz E, Quiros JR, Amiano P, Martinez-Garcia C, Tormo MJ, Pala V, Panico S, Vineis P, Palli D, Tumino R, Trichopoulou A, Baibas N, Zilis D, Hemon B, Norat T, Riboli E, Kaaks R. C-peptide, IGF-I, sex-steroid hormones and adiposity: a cross-sectional study in healthy women within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes Control*. 2005;16:561-72.
100. Hankinson SE, Willett WC, Manson JE, Hunter DJ, Colditz GA, Stampfer MJ, Longcope C, Speizer FE. Alcohol, height, and adiposity in relation to estrogen and prolactin levels in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:1297-302.

101. Barbosa JC, Shultz TD, Filley SJ, Nieman DC. The relationship among adiposity, diet, and hormone concentrations in vegetarian and nonvegetarian postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1990;51:798-803.
102. Tanko LB, Bruun JM, Alexandersen P, Bagger YZ, Richelsen B, Christiansen C, Larsen PJ. Novel associations between bioavailable estradiol and adipokines in elderly women with different phenotypes of obesity: implications for atherogenesis. *Circulation.* 2004;110:2246-52.
103. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam A, Dorgan JF, Longcope C, Stanczyk FZ, Stephenson HE, Jr., Falk RT, Miller R, Schatzkin A, Allen DS, Fentiman IS, Key TJ, Wang DY, Dowsett M, Thomas HV, Hankinson SE, Toniolo P, Akhmedkhanov A, Koenig K, Shore RE, Zeleniuch-Jacquotte A, Berrino F, Muti P, Micheli A, Krogh V, Sieri S, Pala V, Venturelli E, Secreto G, Barrett-Connor E, Laughlin GA, Kabuto M, Akiba S, Stevens RG, Neriishi K, Land CE, Cauley JA, Kuller LH, Cummings SR, Helzlsouer KJ, Alberg AJ, Bush TL, Comstock GW, Gordon GB, Miller SR, Longcope C, Endogenous Hormones Breast Cancer Collaborative G. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:1218-26.
104. Mongraw-Chaffin ML, Anderson CA, Allison MA, Ouyang P, Szklo M, Vaidya D, Woodward M, Golden SH. Association between sex hormones and adiposity: qualitative differences in women and men in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2015;100:E596-600.
105. Stolzenberg-Solomon RZ, Falk RT, Stanczyk F, Hoover RN, Appel LJ, Ard JD, Batch BC, Coughlin J, Han X, Lien LF, Pinkston CM, Svetkey LP, Katki HA. Sex hormone changes during weight loss and maintenance in overweight and obese postmenopausal African-American and non-African-American women. *Breast Cancer Res.* 2012;14:R141.
106. Kim C, Dabelea D, Kalyani RR, Christophi CA, Bray GA, Pi-Sunyer X, Darwin CH, Yalamanchi S, Barrett-Connor E, Golden SH, Boyko EJ. Changes in Visceral Adiposity, Subcutaneous Adiposity, and Sex Hormones in the Diabetes Prevention Program. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2017;102:3381-9.
107. Rosner W, Hankinson SE, Sluss PM, Vesper HW, Wierman ME. Challenges to the measurement of estradiol: an endocrine society position statement. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2013;98:1376-87.
108. Labrie F, Belanger A, Belanger P, Berube R, Martel C, Cusan L, Gomez J, Candas B, Castiel I, Chaussade V, Deloche C, Leclaire J. Androgen glucuronides, instead of testosterone, as the new markers of androgenic activity in women. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2006;99:182-8.
109. Ke Y, Bertin J, Gonthier R, Simard JN, Labrie F. A sensitive, simple and robust LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of seven androgen- and estrogen-related steroids in postmenopausal serum. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2014;144 Pt B:523-34.

110. Labrie F, Ke Y, Gonthier R, Belanger A. Why both LC-MS/MS and FDA-compliant validation are essential for accurate estrogen assays? *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015;149:89-91.
111. Labrie F, Ke Y, Gonthier R, Belanger A. Letter to the Editor: Superior Mass Spectrometry-Based Estrogen Assays Should Replace Immunoassays. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100:L86-7.
112. Cooper BC, Burger NZ, Toth MJ, Cushman M, Sites CK. Insulin resistance with hormone replacement therapy: associations with markers of inflammation and adiposity. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196:123 e1-7.
113. Dedeoglu EN, Erenus M, Yoruk P. Effects of hormone therapy and tibolone on body composition and serum leptin levels in postmenopausal women. *Fertility and sterility*. 2009;91:425-31.
114. Hansen RD, Raja C, Baber RJ, Lieberman D, Allen BJ. Effects of 20-mg oestradiol implant therapy on bone mineral density, fat distribution and muscle mass in postmenopausal women. *Acta Diabetol*. 2003;40 Suppl 1:S191-5.
115. Norman RJ, Flight IH, Rees MC. Oestrogen and progestogen hormone replacement therapy for peri-menopausal and post-menopausal women: weight and body fat distribution. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000:CD001018.
116. Salpeter SR, Walsh JM, Ormiston TM, Greyber E, Buckley NS, Salpeter EE. Meta-analysis: effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Diabetes Obes Metab*. 2006;8:538-54.
117. Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7:715-26.
118. Koehler KF, Helguero LA, Haldosen LA, Warner M, Gustafsson JA. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocrine reviews*. 2005;26:465-78.
119. Wade GN, Gray JM. Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiol Behav*. 1979;22:583-93.
120. D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem*. 2005;280:35983-91.
121. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:12729-34.
122. Musatov S, Chen W, Pfaff DW, Mobbs CV, Yang XJ, Clegg DJ, Kaplitt MG, Ogawa S. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:2501-6.
123. Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Hohmann S, Hartge M, Sprang C, Frost N, Krikov M, Bhanot S, Barros R, Morani A, Gustafsson JA, Unger T, Kintscher U. Metabolic actions of estrogen receptor beta (ERbeta) are mediated by a negative cross-talk with PPARgamma. *PLoS Genet*. 2008;4:e1000108.

124. Martensson UE, Salehi SA, Windahl S, Gomez MF, Sward K, Daszkiewicz- Nilsson J, Wendt A, Andersson N, Hellstrand P, Grande PO, Owman C, Rosen CJ, Adamo ML, Lundquist I, Rorsman P, Nilsson BO, Ohlsson C, Olde B, Leeb-Lundberg LM. Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice. *Endocrinology*. 2009;150:687-98.
125. Sharma G, Hu C, Brigman JL, Zhu G, Hathaway HJ, Prossnitz ER. GPER deficiency in male mice results in insulin resistance, dyslipidemia, and a proinflammatory state. *Endocrinology*. 2013;154:4136-45.
126. Newell-Fugate AE. The role of sex steroids in white adipose tissue adipocyte function. *Reproduction*. 2017;153:R133-R49.
127. Palin SL, McTernan PG, Anderson LA, Sturdee DW, Barnett AH, Kumar S. 17Beta-estradiol and anti-estrogen ICI:compound 182,780 regulate expression of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in isolated subcutaneous abdominal adipocytes. *Metabolism: clinical and experimental*. 2003;52:383-8.
128. Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *The Journal of endocrinology*. 2012;212:3-12.
129. Dieudonne MN, Pecquery R, Leneuve MC, Giudicelli Y. Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *Endocrinology*. 2000;141:649-56.
130. Anderson LA, McTernan PG, Barnett AH, Kumar S. The effects of androgens and estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: influence of gender and site. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86:5045-51.
131. Tchoukalova YD, Koutsari C, Votruba SB, Tchkonja T, Giorgadze N, Thomou T, Kirkland JL, Jensen MD. Sex- and depot-dependent differences in adipogenesis in normal-weight humans. *Obesity*. 2010;18:1875-80.
132. Dieudonne MN, Leneuve MC, Giudicelli Y, Pecquery R. Evidence for functional estrogen receptors alpha and beta in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286:C655-61.
133. Isensee J, Meoli L, Zazzu V, Nabzdyk C, Witt H, Soewarto D, Effertz K, Fuchs H, Gailus-Durner V, Busch D, Adler T, de Angelis MH, Irgang M, Otto C, Noppinger PR. Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. *Endocrinology*. 2009;150:1722-30.
134. Zhu P, Yuen JM, Sham KW, Cheng CH. GPER mediates the inhibitory actions of estrogen on adipogenesis in 3T3-L1 cells through perturbation of mitotic clonal expansion. *General and comparative endocrinology*. 2013;193:19-26.
135. Meyer MR, Clegg DJ, Prossnitz ER, Barton M. Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors. *Acta Physiol*. 2011;203:259-69.

136. Crespo CJ, Smit E, Snelling A, Sempos CT, Andersen RE, Nhanes, III. Hormone replacement therapy and its relationship to lipid and glucose metabolism in diabetic and nondiabetic postmenopausal women: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Diabetes Care*. 2002;25:1675-80.
137. Friday KE, Dong C, Fontenot RU. Conjugated equine estrogen improves glycemic control and blood lipoproteins in postmenopausal women with type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86:48-52.
138. Ahmed-Sorour H, Bailey CJ. Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. Interaction with insulin, glucagon and epinephrine. *Horm Res*. 1980;13:396-403.
139. Bailey CJ, Ahmed-Sorour H. Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. Effects of insulin secretion. *Diabetologia*. 1980;19:475-81.
140. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquie M, Gauthier BR, Nef S, Stefani E, Nadal A. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS one*. 2008;3:e2069.
141. Le May C, Chu K, Hu M, Ortega CS, Simpson ER, Korach KS, Tsai MJ, Mauvais-Jarvis F. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:9232-7.
142. Brussaard HE, Gevers Leuven JA, Frolich M, Kluff C, Krans HM. Short-term oestrogen replacement therapy improves insulin resistance, lipids and fibrinolysis in postmenopausal women with NIDDM. *Diabetologia*. 1997;40:843-9.
143. Barros RP, Machado UF, Warner M, Gustafsson JA. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:1605-8.
144. Hong SC, Yoo SW, Cho GJ, Kim T, Hur JY, Park YK, Lee KW, Kim SH. Correlation between estrogens and serum adipocytokines in premenopausal and postmenopausal women. *Menopause*. 2007;14:835-40.
145. Machinal F, Dieudonne MN, Leneveu MC, Pecquery R, Giudicelli Y. In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. *Endocrinology*. 1999;140:1567-74.
146. Riad-Gabriel MG, Jinagouda SD, Sharma A, Boyadjian R, Saad MF. Changes in plasma leptin during the menstrual cycle. *European journal of endocrinology*. 1998;139:528-31.
147. Rafique N, Salem AM, Latif R, MH AL. Serum leptin level across different phases of menstrual cycle in normal weight and overweight/obese females. *Gynecol Endocrinol*. 2017:1-4.
148. Kluff C, Leuven JA, Helmerhorst FM, Krans HM. Pro-inflammatory effects of oestrogens during use of oral contraceptives and hormone replacement treatment. *Vascul Pharmacol*. 2002;39:149-54.

149. Lakryc EM, Machado RB, Soares Jr JM, Fernandes CE, 3rd, Baracat EC. What is the influence of hormone therapy on homocysteine and crp levels in postmenopausal women? *Clinics*. 2015;70:107-13.
150. Karim R, Stanczyk FZ, Hodis HN, Cushman M, Lobo RA, Hwang J, Mack WJ. Associations between markers of inflammation and physiological and pharmacological levels of circulating sex hormones in postmenopausal women. *Menopause*. 2010;17:785-90.
151. Cossette E, Cloutier I, Tardif K, DonPierre G, Tanguay JF. Estradiol inhibits vascular endothelial cells pro-inflammatory activation induced by C-reactive protein. *Mol Cell Biochem*. 2013;373:137-47.
152. Styne DM, Grumbach MM. Physiology and disorders of puberty. In: Melmed S, S. PK, Larsen RP, M. KH, editors. *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016.
153. Swerdloff RS, Dudley RE, Page ST, Wang C, Salameh WA. Dihydrotestosterone: Biochemistry, Physiology, and Clinical Implications of Elevated Blood Levels. *Endocrine reviews*. 2017;38:220-54.
154. Luu-The V, Labrie F. The intracrine sex steroid biosynthesis pathways. *Prog Brain Res*. 2010;181:177-92.
155. Demers LM. Androgen deficiency in women; role of accurate testosterone measurements. *Maturitas*. 2010;67:39-45.
156. Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92:405-13.
157. Taylor AE, Keevil B, Huhtaniemi IT. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. *European journal of endocrinology*. 2015;173:D1-12.
158. Pasquali R, Casimirri F, Cantobelli S, Melchionda N, Morselli Labate AM, Fabbri R, Capelli M, Bortoluzzi L. Effect of obesity and body fat distribution on sex hormones and insulin in men. *Metabolism: clinical and experimental*. 1991;40:101-4.
159. Blouin K, Boivin A, Tchernof A. Androgens and body fat distribution. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007;108:272-80.
160. Blouin K, Despres JP, Couillard C, Tremblay A, Prud'homme D, Bouchard C, Tchernof A. Contribution of age and declining androgen levels to features of the metabolic syndrome in men. *Metabolism: clinical and experimental*. 2005;54:1034-40.
161. Corona G, Monami M, Rastrelli G, Aversa A, Tishova Y, Saad F, Lenzi A, Forti G, Mannucci E, Maggi M. Testosterone and metabolic syndrome: a meta-analysis study. *J Sex Med*. 2011;8:272-83.
162. Tchernof A, Labrie F. Dehydroepiandrosterone, obesity and cardiovascular disease risk: a review of human studies. *European journal of endocrinology*. 2004;151:1-14.
163. Corona G, Giagulli VA, Maseroli E, Vignozzi L, Aversa A, Zitzmann M, Saad F, Mannucci E, Maggi M. Testosterone supplementation and body composition: results from a meta-analysis of observational studies. *Journal of endocrinological investigation*. 2016;39:967-81.

164. Corona G, Giagulli VA, Maseroli E, Vignozzi L, Aversa A, Zitzmann M, Saad F, Mannucci E, Maggi M. THERAPY OF ENDOCRINE DISEASE: Testosterone supplementation and body composition: results from a meta-analysis study. *European journal of endocrinology*. 2016;174:R99-116.
165. Janssen I, Powell LH, Kazlauskaitė R, Dugan SA. Testosterone and visceral fat in midlife women: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN) fat patterning study. *Obesity*. 2010;18:604-10.
166. Goss AM, Darnell BE, Brown MA, Oster RA, Gower BA. Longitudinal associations of the endocrine environment on fat partitioning in postmenopausal women. *Obesity*. 2012;20:939-44.
167. Vaidya D, Dobs A, Gapstur SM, Golden SH, Cushman M, Liu K, Ouyang P. Association of baseline sex hormone levels with baseline and longitudinal changes in waist-to-hip ratio: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *International journal of obesity*. 2012;36:1578-84.
168. Guthrie JR, Dennerstein L, Taffe JR, Ebeling PR, Randolph JF, Burger HG, Wark JD. Central abdominal fat and endogenous hormones during the menopausal transition. *Fertility and sterility*. 2003;79:1335-40.
169. Tchernof A, Despres JP. Sex steroid hormones, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women. *Horm Metab Res*. 2000;32:526-36.
170. Nagata C, Wada K, Nakamura K, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K. Associations of body size and reproductive factors with circulating levels of sex hormones and prolactin in premenopausal Japanese women. *Cancer Causes Control*. 2011;22:581-8.
171. Guducu N, Gormus U, Kutay SS, Kavak ZN, Telatar B. Endogenous sex hormones and their associations with cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *Journal of endocrinological investigation*. 2013;36:588-92.
172. Braunstein GD, Johnson BD, Stanczyk FZ, Bittner V, Berga SL, Shaw L, Hodgson TK, Paul-Labrador M, Azziz R, Merz CN. Relations between endogenous androgens and estrogens in postmenopausal women with suspected ischemic heart disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93:4268-75.
173. Cao Y, Zhang S, Zou S, Xia X. The relationship between endogenous androgens and body fat distribution in early and late postmenopausal women. *PloS one*. 2013;8:e58448.
174. Schilling C, Gallicchio L, Miller SR, Langenberg P, Zacur H, Flaws JA. Relation of body mass and sex steroid hormone levels to hot flushes in a sample of mid-life women. *Climacteric*. 2007;10:27-37.
175. Janssen I, Powell LH, Jasielec MS, Kazlauskaitė R. Covariation of change in bioavailable testosterone and adiposity in midlife women. *Obesity*. 2015;23:488-94.
176. Sternfeld B, Liu K, Quesenberry CP, Jr., Wang H, Jiang SF, Daviglius M, Fornage M, Lewis CE, Mahan J, Schreiner PJ, Schwartz SM, Sidney S, Williams OD, Siscovick DS. Changes over 14 years in androgenicity and body mass index in a biracial cohort of reproductive-age women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93:2158-65.

177. Jones ME, Schoemaker M, Rae M, Folkerd EJ, Dowsett M, Ashworth A, Swerdlow AJ. Changes in estradiol and testosterone levels in postmenopausal women after changes in body mass index. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98:2967-74.
178. Gannage-Yared MH, Chedid R, Abs L. Relation between androgens and cardiovascular risk factors in a young population. *Clin Endocrinol*. 2011;74:720-5.
179. Miller GD, Nicklas BJ, Davis CC, Legault C, Messier SP. Basal growth hormone concentration increased following a weight loss focused dietary intervention in older overweight and obese women. *J Nutr Health Aging*. 2012;16:169-74.
180. Aubuchon M, Liu Y, Petroski GF, Thomas TR, Polotsky AJ. The impact of supervised weight loss and intentional weight regain on sex hormone binding globulin and testosterone in premenopausal women. *Syst Biol Reprod Med*. 2016;62:283-9.
181. Côté J, Lessard J, Mailloux J, Laberge P, Rhéaume C, Tchernof A. Circulating 5 α -dihydrotestosterone and abdominal adipocyte characteristics in healthy women. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2012;12:391-400.
182. Pasquali R, Antenucci D, Melchionda N, Fabbri R, Venturoli S, Patrono D, Capelli M. Sex hormones in obese premenopausal women and their relationships to body fat mass and distribution, B cell function and diet composition. *Journal of endocrinological investigation*. 1987;10:345-50.
183. Pedersen SB, Borglum JD, Brixen K, Richelsen B. Relationship between sex hormones, body composition and metabolic risk parameters in premenopausal women. *European journal of endocrinology*. 1995;133:200-6.
184. Xu XF, De Pergola G, Bjorntorp P. Testosterone increases lipolysis and the number of beta-adrenoceptors in male rat adipocytes. *Endocrinology*. 1991;128:379-82.
185. Xu X, De Pergola G, Bjorntorp P. The effects of androgens on the regulation of lipolysis in adipose precursor cells. *Endocrinology*. 1990;126:1229-34.
186. Rebuffe-Scrive M, Marin P, Bjorntorp P. Effect of testosterone on abdominal adipose tissue in men. *Int J Obes*. 1991;15:791-5.
187. Li M, Bjorntorp P. Effects of testosterone on triglyceride uptake and mobilization in different adipose tissues in male rats in vivo. *Obesity research*. 1995;3:113-9.
188. Varlamov O, White AE, Carroll JM, Bethea CL, Reddy A, Slayden O, O'Rourke RW, Roberts CT, Jr. Androgen effects on adipose tissue architecture and function in nonhuman primates. *Endocrinology*. 2012;153:3100-10.
189. Tagliaferro AR, Ronan AM, Payne J, Meeker LD, Tse S. Increased lipolysis to beta-adrenergic stimulation after dehydroepiandrosterone treatment in rats. *Am J Physiol*. 1995;268:R1374-80.
190. Karbowska J, Kochan Z. Fat-reducing effects of dehydroepiandrosterone involve upregulation of ATGL and HSL expression, and stimulation of lipolysis in adipose tissue. *Steroids*. 2012;77:1359-65.

191. Mauriege P, Martel C, Langin D, Lacaille M, Despres JP, Belanger A, Labrie F, Deshaies Y. Chronic effects of dehydroepiandrosterone on rat adipose tissue metabolism. *Metabolism: clinical and experimental*. 2003;52:264-72.
192. Hernandez-Morante JJ, Perez-de-Heredia F, Lujan JA, Zamora S, Garaulet M. Role of DHEA-S on body fat distribution: gender- and depot-specific stimulation of adipose tissue lipolysis. *Steroids*. 2008;73:209-15.
193. Dicker A, Ryden M, Naslund E, Muehlen IE, Wiren M, Lafontan M, Arner P. Effect of testosterone on lipolysis in human pre-adipocytes from different fat depots. *Diabetologia*. 2004;47:420-8.
194. Varlamov O, Chu MP, McGee WK, Cameron JL, O'Rourke RW, Meyer KA, Bishop CV, Stouffer RL, Roberts CT, Jr. Ovarian cycle-specific regulation of adipose tissue lipid storage by testosterone in female nonhuman primates. *Endocrinology*. 2013;154:4126-35.
195. Zerradi M, Dereumetz J, Boulet MM, Tchernof A. Androgens, body fat Distribution and Adipogenesis. *Curr Obes Rep*. 2014;3:396-403.
196. Mirowska A, Sledzinski T, Smolenski RT, Swierczynski J. Down-regulation of Zac1 gene expression in rat white adipose tissue by androgens. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;140:63-70.
197. Gupta V, Bhasin S, Guo W, Singh R, Miki R, Chauhan P, Choong K, Tchkonja T, Lebrasseur NK, Flanagan JN, Hamilton JA, Viereck JC, Narula NS, Kirkland JL, Jasuja R. Effects of dihydrotestosterone on differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells and preadipocytes. *Molecular and cellular endocrinology*. 2008;296:32-40.
198. Rice SP, Zhang L, Grennan-Jones F, Agarwal N, Lewis MD, Rees DA, Ludgate M. Dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment in vitro inhibits adipogenesis in human omental but not subcutaneous adipose tissue. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;320:51-7.
199. Machinal-Quelin F, Dieudonne MN, Pecquery R, Leneuve MC, Giudicelli Y. Direct in vitro effects of androgens and estrogens on ob gene expression and leptin secretion in human adipose tissue. *Endocrine*. 2002;18:179-84.
200. Wabitsch M, Blum WF, Muche R, Braun M, Hube F, Rascher W, Heinze E, Teller W, Hauner H. Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100:808-13.
201. Fajardo ME, Malacara JM, Martinez-Rodriguez HG, Barrera-Saldana HA. Hormone and metabolic factors associated with leptin mRNA expression in pre- and postmenopausal women. *Steroids*. 2004;69:425-30.
202. Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, Matsuda M, Kondo H, Furuyama N, Kihara S, Nakamura T, Tochino Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes*. 2002;51:2734-41.
203. Horenburg S, Fischer-Posovszky P, Debatin KM, Wabitsch M. Influence of sex hormones on adiponectin expression in human adipocytes. *Horm Metab Res*. 2008;40:779-86.
204. Anderson LA, McTernan PG, Harte AL, Barnett AH, Kumar S. The regulation of HSL and LPL expression by DHT and flutamide in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetes Obes Metab*. 2002;4:209-13.

205. Laforest S, Marchand GB, Tchernof A. Diet as a Potential Modulator of Body Fat Distribution. In: Bergeron N, Siri-Tarino PW, Bray GA, Krauss RM, editors. Nutrition and Cardiometabolic Health. BocaRaton, FL. : CRC Press/Taylor and Francis Group; 2017. p. 123-48.
206. Sirotkin AV, Harrath AH. Phytoestrogens and their effects. Eur J Pharmacol. 2014;741:230-6.
207. Dixon RA. Phytoestrogens. Annu Rev Plant Biol. 2004;55:225-61.
208. Morisset AS, Lemieux S, Veilleux A, Bergeron J, John Weisnagel S, Tchernof A. Impact of a lignan-rich diet on adiposity and insulin sensitivity in postmenopausal women. The British journal of nutrition. 2009;102:195-200.
209. Aubertin-Leheudre M, Hamalainen E, Adlercreutz H. Diets and hormonal levels in postmenopausal women with or without breast cancer. Nutr Cancer. 2011;63:514-24.
210. Morisset AS, Blouin K, Tchernof A. Impact of diet and adiposity on circulating levels of sex hormone-binding globulin and androgens. Nutr Rev. 2008;66:506-16.