

Université de Sherbrooke

**Modulation de la lipoprotéine lipase adipocytaire
dans le syndrome de résistance à l'insuline**

par

DANIEL PANAROTTO

Département de médecine, service d'endocrinologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.) en Sciences cliniques

Sherbrooke, le 19 janvier 2001



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-74267-9

Canada

Sherbrooke, lundi 4 décembre 2000.

Objet : Autorisation de microfilmage de la thèse de Daniel Panarotto par les co-auteurs des articles scientifiques.

À qui de droit :

Voici la signature de co-auteurs des articles scientifiques contenus dans la thèse de monsieur Daniel Panarotto afin d'autoriser la microfilmage de la thèse par le service des thèses canadiennes.

M. Daniel Panarotto

M Pierre Maheux

M. Jacques Poisson

M. Ghislain Devroede

M. Jean-Luc Ardilouze

M. Daniel Tessier

Cordialement,

Daniel Panarotto

Membres du jury :

Madame Gina Bravo, Ph.D.

**Présidente du jury
Directrice du Programme de sciences cliniques
Faculté de médecine
Université de Sherbrooke**

Monsieur Pierre Maheux, M.D.

**Directeur de recherche
Département de médecine
Faculté de médecine
Université de Sherbrooke**

Monsieur Diego Bellabarba, M.D.

**Membre externe au Programme de sciences cliniques
Département de médecine
Faculté de médecine
Université de Sherbrooke**

Monsieur Yves Deshaies, M.D.

**Membre extérieur à l'université
Département d'anatomie et physiologie
Faculté de médecine
Université Laval**

Monsieur Jean Patrice Baillergeon, M.D.

**Membre substitut
Département de médecine
Faculté de médecine
Université de Sherbrooke**

RESUME

Le syndrome de résistance à l'insuline est associé à l'hypertension, à l'intolérance au glucose et à la dyslipidémie. La présence de ces anomalies métaboliques chez un même individu le rend très à risque de développer des maladies cardio-vasculaires. Dans ce travail, nous avons étudié un des mécanismes par lequel la résistance à l'insuline mène à la dyslipidémie. L'anomalie du métabolisme des lipoprotéines accompagnant ce syndrome est caractérisée par une augmentation des triglycérides plasmatiques, par une diminution du cholestérol HDL et par la formation des particules LDL petites et denses, triade reconnue pour son haut potentiel athérogénique. L'hypertriglycéridémie observée dans la résistance à l'insuline est favorisée par une augmentation de la production des lipoprotéines riches en triglycérides par le foie mais pourrait également être le résultat d'une diminution du catabolisme des triglycérides. Cette dernière tâche est accomplie par l'enzyme lipoprotéine lipase (LPL). Des données récentes suggèrent que la LPL produite par le tissu adipeux pourrait faire défaut dans la résistance à l'insuline lorsque des individus ont été évalués après une période de jeûne de 12 heures. Cependant, il est important de savoir si cette anomalie se répète en période postprandiale, un moment caractérisé par une demande accrue de l'action de la LPL. En effet, une diminution de l'activité de la LPL adipo-cytaire dans cette période pourrait être partiellement responsable de l'augmentation des triglycérides plasmatiques observée dans le syndrome de résistance à l'insuline. La problématique concernant l'activité de la LPL dans le tissu adipeux a été couverte dans le premier article de cette thèse. Nous avons recruté 26 volontaires en santé (12 femmes, 14 hommes), chez lesquels nous avons mesuré la résistance à l'insuline par le test de suppression à l'insuline, les triglycérides plasmatiques, l'activité, la masse immunoréactive et les niveaux d'équilibre des ARNm de la LPL dans le tissu adipeux, et l'activité de la LPL dans le plasma après une injection d'héparine. Puisque notre étude s'intéressait à la période postprandiale, toutes les variables, hormis la résistance à l'insuline, ont été mesurées après un

repas standard. Les résultats de cette étude confirment que le phénomène de résistance à l'insuline est associé à une diminution de la LPL adipocytaire dans la période postprandiale. De plus, la diminution de la LPL adipocytaire est significativement associée à une augmentation des triglycérides plasmatiques.

Pour mieux connaître l'impact de ces données, nous avons décidé de mener une étude comparative de l'activité et de l'expression génétique de la LPL dans les tissus adipeux viscéral et sous-cutané abdominal. Les participants de cette étude incluaient 20 volontaires subissant une intervention chirurgicale abdominale pour des maladies non infectieuses. La justification de l'étude repose sur deux prémisses. En premier abord, le tissu adipeux sous-cutané abdominal a une haute activité de la LPL autant chez les hommes que chez les femmes, suggérant que l'activité LPL dans la région abdominale contribue de façon significative à l'activité LPL globale de tout l'organisme. De plus, le tissu adipeux viscéral est probablement responsable de la présence de plusieurs facteurs de risque cardio-vasculaires. Donc, les altérations éventuelles de la LPL dans le tissu adipeux sous-cutané abdominal auraient un impact physiologique encore plus fort si elles reflétaient les événements produits dans le tissu adipeux viscéral. Les données présentées dans ce deuxième article montrent que l'activité de la LPL dans la graisse sous-cutanée est corrélée avec l'activité de la LPL dans la graisse viscérale.

En conclusion, nos travaux montrent que la résistance à l'insuline est associée à une diminution de la LPL adipocytaire dans le tissu sous-cutané abdominal. Les résultats de notre deuxième article nous ont permis de prévoir que cette diminution aurait un fort impact physiologique, car il y avait une corrélation entre l'activité de l'enzyme dans les tissus sous-cutané abdominal et viscéral. En effet, notre premier article montre que les altérations de la LPL adipocytaire obtenues par des biopsies de tissu adipeux sous-cutané sont associées avec une augmentation des triglycérides plasmatiques. Ces résultats

suggèrent que la diminution de la LPL adipocytaire dans la période postprandiale pourrait être une cause de l'hypertriglycéridémie retrouvée dans le syndrome de résistance à l'insuline.

REMERCIEMENTS

Mon étude de doctorat a été rendue possible grâce à la collaboration de plusieurs personnes.

Je tiens tout d'abord à remercier spécialement le Dr Pierre Maheux, mon directeur de recherche, pour son soutien inconditionnel, et dont le sens critique et les encouragements ont été très importants pour mon développement personnel ainsi que pour l'amélioration de la qualité de mon travail.

J'aimerais remercier particulièrement le Dr Jean-Luc Ardilouze avec qui j'ai établi mes premiers contacts et qui a également agi comme directeur de mes recherches à mon arrivée.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Mme Lucie Bouffard pour son aide précieuse dans la réalisation des analyses de laboratoire, à Mme Estelle Chamoux qui a révisé la thèse et a permis qu'il y ait le moins d'erreurs de français possible, à M. Patrick Rémillard et Mme Julie Ménard pour leur amitié et leurs conseils utiles, et au personnel du Centre de recherche clinique du CHUS, dont Mme Hélène Brown et Mme Line Larrivée, pour leur contribution durant l'étape clinique de mon travail.

Je m'en voudrais de ne pas remercier les membres de mon jury pour leur implication et leur avis à la réalisation de cette thèse.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à tous les volontaires qui ont participé aux recherches en tant que sujets d'étude pour leur collaboration soutenue et précieuse sans laquelle la recherche ne serait pas possible.

Enfin, je veux remercier mon épouse Claudia et les nombreux amis(es) que j'ai eu la chance de connaître, pour le soutien moral qu'ils m'ont apporté tout au long de mes études doctorales.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	I
REMERCIEMENTS	IV
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
INTRODUCTION	1
RÉSISTANCE À L'INSULINE	4
MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES	8
<i>Importance de la période postprandial</i>	15
LIPOPROTÉINE LIPASE	19
<i>Biologie</i>	20
<i>Modulation</i>	27
<i>Autres rôles physiologiques et pathophysiologiques</i>	28
REVUE DE LITTÉRATURE	30
<i>Modulation nutritionnelle</i>	30
<i>Diabète</i>	32
<i>Insuline</i>	34
<i>Obésité</i>	39
<i>Résistance à l'insuline</i>	42
<i>Hétérogénéité du tissu adipeux par rapport à l'expression et à l'activité de la lipoprotéine lipase</i>	44
JUSTIFICATION, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	48
<i>Premier article</i>	48
<i>Deuxième article</i>	49

DISCUSSION.....	50
FORCES ET LIMITES DE L'ÉTUDE.....	73
<i>Forces</i>	73
<i>Limites</i>	74
AVANCEMENT DES CONNAISSANCES APPORTÉ PAR CETTE ÉTUDE	77
HYPOTHÈSES DÉCOULANT DE CE TRAVAIL ET PERSPECTIVES D'AVENIR.....	78
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	80
RÉFÉRENCES	81

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Page
TABLEAU 1. CARACTÉRISTIQUES DES LIPOPROTÉINES PLASMATIQUES.....	9
TABLEAU 2. MODULATEURS PHYSIOLOGIQUES DE LA LIPOPROTÉINE LIPASE.....	28
TABLEAU 3. COMPARAISON ENTRE L'ÉTUDE DE MAHEUX <i>ET AL.</i> ET LA NÔTRE.....	58
TABLEAU 4. CORRÉLATIONS AYANT UN RÉSULTAT DIFFÉRENT DÉPENDAMMENT DU SEXE.....	63
TABLEAU 5. COMPARAISON DE L'ÉCHANTILLON DANS NOS DEUX ÉTUDES.....	70

LISTE DES FIGURES

Figures	Page
FIGURE 1. SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DE L'INSULINE.....	5
FIGURE 2. MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES.....	11
FIGURE 3. STRUCTURE PRIMAIRE DE LA LIPOPROTÉINE LIPASE HUMAINE.....	21
FIGURE 4. STRUCTURE TERTIAIRE DE LA LIPOPROTÉINE LIPASE.....	22
FIGURE 5. LE RÔLE DE L'INSULINE DANS LA PRODUCTION, SÉCRÉTION ET MIGRATION DE LA LIPOPROTÉINE LIPASE VERS LE COMPARTIMENT ENDOTHÉLIAL.....	23
FIGURE 6 DISTRIBUTION DU SSPG.....	51
FIGURE 7. SCÉNARIOS POSSIBLES POUR LA MODULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DE LA LIPOPROTÉINE LIPASE DANS DEUX DÉPÔTS ADIPEUX DIFFÉRENTS.....	67
FIGURE 8. SCHÉMA MONTRANT LES PRINCIPALES CORRÉLATIONS MONTRÉES DANS NOTRE ÉTUDE.....	72

INTRODUCTION

La longévité et les taux de mortalité des populations occidentales ont connu des changements radicaux au cours du XX^e siècle. Tandis que le citoyen ne vivait en moyenne que 45 années au début du siècle, la longévité peut actuellement dépasser 75 ans dans les pays les plus développés.¹ Dans ce contexte de vieillissement de la population, les maladies cardio-vasculaires (MCV) sont devenues une cause prépondérante de mortalité. Depuis le milieu du siècle, l'évolution du style de vie vers la sédentarité^{2,3} et vers une diète plus riche en graisses^{4,5} favorise le développement de l'athérosclérose et est directement reliée à une augmentation de l'incidence des affections cardiaques.

L'identification des facteurs de risque pour les MCV a été réalisée lors d'une étude débutée en 1948 dans la ville de Framingham (Massachusetts) portant sur 5,209 hommes et femmes âgés de 30 à 60 ans.⁶ Les résultats de cette étude ont permis d'établir que le cholestérol élevé (cholestérol total et cholestérol LDL), l'âge (≥ 45 ans pour les hommes et ≥ 55 ans pour les femmes), les niveaux bas de cholestérol HDL, l'hypertension, le diabète, le tabagisme et l'histoire familiale de MCV précoces sont les facteurs de risque coronarien les plus importants.⁷ Bien que l'obésité et le manque d'activité physique ne soient pas inclus dans la liste précédente, ils sont aussi considérés des facteurs de risque importants.⁷ D'autres facteurs de risque tels que l'homocystéine, le fibrinogène et la microalbuminurie ont été identifiés ultérieurement. Toutefois, le lien physiopathologique entre ces éléments et l'athérosclérose n'a pas été montré avec exactitude. Plusieurs de ces facteurs de risque comme le diabète ou l'intolérance au glucose, l'obésité viscérale, l'hypertension et la dyslipidémie se regroupent souvent chez un même individu. Le nom de «syndrome X»^a a donc été proposé pour définir cette association d'anomalies.⁸ La caractéristique commune à tous ces éléments est une diminution de la

captation du glucose par le muscle, phénomène connu comme la résistance à l'insuline,^b qui contribue au développement de chacune des anomalies métaboliques du syndrome. Dans ce travail, nous avons étudié la dyslipidémie, une facette importante de ce syndrome plurimétabolique. L'anomalie du métabolisme des lipoprotéines accompagnant ce syndrome est caractérisée par une augmentation des triglycérides plasmatiques qui, à son tour, contribue à la diminution du cholestérol HDL et à la formation de particules LDL petites et denses, triade reconnue pour son haut potentiel athérogénique.^{9,10} L'hypertriglycéridémie observée dans la résistance à l'insuline est favorisée par une augmentation de la production des lipoprotéines riches en triglycérides par le foie mais pourrait également être le résultat d'une diminution du catabolisme des triglycérides. La dégradation des lipoprotéines riches en triglycérides est effectuée, *in vivo*, par l'enzyme lipoprotéine lipase (LPL) produite principalement par le muscle et par le tissu adipeux. Des données récentes suggèrent que la LPL produite par le tissu adipeux pourrait faire défaut dans le syndrome de résistance à l'insuline.¹¹ En effet, une diminution de l'activité de la LPL adipocytaire pourrait être partiellement responsable de l'augmentation des triglycérides plasmatiques observée dans le syndrome de résistance à l'insuline. Le premier article de cette thèse aura donc pour but d'évaluer la relation entre la résistance à l'insuline et la LPL adipocytaire chez l'être humain en période postprandial.

Le tissu adipeux, jadis relégué à un simple dépôt de graisses, est aujourd'hui reconnu comme étant un organe actif: en effet, des hormones, des cytokines et des enzymes y sont produites, assurant ainsi une multitude de fonctions importantes dans le métabolisme des lipides et glucides, entre autres.¹² Cependant, le tissu adipeux est un organe hétérogène car ses caractéristiques métaboliques varient considérablement selon sa localisation. Par exemple, le tissu adipeux viscéral, comparé au tissu adipeux

a Le syndrome X est aussi appelé syndrome de résistance à l'insuline, syndrome métabolique ou syndrome plurimétabolique.

sous-cutané, produit plus d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1(PAI-1),¹³ de 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 3,¹⁴ de protéine découplante 2 (UCP-2),¹⁵ mais moins de leptine.¹⁶ Il a également été montré comme étant plus susceptible à la lipolyse.¹⁷ Ces caractéristiques particulières aux adipocytes intra-abdominaux sont vraisemblablement responsables de l'association entre l'accumulation de graisse viscérale et le risque élevé de MCV.¹⁸⁻²¹ Cependant, en ce qui concerne la LPL, le comportement du tissu adipeux viscéral comparé au tissu adipeux sous-cutané est peu connu. Ainsi le deuxième article de cette thèse, décrit une étude comparative de l'activité et de l'expression génétique de l'enzyme dans les tissus adipeux viscéral et sous-cutané abdominal. Les données présentées dans cet article nous permettront de savoir dans quelle mesure les résultats obtenus sur des biopsies de tissu adipeux sous-cutané, pourront être extrapolés aux dépôts de graisse viscérale.

Dans cette introduction, nous ferons en premier lieu un bref rappel sur quelques éléments indispensables à la compréhension de nos objectifs et hypothèses. Nous aborderons tout d'abord le phénomène de résistance à l'insuline. La section suivante portera sur le métabolisme des lipoprotéines ainsi que sur les conséquences de la résistance à l'insuline sur les lipides plasmatiques. Dans cette partie, nous soulèverons également le rôle d'un possible défaut d'action de la lipoprotéine lipase sur les anomalies lipidiques du syndrome métabolique. Ensuite, nous consacrerons une section à la biologie et la physiologie de la lipoprotéine lipase. La section suivante portera sur les relations entre résistance à l'insuline et LPL. Finalement, nous ferons dans la dernière section une revue de la littérature portant sur la comparaison entre la lipoprotéine lipase dans différents dépôts de graisse, aboutissant alors aux objectifs et hypothèses de la présente thèse.

^b Les termes résistance à l'insuline et insulino-résistance, seront utilisés au long de cette thèse comme synonymes alors que sensibilité à l'insuline y sera utilisée comme antonyme.

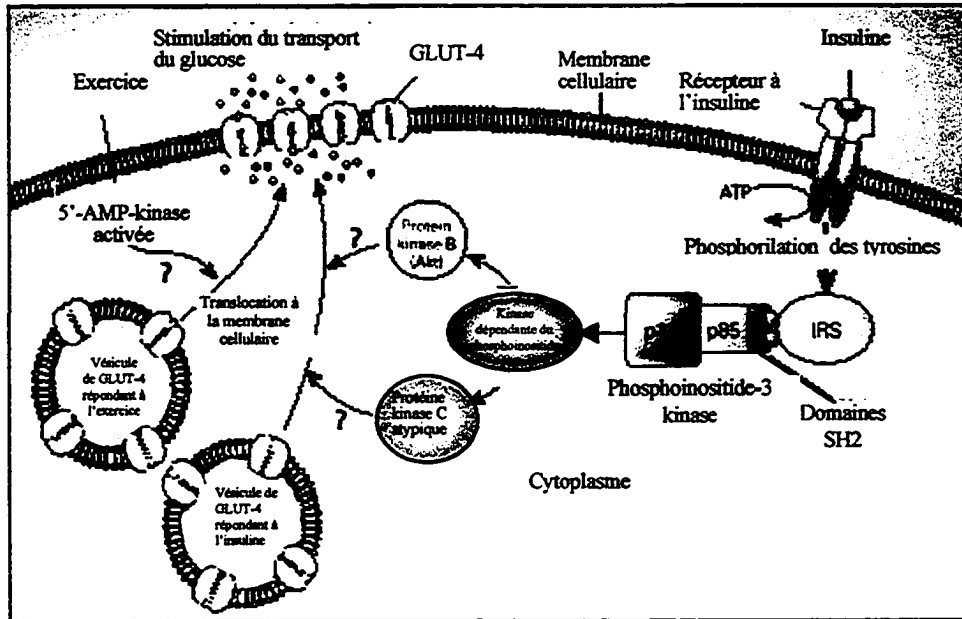
RESISTANCE A L'INSULINE

La résistance à l'insuline peut être définie, d'une façon générale, comme une diminution de l'action de l'insuline sur ses tissus cibles. Chez l'individu non diabétique, la diminution de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques entraîne une accumulation fugace du glucose dans le plasma, qui, à son tour, entraîne une production pancréatique accrue d'insuline. L'état de résistance à l'insuline est donc accompagné d'une hyperinsulinémie compensatrice et les taux plasmatiques d'insuline à jeun sont souvent utilisés comme marqueur du syndrome métabolique dans plusieurs études épidémiologiques.²²⁻

²⁴ Les conséquences néfastes du phénomène de résistance à l'insuline peuvent être attribuées soit au défaut d'action de l'insuline, soit à l'hyperinsulinémie compensatrice. Dans ce dernier cas, les cellules qui ne sont pas atteintes par la résistance à l'insuline peuvent souffrir de l'excès de l'insuline.

Bien que le mécanisme d'action intracellulaire de l'insuline ne soit pas encore complètement connu, des progrès remarquables ont été faits dans les dernières décades. L'insuline se lie à un récepteur glycoprotéique hétérotétramérique transmembranaire composé de deux sous-unités α et deux sous-unités β . Avec la liaison de l'hormone, certains résidus tyrosine du domaine cytoplasmique du récepteur sont phosphorylés et activent le substrat du récepteur de l'insuline de type 1 (IRS-1). Une fois phosphorylé, l'IRS-1 lie des protéines ayant des domaines SH2 (*Src homology 2*), dont la phosphatidylinositol (PI) 3'-kinase, qui est impliquée dans la translocation des transporteurs de glucose GLUT-4 à la membrane cellulaire. Simultanément, l'IRS-1 phosphorylé lie la protéine d'ancrage GRB-2 et peut ainsi activer la p21^{ras} et la cascade des MAP-kinases. Les effets de l'insuline sur l'expression génique pourraient se faire via cette voie de signalisation intracellulaire.²⁵ Voir Figure 1.

Figure 1. Signalisation intracellulaire de l'insuline.



Adaptée de la publication de Shepherd et Kahn.²⁶

Le défaut précis provoquant la résistance à l'insuline reste encore un mystère. La quantité et la capacité de liaison du récepteur à l'insuline, ainsi que les niveaux protéiques et d'ARNm de GLUT-4 sont normaux chez des individus insulino-résistants.²⁷ Par contre, la translocation de GLUT4 à la membrane cellulaire semble être défectueuse chez des individus obèses et diabétiques de type 2, deux groupes de sujets insulino-résistants.²⁸ Plusieurs éléments de la cascade de signalisation intracellulaire de l'insuline ont été potentiellement impliqués dans cette anomalie. L'IRS-1 a été le premier élément étudié. En effet, une diminution de la phosphorylation d'IRS-1 a été démontrée chez des individus insulino-résistants.^{29,30} Cependant et de façon surprenante, l'inactivation du gène d'IRS-1 chez la souris ne provoque qu'une faible résistance à l'insuline, suggérant ainsi que la diminution de cette protéine n'est pas la seule responsable du défaut d'action de l'insuline.^{31,32} Actuellement, on implique souvent la diminution des niveaux de PI 3'-kinase dans le défaut de translocation des GLUT-4 à la membrane plasmique. Toutefois, la diminution de cette protéine n'est pas suffisante pour expliquer tous les cas de résistance à l'insuline.^{29,30} De façon intéressante, des tyrosine phosphatases et un des substrats de la protéine kinase C, la «*phosphoprotein enriched in diabetes*» (PED) sont surexprimés dans les états d'insulino-résistance.^{33,34} Ces protéines intracellulaires inhibent la translocation des transporteurs de glucose à la membrane; leur augmentation pourrait donc entraîner le défaut de captation du glucose. Considérant toutes ces données, il est probable que le défaut responsable de la résistance à l'insuline soit multifactoriel et que plus d'une protéine soit impliquée.

La résistance à l'insuline *stricto sensu* est définie comme une diminution de la captation du glucose par le tissu musculaire. Cependant, lorsqu'un individu est résistant à l'insuline, tel que défini ci-haut, le défaut d'action de l'insuline s'avère un phénomène plus généralisé, et touche également d'autres organes clés du métabolisme intermédiaire, comme le tissu adipeux et le foie.³⁵

La résistance à l'insuline est un phénomène commun dans la population. Dans une étude menée chez 100 hommes et femmes en santé, Reaven *et al.*³⁶ ont mesuré la résistance à l'insuline par la méthode du clamp hyperinsulinique euglycémique. Lors de ce test, en faisant la médiane et les percentiles des valeurs correspondant à la résistance à l'insuline, les auteurs se sont aperçus que les individus regroupés dans le premier quartile étaient aussi résistants à l'insuline que des individus diabétiques de type 2. Ils sont donc parvenus à la conclusion que 25% des individus normaux non diabétiques présentaient une résistance à l'insuline.

En outre, l'importance du syndrome métabolique découle non seulement de sa haute prévalence mais aussi de son implication comme facteur de risque cardio-vasculaire. En effet, la résistance à l'insuline est potentiellement responsable de plusieurs anomalies métaboliques menant à un risque cardio-vasculaire augmenté chez des individus non-diabétiques,^{8,18,37-42} et diabétiques.⁴³

Dans les prochains paragraphes, nous aborderons les mécanismes par lesquels la résistance à l'insuline mène à une de ces anomalies métaboliques, la dyslipidémie. Les concepts discutés forment les bases de l'hypothèse du premier article de notre thèse, selon laquelle la résistance à l'insuline serait responsable d'une activité réduite de la LPL adipocytaire. La diminution du catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides, conséquence d'une baisse d'activité de la LPL, provoquerait une augmentation des triglycérides plasmatiques et mènerait ainsi à la génération d'un profil lipidique à haut potentiel athérogénique.

METABOLISME DES LIPOPROTEINES

Le métabolisme des lipoprotéines est complexe et plusieurs aspects de sa physiologie ne sont que partiellement connus. Cette section est destinée à offrir un aperçu de la physiologie des lipoprotéines à jeun ou dans l'état postprandial.

La circulation des triglycérides (molécules hydrophobes) dans le plasma ne pourrait pas avoir lieu sans la présence de transporteurs spécialisés, appelés lipoprotéines. Ces molécules complexes regroupent des protéines (appelées apoprotéines) et des quantités variables de triglycérides, de phospholipides et de cholestérol. La composition de ces particules mène à un complexe dont la surface extérieure est polaire et l'intérieur est hydrophobe.⁴⁴ Les lipoprotéines s'étalent sur un continuum de taille et densité mais peuvent être classifiées selon un ordre croissant de densité, en chylomicrons, VLDL, IDL, LDL et HDL. Les caractéristiques de chacune de ces lipoprotéines sont montrées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Caractéristiques des lipoprotéines plasmatiques.

	Diamètre (nm)	Densité (g/dL)	Apoprotéines*	Lipides (%)		
				TG	Cholestérol	PL
Chylomicrons	75-1200	0.95	Apo AI , apo AII, apo AIV, apo B48 , apo CI, apo CII, apo CIII, apo E	80-95	2-7	3-9
VLDL	30-80	0.95-1.006	Apo B100 , apo CI, apo CII, apo CIII, apo E	55-80	5-15	10-20
IDL	25-35	1.006-1.019	Apo B100 , apo CI, apo CII, apo CIII, apo E	20-50	20-40	15-25
LDL	18-25	1.019-1.063	Apo B100	5-15	40-50	20-25
HDL	5-12	1.063-1.21	Apo AI , apo AII, apo AIV, apo B48 , apo CI, apo CII, apo CIII, apo E	5-10	15-25	20-30

Adapté de la publication de Ginsberg.⁴⁴

*L'apoprotéine dominante de chaque lipoprotéine est signalée en gras.

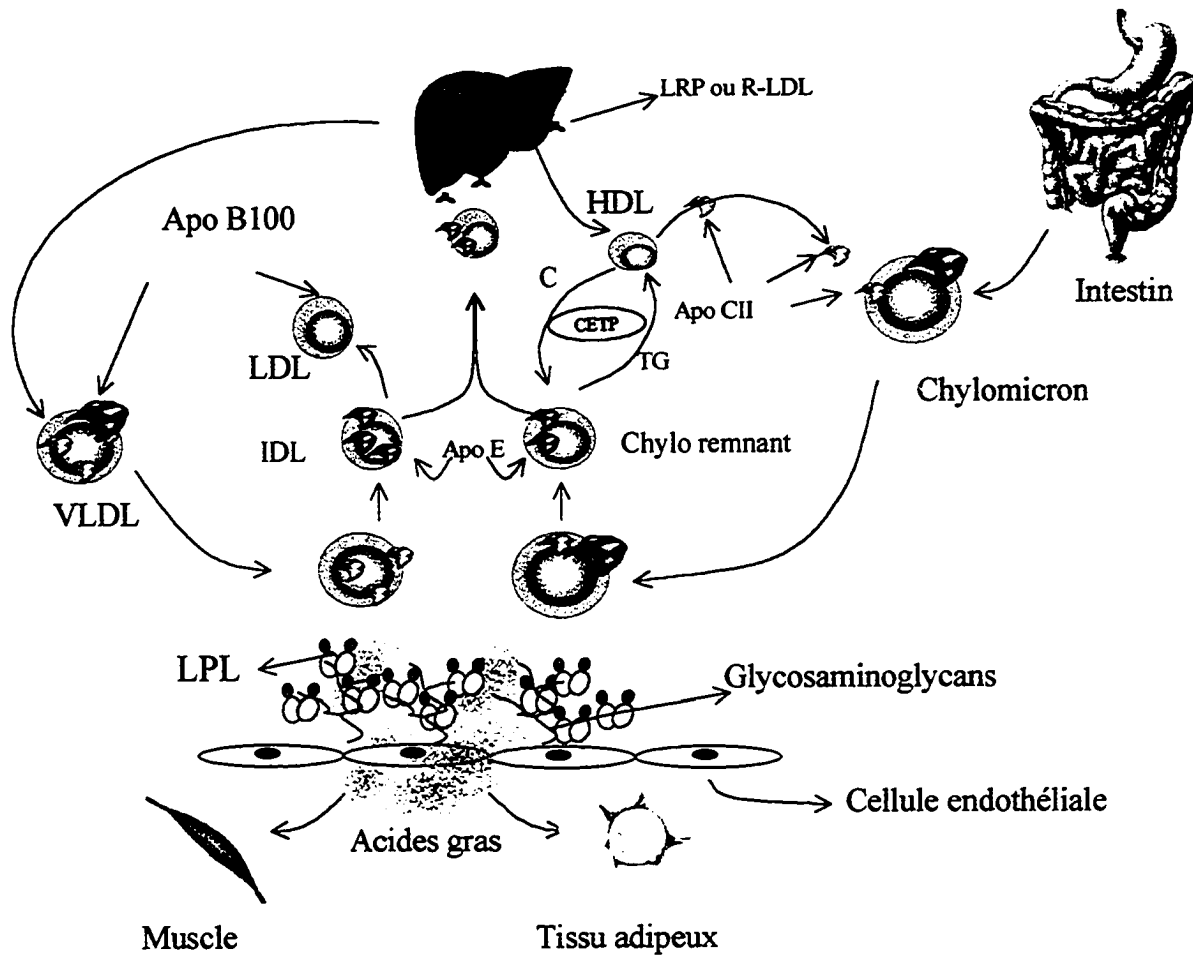
TG: triglycérides; PL: phospholipides.

Le métabolisme des lipoprotéines est résumé dans la Figure 2. Après une période de jeûne de 8 à 12 heures, la majorité des triglycérides circulant dans le plasma sont transportés par les particules VLDL. Ces particules sont formées dans le foie, à partir de l'assemblage de l'apoprotéine B100 avec des phospholipides, du cholestérol et des triglycérides. Une fois relâchées dans la circulation, les particules VLDL acquièrent des apoprotéines provenant des particules HDL.⁴⁴ L'acquisition de l'apo CII est particulièrement importante car cette apoprotéine est un cofacteur essentiel pour l'activité de la LPL,⁴⁵ l'enzyme responsable de la dégradation des particules VLDL. À mesure que les lipoprotéines avancent dans la circulation et atteignent les capillaires, elles peuvent se lier à la LPL qui se trouve accrochée aux cellules endothéliales par liaisons non covalentes avec des glycosaminoglycans.⁴⁶ En effet,

l'enzyme est produite par les cellules parenchymateuses de plusieurs organes dont les plus importants sont le cœur, le muscle strié et le tissu adipeux,^{47,48} mais migre vers la lumière capillaire où elle agit sur les triglycérides circulant avec les lipoprotéines plasmatiques. L'ingestion d'un repas, et surtout sa composition, déterminent la proportion de LPL active dans les lits capillaires de ces tissus et par le fait même, le destin des particules VLDL. Ainsi, à l'état de jeûne, l'activité de la LPL est forte dans les tissus cardiaque et musculaire et faible dans le tissu adipeux.⁴⁷ En revanche, après la prise d'un repas, spécialement s'il est riche en glucides, l'activité de la LPL dans le tissu adipeux augmente alors que dans le tissu musculaire elle atteint son nadir.⁴⁷ La modulation nutritionnelle de la LPL permet la distribution adéquate des ressources énergétiques aux différents tissus. Ainsi, à l'état de jeûne, l'action de la LPL envers les lipoprotéines plasmatiques approvisionne le tissu musculaire en acides gras qui sont utilisés comme principal substrat énergétique. En revanche, à l'état postprandial, le muscle utilise plutôt le glucose pour combler ses besoins. Les acides gras, toujours dérivés de la dégradation des lipoprotéines par la LPL, sont alors emmagasinés dans le tissu adipeux.

Quelque soit le site de la réaction enzymatique, les particules VLDL changent de conformation suite à la dégradation de leurs triglycérides, et échangent à nouveau des apoprotéines avec les particules HDL. Notamment, elles reçoivent de l'apo CIII et perdent de l'apo CII, changement qui provoque la diminution de l'affinité des ces particules pour la LPL, ralentissant ainsi la dégradation de leurs triglycérides.⁴⁴

Figure 2. Métabolisme des lipoprotéines.



La délipidation des particules VLDL par la LPL peut donner naissance à deux types de lipoprotéines: les particules VLDL résiduelles (ou IDL) et les particules LDL. À ce sujet, une hypothèse actuelle suggère que la quantité des triglycérides contenue dans les particules VLDL détermine leur sort: celles peu riches en triglycérides et donc plus petites, seraient transformées directement en particules LDL, alors que les particules VLDL enrichies en triglycérides seraient transformées en particules VLDL résiduelles.⁴⁹ Les particules résiduelles, à leur tour, peuvent être captées directement par le foie ou subir une autre séance de délipidation pour donner naissance aux particules LDL.⁴⁹ Les caractéristiques des particules LDL varient selon leur origine (particules VLDL ayant un contenu élevé ou faible en triglycérides), et ces différences ont des implications physiopathologiques capitales. Tout d'abord, les particules LDL issues de la délipidation des petites particules VLDL sont captées par leur récepteur et catabolisées de manière expéditive, disparaissant ainsi rapidement de la circulation.⁵⁰ En revanche, les particules LDL générées par la délipidation des particules VLDL enrichies en triglycérides subissent des modifications structurales qui nuisent à la liaison sur leur récepteur et à leur catabolisme.⁵¹ De plus, ces particules sont des meilleurs substrats pour l'enzyme lipase hépatique,⁴⁹ qui les départit de leurs triglycérides, les rendant ainsi plus petites et denses. Ces changements opérés sur les particules LDL les rendent ainsi plus sujettes à l'oxydation, une modification connue pour déclencher une pléiade d'événements menant à l'athérosclérose.⁵² Pour toutes ces raisons, les particules LDL petites et denses sont considérées comme un important facteur de risque cardio-vasculaire.

Dans les paragraphes précédents, nous avons expliqué que les particules VLDL ne sont pas homogènes pour leur taille et leur contenu en triglycérides. Comment alors le contenu des triglycérides des particules VLDL peut-il varier? De prime abord, le foie peut synthétiser des particules VLDL plus ou moins enrichies en triglycérides, dépendamment de la disponibilité des substrats. Deuxièmement, leur contenu en triglycérides est soumis à l'action de la LPL: une dégradation inefficace des triglycérides

par l'enzyme contraint la lipoprotéine à demeurer volumineuse et peu délipidée. Une déficience absolue ou relative en insuline conduit à un enrichissement en triglycérides des particules VLDL non seulement par une augmentation de leur production hépatique mais vraisemblablement aussi par une diminution de leur catabolisme périphérique par la LPL adipocytaire.

Bien que souvent mal considérées, les particules LDL ont l'important rôle physiologique de livrer le cholestérol aux tissus périphériques. Le cholestérol des cellules périphériques peut aussi être capté par des particules HDL, qui le ramènent au foie, un processus appelé «transport inverse» du cholestérol. Les particules HDL sont formées principalement dans le foie. Une petite partie peut également être produite dans l'intestin. Leur composition est également influencée par le réarrangement des phospholipides et des apoprotéines issus de la délipidation des particules riches en triglycérides. Dans leur forme native, les particules HDL ont une forme discoïde mais deviennent plus rondes à mesure qu'elles acquièrent du cholestérol. Au cours de leur périple dans le sang, ces lipoprotéines (appelées alors HDL₃) captent l'excès de cholestérol libre présent dans les cellules périphériques, comme la paroi artérielle. Ce processus est dépendant d'une protéine récemment découverte, la «*cholestérol efflux regulatory protein*» ou CERP.⁵³⁻⁵⁵ Une autre protéine, la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT) estérifie le cholestérol libre présent à la surface de la lipoprotéine induisant une relocalisation de ce dernier vers l'intérieur. Ce processus augmente la taille de ces particules, alors appelées HDL₂. Sous l'action combinée du récepteur SR-BI, qui ôte leur cholestérol,^{56,57} et de la lipase hépatique, qui en hydrolyse les triglycérides, les particules HDL₂ délivrent leur contenu au foie et deviennent des particules HDL₃. Une fois vidées de leur contenu, les particules HDL₃ sont prêtes à retourner chercher du cholestérol dans les tissus périphériques.

La composition des particules HDL est également influencée par celle des particules riches en triglycérides. En effet, le cholestérol estérifié des particules HDL peut être transféré aux particules riches en triglycérides via l'action de la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP).⁵⁸ Ce transfert est proportionnel au contenu en triglycérides des particules résiduelles. Autrement dit, plus les particules résiduelles sont riches en triglycérides, plus le transfert des triglycérides aux particules HDL par la CETP est efficace. Les HDL enrichies en triglycérides deviennent de meilleurs substrats pour la lipase hépatique et, par un mécanisme encore mal connu, sont catabolisées plus rapidement.⁵⁹ Ce phénomène explique la diminution du taux plasmatique du cholestérol HDL retrouvé dans les conditions associées à l'hypertriglycéridémie, comme la résistance à l'insuline.

L'autre conséquence du transfert exagéré des triglycérides vers les particules HDL est l'enrichissement des particules VLDL résiduelles en cholestérol estérifié. En effet, sous l'action de la CETP, chaque molécule de triglycéride passant des particules VLDL résiduelles vers les particules HDL est accompagnée du transfert d'une molécule de cholestérol estérifié dans le sens inverse. Une hypothèse attirante soulevée par Zilversmit suggère que les lipoprotéines résiduelles peuvent déposer leur cholestérol dans la plaque d'athérosclérose.^{60,61} Néanmoins, cette idée n'est pas acceptée universellement.

En résumé, l'enrichissement des particules VLDL en triglycérides mène à la formation d'une sorte de particules LDL petites et denses, à la diminution du cholestérol HDL et à l'enrichissement des particules résiduelles en cholestérol, des anomalies potentiellement athérogéniques. Dans les prochains paragraphes, nous expliquerons comment la résistance à l'insuline peut donner naissance à des particules VLDL riches en triglycérides ainsi qu'à d'autres anomalies du métabolisme des lipoprotéines.

IMPORTANCE DE LA PERIODE POSTPRANDIAL

L'ingestion d'un repas bouleverse le métabolisme des lipoprotéines. Les triglycérides alimentaires sont assemblés à l'apo B48, au cholestérol et aux phospholipides dans la paroi intestinale pour former des chylomicrons, des lipoprotéines les plus volumineuses. Les chylomicrons pénètrent dans le sang via les canaux lymphatiques et, après captation de l'apo CII provenant des HDL, sont dégradés par la LPL. La taille des chylomicrons, très importante comparée à celle des VLDL, leur confère une plus grande affinité de liaison à la LPL.⁶² Les particules VLDL doivent alors partager avec les chylomicrons la même voie catabolique, tout en ayant une moins bonne capacité de liaison à la LPL. Elles se trouvent donc enrichies en triglycérides, ce qui a pour conséquence une augmentation de leur taille et de leur demi-vie. En effet, la demi-vie des particules VLDL est de 264 minutes, alors qu'elle n'est que de 4-5 minutes pour les chylomicrons (une différence de presque 60 fois).⁶³ Comme expliqué au paragraphe précédent, ces changements provoquent un enrichissement en cholestérol estérifié des particules VLDL et de particules chylomicrons résiduelles, ainsi que l'enrichissement en triglycérides des particules HDL et LDL. Si l'on tient compte de l'effet délétère de ces modifications, on peut considérer la période postprandiale comme potentiellement propice au développement de l'athérosclérose. Cependant, chez une personne normale, la prise d'un repas ne constitue pas un problème car: 1) la production des VLDL est diminuée dans l'état postprandial et, 2) le catabolisme des triglycérides est adéquat, puisque la LPL adipocytaire augmente sous influence de l'insuline pour combler l'arrivée accrue de triglycérides en circulation.

Par contre, un problème se pose lorsque l'un des ces deux phénomènes ne fonctionne pas adéquatement. Ceci est le cas chez les personnes résistantes à l'insuline. Bien que quelques études suggèrent que l'hyperinsulinémie chronique stimule la production de particules VLDL par le foie (révisé par Lewis et Steiner⁶⁴), des données plus récentes montrent que la synthèse et la sécrétion

hépatique des particules VLDL sont diminuées par l'insuline, et augmentées dans les cas de résistance à l'insuline.⁶⁵⁻⁶⁹ Cet effet est la conséquence d'une inhibition imparfaite de la lipolyse par l'insuline, ce qui provoque une augmentation de la disponibilité des acides gras pour la formation de ces lipoprotéines.^{65,70} De plus, des études récentes menées sur un modèle animal de résistance à l'insuline, le hamster nourri au fructose,⁶⁹ ont permis de montrer que l'insuline inhibe directement la sécrétion des particules VLDL.^{65,66} En effet, ces animaux démontraient une production accrue d'apo B100 *in vivo* ainsi qu'une sécrétion augmentée des particules VLDL *in vitro*. Cette dernière est due à une augmentation de la disponibilité de triglycérides, de la production d'apo B100 et de la quantité de protéine microsomale de transfert des triglycérides, une enzyme importante pour l'assemblage des particules VLDL.⁶⁹ Les études chez l'homme corroborent ces résultats. Malmstrom *et al.*⁶⁷ ont montré que l'hyperinsulinémie inhibe sélectivement la sécrétion de la fraction VLDL₁, les particules les plus volumineuses et les plus riches en triglycérides, et que cet effet est absent dans la résistance à l'insuline.⁶⁸ Lewis et Steiner⁶⁴ ont démontré que l'hyperinsulinémie aiguë inhibe la production de VLDL apo B chez des sujets normaux mais pas chez les obèses, un groupe d'individus connus pour présenter une résistance à l'insuline.

Considérant toutes ces données, la résistance à l'insuline est associée à une augmentation de la production hépatique des grosses particules VLDL enrichies en triglycérides, résultant en un taux élevé de ces lipides dans le plasma. Cependant, en plus d'une anomalie de production, l'hypertryglicéridémie pourrait également être la conséquence d'une diminution du catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides, en raison d'un défaut de l'action de l'insuline sur la LPL adipo-cytaire. Pour les raisons expliquées plus haut, une éventuelle diminution de la LPL serait encore plus nocive après un repas, période au cours de laquelle l'activité de l'enzyme devrait augmenter pour hydrolyser l'excès de lipides originaires de l'alimentation.

En ce qui concerne le risque de maladies cardio-vasculaires, le caractère athérogène des lipoprotéines riches en triglycérides a longtemps suscité la controverse. Les taux élevés de triglycérides étaient associés avec les maladies coronariennes lors des analyses univariées mais lorsque ajustées pour d'autres variables comme la concentration de cholestérol HDL et de cholestérol LDL, cette association disparaissait. Ce manque d'association est partiellement expliqué par une plus grande variabilité dans la mesure des triglycérides comparativement au cholestérol HDL.⁷¹ Une méta-analyse récente a mis fin à cette controverse en montrant qu'une concentration élevée de triglycérides plasmatiques est un facteur de risque cardio-vasculaire indépendant.⁷²

L'hypothèse selon laquelle la dyslipidémie postprandiale pourrait être plus néfaste que celle à jeun n'est pas nouvelle. Zilversmit a proposé en 1979 que la dyslipidémie postprandiale avait un rôle causal dans l'athérosclérose.⁶⁰ Cette hypothèse gagne de plus en plus de force considérant les résultats d'études épidémiologiques récentes qui montrent une association entre les triglycérides postprandiaux et les maladies cardio-vasculaires.⁷³⁻⁷⁶ Cependant, aucune étude prospective n'est disponible jusqu'à maintenant et la preuve définitive de cette relation n'a pas encore été faite. Une excellente revue de ces études a été publiée récemment,⁷⁷ et nous y référons le lecteur pour révision détaillée du sujet.

Pour résumer la situation, la résistance à l'insuline est associée avec une augmentation des triglycérides plasmatiques, qui provoque une diminution du cholestérol HDL et une hausse des particules LDL petites et denses. L'hypertriglycéridémie est causée par une augmentation hépatique des VLDL mais il n'est pas exclu qu'une diminution de la LPL puisse également jouer un rôle. Dans la section suivante, nous aborderons quelques concepts ayant trait à la biologie et à la physiologie de la LPL. Ces

informations nous permettront de comprendre les mécanismes affectés lors d'un éventuel défaut de l'enzyme dans le syndrome de résistance à l'insuline.

LIPOPROTEINE LIPASE

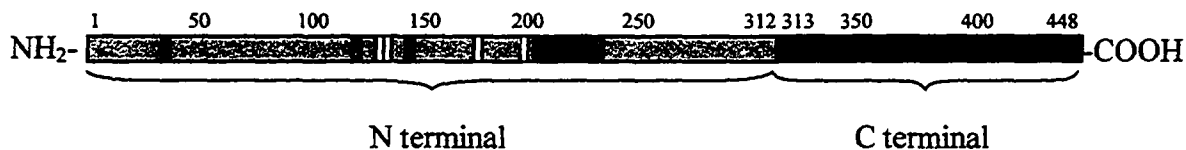
En 1943, Hahn⁷⁸ décrivait que le plasma des animaux recevant une diète riche en gras devenait clair lorsqu'on leur administrait de l'héparine par voie intraveineuse. Quelques années plus tard, Anderson et Fawcett⁷⁹ démontrèrent que la turbidité du plasma hyperlipidémique ne diminuait pas lors de l'addition d'héparine *in vitro*. Toutefois, il devenait clair si l'on y ajoutait du plasma provenant d'un animal à qui on avait injecté l'héparine préalablement. Ces études suggéraient que l'héparine provoquait la relâche d'un facteur *in vivo* responsable de la solubilisation des chylomicrons alimentaires dans le plasma. Ce «*clearing factor*» ou facteur clarifiant, s'est avéré être une enzyme que l'on a appelée lipoprotéine lipase,⁸⁰ puisque son action sur les chylomicrons dépendait de la présence de lipoprotéines de haute densité.⁸¹ L'explication du phénomène d'éclaircissement du plasma, aujourd'hui bien connue, repose sur la relâche, dans la circulation, de la LPL attachée aux glycosaminoglycans de la cellule endothéliale par l'héparine. Ainsi relâchée dans le plasma, la LPL hydrolyse les triglycérides des chylomicrons; les acides gras générés par la réaction forment un complexe soluble avec l'albumine et le plasma prend alors un aspect limpide. Les progrès dans le domaine de la biologie moléculaire nous ont permis de connaître les détails sur la biologie et la physiologie de l'enzyme LPL, son mécanisme d'action, son processus de production et ses modulateurs physiologiques. Cette section est destinée à réviser brièvement ces concepts.

BIOLOGIE

Le gène de la LPL est localisé dans le chromosome 8 (8p22), comprend 10 exons et 9 introns et s'étend sur une longueur de 30 kilobases (kb).⁴⁸ La transcription du gène donne naissance, chez l'humain, à deux ARNm de 3,2 et 3,6 kb respectivement, chacun étant le résultat d'un choix entre deux signaux de polyadénylation de la région 3' non traduite du gène de la LPL. Une étude a montré que la forme prédominante est l'ARNm de 3.6 kb, qui serait par ailleurs traduite avec plus d'efficacité.⁸² La traduction de l'ARNm de la LPL génère une protéine mature de 448 acides aminés et de poids moléculaire de 50 kDa. L'activité enzymatique de la LPL est dépendante de sa glycosylation.⁸³⁻⁸⁵ Comme la portion glycosylée correspond à 8 à 12% du poids de la protéine, son poids moléculaire final est de 55 kDa.

La structure primaire de la LPL humaine est représentée à la Figure 3. Le domaine N terminal s'étend des acides aminés 1 à 312 et possède plusieurs sites importants pour la fonction de l'enzyme. Parmi eux se trouve la triade catalytique composée des acides aminés Ser 132, Asp 156 et His 241. Le clapet, une structure en forme de boucle, couvre le site catalytique de l'enzyme et s'étend des acides aminés Cys 216 à Cys 239. Dans la région N-terminale se trouvent aussi les acides aminés Lys 147 et Lys 148 qui constituent le site de liaison de l'apo CII,⁸⁶ le cofacteur essentiel à l'activité enzymatique. Les deux sites de glycosylation de la LPL sont situés au niveau des acides aminés Asp 43 et Asp 359. Cependant, il semble que seul le site du domaine N-terminal (Asp 43) soit essentiel à l'activité catalytique.⁸⁵ Sont également indiqués dans la figure les deux acides aminés les plus fréquemment touchés par des mutations dans la population québécoise.⁸⁷ Le domaine C-terminal est composé des acides aminés 313 à 448. Dans cette région se trouve le site de liaison de l'enzyme aux lipoprotéines, qui est situé entre les acides aminés 392 et 448. Le domaine C-terminal de l'enzyme est important aussi pour l'interaction des lipoprotéines résiduelles avec les récepteurs des particules LDL⁸⁸ et le récepteur α_2 M/LRP.⁸⁹

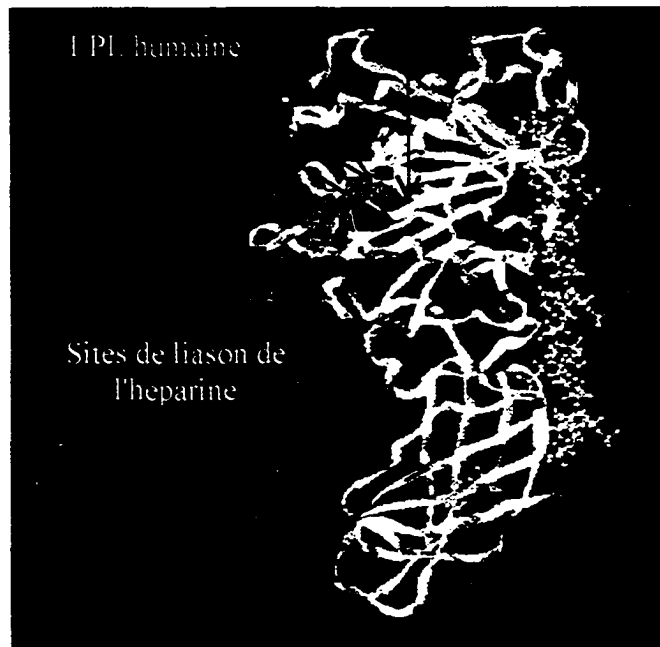
Figure 3. Structure primaire de la lipoprotéine lipase humaine.



■ Asp 43 principal site de glycosylation; ■ Ser 132, Asp 156, His 241. Triade catalytique; □ Lys 147, Lys 148. Site de liaison de l'apo CII; ■ Cys 216 à Cys 239. Clapet; ■ Gly 188 et Pro 207. Sites les plus fréquents de mutations au Québec; □□□ Derniers 56 acides aminés. Site de liaison des lipoprotéines.

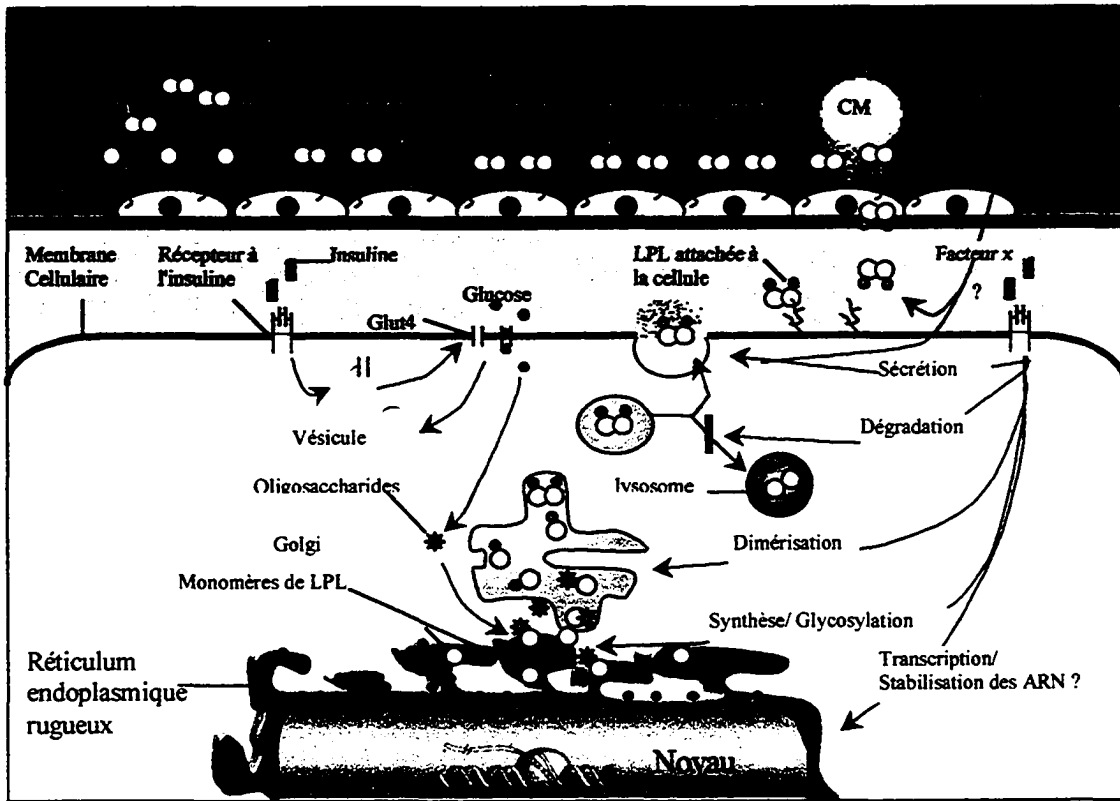
Les acides aminés impliqués dans la liaison de l'héparine sont éparpillés sur la molécule de LPL⁸⁶ et sont mieux visualisés sur la structure tertiaire de la LPL (Erreur! Source du renvoi introuvable.). Cette figure illustre également les interactions entre les différentes unités fonctionnelles de l'enzyme. Le site catalytique est caché par le clapet. Cette structure est essentielle pour l'interaction de l'enzyme avec les lipoprotéines⁹⁰ et détermine la spécificité de la LPL envers ses substrats.⁹¹ Le clapet est une structure formée d'hélices amphiphiliques. Cette caractéristique lui permet d'avoir une face hydrophobe en contact avec la «poche catalytique» de l'enzyme, et une face hydrophile plus externe.⁹⁰ Lors de la liaison du domaine C-terminal de l'enzyme aux lipoprotéines, le clapet subit un changement de conformation et expose sa face hydrophobe, mettant en contact les acides aminés de la triade catalytique avec les triglycérides de la lipoprotéine. Il est possible que l'apo CII, dont le site de liaison se trouve proche du clapet, stabilise cette interaction.⁹⁰

Figure 4. Structure tertiaire de la lipoprotéine lipase



Les structures montrées sont déduites par analogie à la structure de la lipase pancréatique humaine. La localisation approximative de quelques acides aminés est montrée en rouge. Adaptée de la publication de Chang *et al.*⁹²

Figure 5. Le rôle de l'insuline dans la production, sécrétion et migration de la lipoprotéine lipase vers le compartiment endothélial.



- Capillaire
- Espace interstitiel
- Cellule

Les étapes menant à la production de la LPL sont de plus en plus connues. La glycosylation de la protéine est une étape essentielle pour l'activité de l'enzyme vraisemblablement parce que ce processus permet le repliement et la dimérisation.⁹³ La glycosylation est initiée pendant la traduction de l'ARNm, la protéine recevant initialement un block d'oligosaccharides, constitués de Glc₃-Man₉(GlcNAc)₂. Par la suite, des enzymes spécifiques ôtent successivement des résidus de glucose et de mannose à mesure que la protéine circule à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.⁹³ L'étape particulièrement critique pour l'activité de la LPL est la suppression des résidus de glucose de la molécule vierge, accomplie par les glucosidases I et II.⁸³ Une fois sortie de l'appareil de Golgi, la LPL peut être empaquetée dans des vésicules de sécrétion ou acheminée vers la dégradation par des lysosomes. La dégradation est, d'ailleurs, le principal destin de la LPL intracellulaire: sous des conditions basales, 80% de l'enzyme est dégradée par le lysosome. Ce très haut taux de dégradation peut être réduit sous l'action de l'héparine.⁹⁴ Cependant, cette stimulation pharmacologique n'explique pas comment la LPL est sécrétée *in vivo*. Un rôle de l'insuline comme sécrétagogue de la LPL a été suggéré par une étude récente, dans laquelle il est démontré que l'hormone est responsable de la sécrétion d'une substance par la cellule endothéliale qui stimulerait la relâche de l'enzyme dans le milieu de culture.⁹⁵

Une fois sécrétée, la LPL reste accrochée à la face extérieure de la membrane de la cellule productrice par des glycosaminoglycans de type sulfates d'héparan. En fait, la LPL peut être co-synthétisée et co-sécrétée avec les sulfates d'héparan.⁹⁶ Des évidences supportant cette hypothèse découlent du fait que le traitement avec le chlorate (une substance qui inhibe la sulfation des sulfates d'héparan et donc leur liaison avec la LPL) inhibe le transport intracellulaire, la sécrétion et l'activation de la LPL dans les cellules 3T3-L1.⁹⁶ Les sulfates d'héparan peuvent être attachés à la cellule soit directement, soit *via* des molécules de glycosyl phosphatidylinositol.⁹⁷ La phospholipase C spécifique du

phosphatidylinositol relâche des complexes glycosyl phosphatidylinositol-sulfate d'héparan-LPL de la cellule, qui peuvent se déplacer vers le site fonctionnel de l'enzyme dans l'endothélium et ce processus peut être contrôlé par l'insuline.^{98,99} Alternativement, environ 25% de la LPL accrochée à la membrane plasmique est internalisée et dégradée. Le LRP est vraisemblablement impliqué dans ce processus puisque la dégradation de la LPL est inhibée par la protéine RAP (*receptor associated protein*), un ligand connu du récepteur en question.¹⁰⁰ La translocation de la LPL à travers l'interstitium vers l'endothélium est très peu connue mais la LPL pourrait migrer de la cellule productrice vers la cellule endothéliale par un pont formé de sulfates d'héparan.⁹³

Rendue à la surface endothéliale, la LPL peut exercer son action sur les particules VLDL et les chylomicrons, laquelle consiste principalement en l'hydrolyse de leurs triglycérides, bien que l'enzyme ait aussi une faible action sur les phospholipides. Ces deux lipoprotéines riches en triglycérides possèdent à leur surface l'apo CII, cofacteur essentiel à la fonction de la LPL. L'enzyme hydrolyse les acides gras aux positions 1 et 3 de la molécule de triglycéride, produisant ainsi des acides gras libres et du 2' monoacylglycérol. Ce dernier sera transformé subséquemment en glycérol et relâché dans la circulation alors que les acides gras seront absorbés par les tissus sous-jacents. Dans le cas du tissu adipeux, les acides gras pénètrent dans l'adipocyte et sont estérifiés au glycérol provenant de la glycolyse. Les acides gras non absorbés par la cellule sont liés à l'albumine mais leur excès déplace la LPL de son site fonctionnel à la surface endothéliale et arrête la réaction enzymatique.¹⁰¹ De plus, l'excès d'acides gras inhibe complètement la sécrétion des molécules LPL actives par l'adipocyte.¹⁰² Ce mécanisme fonctionne comme un rétro-contrôle puisqu'il empêche une hydrolyse des triglycérides au-delà des besoins physiologiques.

Une fois déplacée de son site fonctionnel, la LPL circule dans le plasma, accrochée à des lipoprotéines partiellement hydrolysées et sera finalement captée et dégradée par le foie. Alternativement, la LPL accrochée aux capillaires peut être dégradée par la cellule endothéliale.¹⁰³ Cependant, ce processus n'est pas aussi efficace que la dégradation par l'adipocyte puisqu'une grande partie de la LPL est recyclée et retourne à la surface de la cellule endothéliale.¹⁰³

Dans des conditions normales, l'entrée d'acides gras dans le tissu adipeux et l'accumulation de triglycérides qui s'ensuit est dépendante de l'action de la LPL, la synthèse *de novo* des triglycérides à partir du glucose étant très minime. Cependant, les sujets avec hypertriglycéridémie primaire, dont l'activité de la LPL est absente, ne sont pas nécessairement maigres. Ceci indique qu'il existe des mécanismes physiologiques compensatoires qui maintiennent l'accumulation des triglycérides dans les adipocytes.

La délipidation des lipoprotéines riches en triglycérides se fait vraisemblablement d'une façon progressive. On pourrait imaginer un scénario dans lequel un chylomicron s'accroche à un complexe sulfate d'héparan-LPL à la surface endothéliale et subit une séance de délipidation. Ensuite, il se détacherait et rencontrerait d'autres molécules de LPL pendant son parcours dans le capillaire et subirait une autre séance de délipidation jusqu'au point où les changements de conformation de la lipoprotéine, incluant l'enrichissement en apo CIII, défendrait à la LPL l'accès à ses triglycérides. La molécule modifiée, par définition une particule résiduelle, serait captée par le récepteur aux particules LDL ou par le α 2M/LRP du foie. En plus d'inhiber l'action de la LPL, l'apo CIII nuit à la captation des particules résiduelles dépendantes de l'apo E par le foie.¹⁰⁴

L'effet de l'hydrolyse des triglycérides des particules VLDL et chylomicrons est donc double: D'une part, les acides gras produits peuvent être captés par le tissu sous-jacent, soit pour l'entreposage comme dans le cas du tissu adipeux, soit pour l'oxydation comme dans le muscle strié et cardiaque. D'autre part, il y a une modification des lipoprotéines riches en triglycérides. L'efficacité de cette réaction et la quantité des triglycérides restant dans la lipoprotéine après l'action de la LPL détermineront les changements subséquents que subiront les lipoprotéines riches en triglycérides.

MODULATION

Parmi les modulateurs physiologiques de la LPL adipocytaire, on trouve des hormones et des cytokines. Ces facteurs agissent par des mécanismes autant transcriptionnels que post-transcriptionnels. Une liste de ces agents et leurs mécanismes de modulation sont montrés dans le Tableau 2. La plupart d'entre eux ont été étudiés chez le rongeur ou *in vitro* mais peu d'études ont malheureusement été menées chez l'humain. Le rôle spécifique du repas et de l'insuline sera discuté dans une autre section. Pour une révision plus approfondie du sujet voir la publication de Enerbäck et Gimble.⁴⁸

Tableau 2. Modulateurs physiologiques de la lipoprotéine lipase.

Agent	Chez l'humain		Chez le rongeur	
	Effet	Mécanisme	Effet	Mécanisme
Modulation nutritionnelle				
Jeûne	↓	PT	↓	T, PT
Repas	↑	PT	↑	PT
Riche en glucides	↑↑	PT	↑↑	PT
Riche en gras	↑	PT	↑	PT
Hormones				
Cortisol	-	-	↑/↓	T/?
Insuline	↑	PT	↑	PT
Hormone de croissance	-	-	↑	T, PT
Prolactine	-	-	↓	?
T ₄	-	-	↓	PT
Agonistes β-adrénergiques	-	-	↓	PT
Œstrogène	-	-	↓	?
Progesterone	-	-	↑	T
Cytokines				
TNF	↑/↓	?	↓	T, PT
IL-1	-	-	↓	PT
IL-6	-	-	↓	?
IL-11	-	-	↓	?
IFN-γ	-	-	↓	?
LIF	-	-	↓	?
TGF-β	-	-	↓	?
PGF _{2α}	-	-	↓	?
Autres				
Acide rétinoïque	-	-	↓	PT

Adapté de Enerbäck et Gimble.⁴⁸ PT = Post-transcriptionnel; T = Transcriptionnel; ↑ = Augmenté; ↓ = diminué; - N'a pas été évalué ; ? mécanisme inconnu.

AUTRES ROLES PHYSIOLOGIQUES ET PATHOPHYSIOLOGIQUES

Rôle dans la captation des lipoprotéines

L'hydrolyse des triglycérides des particules VLDL et chylomicrons par la LPL facilite leur dégradation subséquente par le foie. La LPL accrochée aux particules résiduelles peut aussi agir directement comme intermédiaire entre le complexe lipoprotéine-sulfate d'héparan et le récepteur α₂MR/LRP, contribuant ainsi à leur captation et dégradation.^{105,106} La captation de ce complexe favorise également la dégradation de l'enzyme. Le site de liaison de la LPL à la sous-unité α du récepteur α₂MR/LRP est

localisé dans son domaine C-terminal.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Cette liaison est indépendante de l'activité catalytique de l'enzyme puisqu'elle est de magnitude semblable à la LPL sous sa forme monomérique ou dimérique,¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ alors qu'il est bien connu que la dimérisation est essentielle pour l'hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycérides par la LPL.¹¹⁰ En plus, des formes chimériques de la LPL dépourvues de leur portion N-terminale, et donc du domaine catalytique, sont capables de se lier au récepteur α_2 MR/LRP aussi bien que l'enzyme intacte.¹⁰⁷ Le site exact de liaison de la LPL au récepteur α_2 MR/LRP n'est pas connu mais la mutation échangeant une lysine dans la position 407 contre une alanine cause un affaiblissement de la liaison de dix fois, démontrant que cet acide aminé est particulièrement important pour l'interaction adéquate entre l'enzyme et le récepteur.¹⁰⁷ Chaque monomère de LPL est capable de se lier séparément aux lipoprotéines ou au récepteur α_2 MR/LRP. Cependant, seule la forme dimérique est capable de lier concomitamment le récepteur α_2 MR/LRP et la lipoprotéine.^{108,109} Ce fait s'expliquerait par la superposition des sites de liaison de la lipoprotéine et du récepteur α_2 MR/LRP dans le domaine C-terminal de la LPL.¹⁰⁹

Athérosclérose

La LPL pourrait également avoir un rôle dans l'athérosclérose en remodelant localement les lipoprotéines, en augmentant leur affinité pour certaines composantes de la paroi vasculaire^{61,111} ou même en augmentant la perméabilité de l'endothélium à certaines macromolécules.¹¹² Ce rôle est aussi renforcé par des données épidémiologiques récentes qui montrent que l'activité de la LPL dans le plasma post-héparine est diminuée chez des patients atteints de coronaropathie.¹¹³

REVUE DE LITTÉRATURE

Après cette révision sur la résistance à l'insuline, le métabolisme des lipoprotéines et la physiologie de la LPL, nous sommes prêts à aborder les travaux qui portent spécifiquement sur la modulation de la lipoprotéine lipase adipocytaire par l'insuline et l'effet de la résistance à l'insuline. Pour ce faire nous aborderons cinq situations différentes pouvant modifier la LPL: 1) la prise d'un repas; 2) le diabète; 3) l'effet de l'insuline; 4) l'obésité 5) la résistance à l'insuline. La sixième section abordera les études portant sur les caractéristiques distinctes des divers dépôts de tissu adipeux. L'objectif de cette révision est de forger les bases qui soutiendront nos hypothèses de travail.

MODULATION NUTRITIONNELLE

Les premières données suggérant un rôle important de l'insuline dans la modulation de la LPL adipocytaire découlent des études qui ont mesuré l'activité enzymatique après différentes interventions nutritionnelles. Des études chez le rat¹¹⁴ et chez l'humain¹¹⁵⁻¹¹⁷ ont révélé que l'enzyme était stimulée après un repas riche en glucides, alors que l'ingestion de matières grasses avait un effet moins important, allant même jusqu'à inhiber la réponse de la LPL adipocytaire à l'insuline.¹¹⁸ Par ailleurs, l'inhibition de la LPL par les lipides alimentaires est proportionnelle aux niveaux d'acides gras saturés contenus dans le repas.^{119,120}

La prise d'aliments stimule la LPL par augmentation de ses taux d'ARNm,¹²¹ mais surtout de la quantité de protéine et de l'activité enzymatique de la LPL.^{47,121-124} De fait, chez le cochon d'Inde, la mise à jeun cause une diminution marquée de l'activité et du taux de synthèse de la LPL tandis que les niveaux d'ARNm déclinent plus discrètement.¹²¹ Les données obtenus par Doolittle *et al.*¹²²

corroborent l'hypothèse selon laquelle le repas provoque des modifications post-traductionnelles influençant la production de LPL adipocytaire. Ces auteurs ont démontré que, chez le rat, l'état de jeûne est associé à une plus haute proportion de LPL riche en résidus mannose (*high-mannose LPL*), alors qu'à l'état postprandial des formes intermédiaires et complexes prédominent. Il est connu que des formes de LPL riches en mannose ne subissent pas l'action des protéines chaperonnes intracellulaires et ne peuvent pas être pliées adéquatement. Les molécules de LPL ainsi glycosylées restent inactives, retenues dans le réticulum endoplasmique et seront finalement acheminées vers la dégradation.⁸³ Il est donc proposé que, chez des animaux à jeun, l'adipocyte augmente le taux de synthèse de LPL pour former un réservoir de LPL constitué des formes riches en mannose. Si l'animal reste à jeun, la LPL produite est dirigée préférentiellement vers la dégradation lysosomale. Par contre, si l'animal mange, des changements neuro-hormonaux empêcheraient cette dégradation intracellulaire et favoriseraient la transformation des formes riches en mannose en formes intermédiaires et complexes, qui pourraient être sécrétées. Les résultats de Bergö *et al.*⁴⁷ vont dans le même sens: les auteurs ont démontré qu'il y avait une grande proportion de LPL sous sa forme inactive chez le rat à jeun. Lorsque les animaux mangent, la proportion d'enzyme active augmente sans changement important dans la quantité de protéines. Ces auteurs proposent donc que la LPL est synthétisée, activée et sécrétée par défaut dans la plupart des tissus, dont le tissu adipeux à l'état postprandial. Lorsque l'état de jeûne survient, un mécanisme inconnu est mis en marche pour inactiver la LPL. Il a été décrit que la monomérisation entraînait un changement conformationnel avec inactivation irréversible de l'enzyme.¹¹⁰ Ce phénomène pourrait être mis en œuvre lors du jeûne.

Plusieurs études chez l'humain ont démontré que l'activité de la LPL adipocytaire augmente après un repas riche en glucides¹¹⁵⁻¹¹⁷ mais rares sont celles qui ont évalué le mécanisme impliqué. Toutefois, au moins une étude menée chez l'homme confirme le mécanisme de modulation de la LPL par

l'alimentation: autant la LPL relâchée par l'héparine que celle extraite après cette relâche étaient augmentées après un repas riche en glucides, alors que les niveaux d'ARNm restaient constants.¹²⁴ Ainsi, les auteurs ont conclu que le repas riche en glucides modifiait l'activité de la LPL par des mécanismes post-traductionnels.

Ces travaux indiquent premièrement que la composition du repas influence la réponse du tissu adipeux en ce que concerne l'activation de la LPL. Autrement dit, un repas riche en glucides stimule de façon plus importante l'activité lipasique adipocytaire qu'un repas riche en lipides. Deuxièmement, les travaux précédents nous enseignent que le repas est associé avec une activation de la LPL adipocytaire par une augmentation des niveaux d'ARNm, mais surtout par des modifications dites traductionnelles et post-traductionnelles, dont l'augmentation de la synthèse de la protéine, l'activation des formes inactives de l'enzyme et l'inhibition de sa dégradation. Il est à noter cependant que si, chez l'animal, l'augmentation du taux d'ARNm de la LPL après un repas riche en glucides est présente, bien que peu importante,¹²¹ chez l'humain elle n'a pas pu être démontrée.¹²⁴ Évidemment, le repas entraîne des modifications hormonales importantes et plusieurs facteurs peuvent être responsables de l'activation de la LPL adipocytaire. Nonobstant les faits mentionnés ci-dessus, l'augmentation du taux d'insuline semble être responsable des modifications de la LPL survenant dans la période postprandiale.¹²⁵

DIABETE

Des études réalisées chez des animaux ou chez des humains diabétiques suggèrent fortement un rôle de l'insuline dans la modulation de LPL adipocytaire, corroborant ainsi les études d'intervention nutritionnelle. Plus spécifiquement, ces études montrent une diminution de l'enzyme autant chez les diabétiques de type 1^{126,127} que de type 2¹²⁸⁻¹³¹ et sa normalisation après un traitement à l'insuline.^{116,129,132-135} Terrettaz *et al.*¹³³ ont étudié l'effet de l'insuline sur la LPL adipocytaire *in vivo*

dans un modèle animal hyperinsulinémique, le rat *Zucker*, et chez le rat normal lors de périodes d'hyperinsulinémie de durée variable. Les résultats de cette étude montrent que l'hyperinsulinémie chronique (chez le rat *Zucker*) cause une augmentation des niveaux d'ARNm ainsi que de la quantité et de l'activité de l'enzyme. Par contre, l'hyperinsulinémie de durée moyenne (4 jours) provoque une augmentation des niveaux protéiques et de l'activité sans altérer les niveaux d'ARNm. Finalement, une hyperinsulinémie aiguë (5 heures) cause seulement une augmentation de l'activité sans effet sur les niveaux protéiques et d'ARNm de l'enzyme. La conclusion de cette étude est que l'insuline n'augmente pas les niveaux d'ARNm de la LPL à court ou à moyen terme, mais agit sur les niveaux protéiques et l'activité enzymatique. Les résultats de cette étude ont été confirmés par un travail mené chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine : au bout de 10 jours, les niveaux d'ARNm, de protéines et l'activité de la LPL diminuent chez les rats diabétiques.¹³⁴ Un traitement unique à l'insuline ramène le taux de protéine et l'activité enzymatique à la normale mais seul un traitement prolongé a un effet sur les niveaux d'ARNm.

Chez l'homme, la diminution de la LPL est corrélée avec le degré du contrôle métabolique.¹²⁸ De plus, le traitement des individus diabétiques avec de l'insuline améliore l'activité de la LPL dans le plasma post-héparine¹²⁹ et dans le tissu adipeux.^{116,132} Finalement, l'amélioration du contrôle glycémique par l'insuline ou les hypoglycémiantes oraux n'implique pas les niveaux d'ARNm de la LPL dans le tissu adipeux mais augmente la quantité et l'activité de l'enzyme.¹³⁵

L'hyperglycémie *per se* pourrait être responsable de la diminution de la LPL puisque qu'elle est commune aux deux types de diabète. Cependant, l'absence d'insuline (dans le diabète de type 1) ou un défaut de l'action de l'insuline (dans le diabète de type 2) est probablement plus impliqué, comme montré par les études évaluant directement le rôle de l'hormone sur la LPL (voir prochaine section).

Tous ces travaux montrent une augmentation de l'activité et de la quantité de la LPL suite au traitement insulinique aigü. L'augmentation des niveaux d'ARNm survient après un traitement chronique chez le rat mais pas chez l'humain. Donc, pareillement aux études d'intervention nutritionnelle, les études chez des animaux et humains diabétiques indiquent que la modulation traductionnelle et post-traductionnelle de la LPL adipocytaire par l'insuline prévalent sur sa modulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle.

INSULINE

Des études évaluant le rôle direct de l'insuline sur la LPL adipocytaire *in vitro* et *in vivo* montrent clairement que cette hormone est un puissant stimulant de la LPL. Il est certain que l'action de l'insuline sur l'enzyme se fait à plusieurs niveaux dans la cellule, mais le mécanisme exact par lequel elle exerce ses effets reste un sujet de débat. Les divergences observées entre les différentes études sont vraisemblablement dues aux différences méthodologiques. Quelques facteurs particulièrement critiques sont le système de culture (précurseurs des adipocytes, adipocytes isolés ou tissu adipeux intact), la stimulation insulinique (dose et temps) et l'espèce étudiée. Par exemple, il est bien démontré que les adipocytes isolés réagissent différemment des morceaux de tissu adipeux entiers en culture. De plus, l'extrapolation des données obtenues *in vitro* chez les animaux comme le rat ne s'avère pas toujours juste. Par ailleurs, des données obtenues chez le rat sont fréquemment différentes de celles obtenues chez l'humain.

La plupart des études pointent tout de même vers une prédominance du mécanisme post-transcriptionnel, voire post-traductionnel. En effet, l'augmentation des niveaux d'ARNm de la LPL a rarement été observée dans les différentes études. Une exception est fournie par l'étude de Ong *et al.*¹³⁶

qui a démontré que l'insuline provoque une augmentation des niveaux d'ARNm et du taux de synthèse de la LPL dans des cultures d'adipocytes isolés du rat. Les résultats obtenus par Semenkovich *et al.*¹³⁷ sont en désaccord avec ces derniers puisque, dans cette étude portant également sur des adipocytes isolés, les taux d'ARNm n'ont pas été modifiés après incubation avec l'insuline. En outre, la même incubation provoquait une augmentation de l'activité enzymatique ainsi qu'une relâche de l'enzyme dans le milieu de culture. Par contre, il est intéressant de noter que l'insuline augmente les niveaux d'ARNm de la LPL lors de la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures.¹³⁷ Bien que la modulation transcriptionnelle de la LPL par d'autres hormones soit bien établie,^{48,138} l'insuline ne semble pas avoir d'effets mesurables sur la transcription du gène de la LPL.^{137,139} De plus, aucun élément de réponse à l'insuline n'a été trouvé dans le gène lui-même. Donc, les niveaux augmentés d'ARNm de la LPL observés chez le rat^{136,139} sont probablement le résultat d'une plus grande stabilité des ARN provoquée par des modifications post-transcriptionnelles telles que des changements de la structure secondaire et tertiaire des ARN,¹³⁹ ou encore par l'inhibition d'une ARNase spécifique.

L'effet de l'insuline sur les taux de synthèse de la LPL est, quant à lui, moins controversé. A l'exception d'une étude,¹³⁷ la majorité des travaux démontrent une augmentation.^{136,140-142} De la même façon, toutes les études s'accordent sur l'effet stimulateur de l'insuline sur l'activité de la LPL dans les adipocytes en culture.¹⁴¹⁻¹⁴⁴ Toutefois, une étude réalisée sur des cultures d'adipocytes humains isolés suggère que cet effet ne serait observé qu'à doses pharmacologiques et remet en question son importance physiologique.¹⁴⁴

En plus de sa synthèse, la relâche de la LPL dans le milieu de culture semble être stimulée par l'insuline.¹⁴³ L'insuline augmente spécifiquement la proportion de LPL relâchée par l'héparine,

suggérant ainsi une redistribution intracellulaire de l'enzyme.¹⁴² Il est intéressant de noter que l'insuline pourrait relâcher la LPL accrochée à la surface cellulaire par des phosphatidylinositols, un effet qui serait mené *via* la phospholipase C.⁹⁹ Il a été démontré récemment que l'insuline stimule la cellule endothéliale à relâcher une substance qui provoquerait la relâche de la LPL par la cellule adipocytaire sous-jacente.⁹⁵ Cet effet serait spécifique aux petits vaisseaux puisque la relâche de cette substance, pour l'instant inconnue, n'a pas été vérifiée dans l'aorte bovine.⁹⁵ Les résultats de ces études sont très excitants car ils démontrent que l'insuline peut être un sécrétagogue de la LPL, empêchant ainsi sa dégradation intracellulaire, le destin préférentiel de la protéine dans des conditions non stimulées.¹²²

Plusieurs travaux chez l'humain ont montré que l'insuline augmente l'activité de la LPL adipocytaire.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Cependant, ces études n'ont pas mesuré simultanément le taux d'ARNm, la quantité de protéine et l'activité enzymatique de la LPL, et le mécanisme de modulation n'a pas pu être inféré. C'est pourquoi les connaissances sur le mécanisme de modulation de la LPL par l'insuline découlent principalement des données obtenues chez l'animal.

Somme toute, les résultats des études sur le processus par lequel l'insuline stimule la LPL adipocytaire montrent que, à court terme, l'effet de l'insuline est traductionnel et post-traductionnel. À long terme, un effet sur l'augmentation des ARNm de la LPL est souvent observé chez le rat mais rarement chez l'humain. De plus, l'augmentation des ARNm est vraisemblablement causé par des modifications post-transcriptionnelles puisque aucun effet de l'insuline sur la transcription du gène de la LPL n'a été démontré. Ce genre de modulation est compréhensible pour une enzyme comme la LPL dont l'activité doit varier rapidement afin de faire face aux changements rapides de concentration des lipoprotéines plasmatiques. Il est concevable que l'être humain ait développé des mécanismes de modulation de la

LPL différents de ceux des autres animaux, lui permettant ainsi de s'adapter à son patron particulier d'alimentation.

Voie de signalisation intracellulaire de l'insuline

Encore moins connue que les modulations discutées précédemment, la voie de signalisation intracellulaire empruntée par l'insuline pour mener ses effets sur la LPL adipocytaire reste le sujet de nombreuses questions. Cela n'est pas surprenant étant donné que les composantes de cette cascade complexe de phosphorylation des protéines intracellulaires ne sont que partiellement identifiées. Plusieurs médiateurs intracellulaires, tels que l'AMPc et le GMPc, ont été suggérés comme responsables de l'effet de l'insuline sur l'activité de la LPL.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Dans une étude intéressante, Patten¹⁴⁸ a suggéré que l'addition dans le tissu adipeux d'un agent lipolytique, le *N*⁶,*O*²-dibutyryl AMPc, sous des conditions qui consomment l'ATP intracellulaire (augmentation d'acides gras et/ou réestérification d'acides gras) provoquerait une diminution de la synthèse protéique et de l'activité de la LPL qui en est dépendante. À notre connaissance, cette étude n'a été ni réfutée, ni explorée davantage. La hausse des concentrations intracellulaires de GMPc a également été impliquée comme responsable d'une augmentation de la synthèse protéique et de l'activité de la LPL adipocytaire suite à l'action de l'insuline.¹⁵⁰ Toutefois, cette hypothèse a été totalement réfutée par Bourdeaux *et al.*¹⁵¹ qui, après avoir testé directement l'effet de le GMPc sur l'activité de la LPL, n'ont démontré aucun effet.

Dans les dernières décades, quelques éléments de la cascade de signalisation intracellulaire de l'insuline ont été éclaircis. La PI3K est un médiateur particulièrement important de cette cascade puisque cette protéine est impliquée dans le transport des GLUT-4 vers la membrane cellulaire des adipocytes et myocytes. Kraemer *et al.*¹⁵² ont montré que l'inhibition de la PI3K par la wortamanine abolit l'effet stimulateur de l'insuline sur la LPL adipocytaire. Les auteurs ont également étudié l'effet

d'une inhibition de la protéine ribosomale phosphoprotéine 70 S6 kinase (p70^{S6k}), une des cibles de la PI3K et donc un substrat plus en aval dans la cascade de signalisation intracellulaire de l'insuline. Cette protéine est impliquée dans les effets de l'insuline sur la synthèse protéique, entre autres. L'inhibition de cette protéine par la rapamycine amoindrit de 50 à 60% l'activation de la LPL induite par l'insuline. Ces études démontrent donc l'importance de ces deux protéines dans le mécanisme d'action intracellulaire de l'insuline sur la LPL. Plus récemment, Ranganathan *et al.*¹⁵³ ont démontré que l'inhibition de la protéine kinase C (PKC) par un traitement prolongé (6 h) avec le phorbol ester 12-*O*-tetradecanoyl phorbol 13-acétate (TPA) causait une inhibition de la LPL dans des adipocytes 3T3-F42A en culture. L'inhibition de la LPL était alors due à une diminution du taux de synthèse protéique de la LPL alors que les niveaux d'ARNm n'étaient pas affectés. L'hypothèse proposée par les auteurs est qu'une protéine cytosolique dont le rôle serait de favoriser la traduction, serait phosphorylée par la PKC, empêchant ainsi la liaison de cette dernière aux ARNm. Lors d'une déplétion en PKC intracellulaire, la protéine en question deviendrait non phosphorylée et donc libre de se lier aux ARNm, ceci résultant en l'inhibition de la traduction protéique.¹⁵³ Ces études fournissent donc des éclaircissements sur le mécanisme d'action de l'insuline mais les données sont fragmentées et la séquence précise des événements intracellulaires ne peut pas encore être établie. Cette difficulté reflète la complexité des actions intracellulaires de l'insuline et des facteurs impliqués dans le processus de production de la LPL. Comme nous l'avons discuté dans les paragraphes précédents, l'insuline peut exercer une pléiade d'effets sur l'adipocyte et particulièrement sur la LPL. Il est donc concevable que l'hormone emprunte différentes voies de signalisation pour mener ses effets.

D'autres effets de l'insuline *in vivo* pourraient influencer indirectement l'action de la LPL adipocytaire. En effet, l'insuline inhibe la lipase hormone-sensible adipocytaire et empêche ainsi la lipolyse des triglycérides. Simultanément, l'hormone augmente la captation de glucose dans l'adipocyte et la

formation intracellulaire de glycérol. L'abondance des sites d'estérification d'acides gras dans l'adipocyte pourrait théoriquement favoriser leur entrée dans la cellule et diminuer leur disponibilité aux alentours de la LPL. La moindre abondance d'acides gras au niveau du site d'action de l'enzyme limite son détachement et perpétue la lipolyse des lipoprotéines.¹⁰¹

D'autre part, l'insuline a un puissant effet vasodilatateur. L'augmentation du flux sanguin pourrait augmenter l'apport des lipoprotéines vers les capillaires et augmenter l'efficacité globale de la lipolyse. Néanmoins, ces hypothèses restent des spéculations et ne sont supportées par aucune étude. Un résumé des effets connus de l'insuline sur la LPL est présenté à la Figure 5.

OBESITE

Il est connu que l'excès de poids est associé à plusieurs anomalies métaboliques dont la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie et l'augmentation des triglycérides plasmatiques. Plusieurs altérations de la physiologie de la LPL sont également présentes chez des sujets obèses. Premièrement, on voit chez ces personnes une augmentation de l'activité de la LPL adipocytaire par cellule^{124,154,155} ainsi que de l'incorporation de triglycérides marqués dans l'adipocyte.¹⁵⁵ Bien que les adipocytes des individus obèses aient une activité de la LPL plus élevée, surtout lorsque la fraction relâchée par l'héparine est mesurée, les niveaux d'ARNm et de protéines y sont comparables à ceux des individus maigres.¹²⁴ Ces changements post-traductionnels de la LPL adipocytaire sont semblables aux modifications observées lors de la prise d'un repas riche en glucides et lors de l'administration de l'insuline, et désignent l'hyperinsulinémie comme agent étiologique.¹²⁴ Deuxièmement, même si la LPL est augmentée à l'état de jeûne, ses niveaux ne varient pas après un stimulus alimentaire,¹⁵⁶ ni même après une injection intraveineuse d'insuline.¹⁵⁷ Les deux anomalies citées précédemment (l'augmentation de l'activité basale de l'enzyme et la réponse amoindrie à l'insuline) sont associées: plus haute est l'activité basale

de l'enzyme plus basse est la réponse de la LPL adipocytaire à l'insuline.^{145,147} Par ailleurs, toutes les deux s'améliorent avec l'amaigrissement.^{157,158} La perte de poids améliore la sensibilité à l'insuline et diminue les taux d'insuline plasmatique.^{157,159} Comme l'insuline est un puissant stimulateur de la LPL adipocytaire, la baisse de l'hormone pourrait être responsable de la diminution de l'enzyme chez des obèses. Troisièmement, lorsque les individus obèses sont soumis à une diète hypocalorique, la LPL diminue concomitamment à la réduction de la masse grasseuse,^{157,158,160} mais augmente au dessus du niveau initial dans la période de stabilisation du poids.^{157,161,162} Si l'individu regagne son poids de départ, la LPL revient elle aussi aux niveaux préalables.^{157,162} Ces observations ont mené à l'hypothèse que la LPL est modulée par un mécanisme de rétroaction négative qui viserait à maintenir un poids stable. Ce mécanisme serait en partie responsable de la difficulté à maintenir un poids normal chez les obèses.

Contrairement aux individus obèses dont le poids est stable, l'augmentation de l'activité de la LPL dans le tissu adipeux chez des obèses qui ont perdu du poids est associée avec une hausse des niveaux d'ARNm et de protéines de la LPL dans les adipocytes.¹⁶¹ Cependant, l'augmentation de la LPL après une période de stabilisation du poids semble être réservée aux individus très obèses, puisque les individus ayant un moindre degré d'obésité présentent plutôt une activité diminuée de la LPL adipocytaire après la perte de poids.^{158,160,163} Ainsi, l'étiologie du surpoids pourrait être différente dans les deux groupes de sujets obèses.

Par ailleurs, des données obtenues par une étude *in vitro* suggèrent que la résistance à l'insuline ou l'hyperinsulinémie contribuent aux anomalies de la modulation de la LPL chez les personnes obèses: les adipocytes des obèses ne répondent pas au glucose et à l'insuline, comme les adipocytes de sujets normaux, par une hausse de la LPL. Cependant, ces cellules peuvent être «sensibilisées» par une

incubation en absence de glucose et d'insuline, après quoi elles répondront normalement à un stimulus insulinique par une augmentation de la LPL.¹⁵⁶ L'hypothèse soulevée pour expliquer ces observations est que la LPL adipocytaire serait déjà stimulée au maximum par l'hyperinsulinémie chronique qui accompagne l'obésité et que le stimulus additionnel amené par le repas n'aurait pas d'effet additionnel. Cette théorie implique que les effets de l'insuline sur la LPL ne sont aucunement touchés par une éventuelle insulino-résistance au niveau adipocytaire.

En résumé, la LPL adipocytaire est augmentée chez les sujets obèses, mais la réponse lipasique à l'insuline ou à un repas est diminuée. Dans la période d'amaigrissement active, la LPL diminue systématiquement mais après la stabilisation du poids normal, l'enzyme diminue ou revient à des niveaux semblables à ceux de la période pré-diète chez la plupart des individus, alors qu'elle semble s'élever chez un groupe spécifique de sujets très obèses. Tout ceci indique que l'insuline est un modulateur important des modifications de la LPL adipocytaire chez les sujets obèses, bien que d'autres facteurs hormonaux et génétiques puissent y contribuer. Il est possible que la résistance à l'insuline soit également responsable de quelques altérations de la LPL adipocytaire dans l'obésité comme, par exemple, la réponse amoindrie de la LPL après un repas. Cela impliquerait qu'un défaut d'action de l'insuline dans l'adipocyte serait sélectif pour certains effets de l'hormone. Ainsi, les processus cellulaires épargnés par la résistance envers l'action de l'insuline, seraient en fait suractivés par l'hyperinsulinémie qui est co-présente. Puisque l'action de l'insuline sur la LPL adipocytaire se fait probablement par différents mécanismes et emprunte vraisemblablement différentes voies de signalisation intracellulaires, cette dissociation est possible. Ce genre de dichotomie de l'action de l'insuline a d'ailleurs déjà été démontrée dans d'autres études.¹⁶⁴

RESISTANCE A L'INSULINE

Tous les résultats mentionnés plus haut indiquent clairement que l'insuline joue un rôle physiologique important dans la modulation de la LPL adipocytaire, ce qui a été démontré autant lors d'études menées dans différents systèmes expérimentaux, que chez des sujets avec différentes conditions physiologiques et pathologiques. Une question importante origine de cette revue de littérature: la LPL adipocytaire souffre-t-elle des effets de la résistance à l'action de l'insuline sur le tissu adipeux? Dans l'affirmative, cette hypothèse est attrayante en ce qui concerne les conséquences de la résistance à l'insuline sur le métabolisme des lipides. La question est d'autant plus pertinente que peu d'études ont évalué le rôle de la résistance à l'insuline sur la LPL chez l'homme. Par contre, il est difficile de réconcilier comment l'individu obèse, donc insulino-résistant, pourrait avoir une activité lipasique adipocytaire plus élevée.

Chez l'humain, l'activité de la LPL plasmatique dans le plasma post-héparine est réduite chez des individus insulino-résistants.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ L'activité de la LPL mesurée après une injection intraveineuse d'héparine représente la somme de l'enzyme produite dans l'ensemble des tissus corporels. Comme la LPL provenant du tissu adipeux est une composante majeure de l'activité lipasique plasmatique,¹⁶⁸ ces données supportent l'hypothèse d'une diminution de la LPL adipocytaire dans la résistance à l'insuline.

Au moins trois études ont mesuré l'activité de la LPL dans le tissu adipeux concomitamment avec la résistance à l'insuline.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Bien que, dans toutes les trois, l'insuline avait un effet clair sur la production de la LPL adipocytaire, cette dernière ne montrait aucune corrélation avec la résistance à l'insuline. Dans un article de revue, Eckel *et al.*¹⁶⁹ ont compilé des données provenant de plusieurs études pour arriver à la conclusion que plus l'individu est résistant à l'insuline, moins la LPL adipocytaire répond à une stimulation insulinique. Une étude réalisée chez un groupe d'hommes en santé,¹¹ a en effet démontré que le degré de résistance à l'insuline étaient inversement corrélé avec le

taux de protéine ($r=-0.49$, $p<0.03$) et l'activité de la LPL ($r=-0.52$, $p<0.03$) dans le plasma post-héparine, ainsi qu'avec les niveaux adipocytaires d'ARNm ($r=-0.68$, $p<0.001$). Par contre, la quantité de LPL et son activité adipocytaire n'étaient pas corrélées avec l'insulinorésistance. Cette étude confirme donc que le défaut d'action de l'insuline s'étend aux effets de l'hormone sur la LPL adipocytaire.

Somme toute, les résultats des études portant sur le rôle de la résistance à l'insuline sur la LPL adipocytaire ne sont pas tout à fait définitifs. La résistance à l'insuline semble corrélérer négativement avec l'activité de la LPL mesurée dans le plasma post-héparine,^{11,165-167} mais pas avec celle du tissu adipeux.^{11,145-147} Toutefois, il est possible que ces études n'aient pas trouvé une corrélation entre la résistance à l'insuline et la LPL dans le tissu adipeux parce qu'elles étaient conduites chez des individus évalués à jeun. Comme expliqué précédemment, les concentrations d'insuline s'élèvent après un repas et il est donc vraisemblable que, si les effets délétères de la résistance à l'insuline sur la LPL adipocytaire existaient, ils se manifesteraient de façon plus accentuée dans la période postprandiale. Nous avons décidé de bâtir un protocole de recherche afin de répondre à cette question spécifique.

Avant de passer aux résultats de notre recherche, il nous a paru opportun de réviser certains concepts et les études concernant la problématique de l'expression de la LPL dans différents dépôts de tissu adipeux. Cette partie de la revue de littérature nous permettra de comprendre les raisons de prélever du tissu adipeux dans la région sous-cutanée abdominale pour réaliser nos analyses.

HETEROGENEITE DU TISSU ADIPEUX PAR RAPPORT A L'EXPRESSION ET A L'ACTIVITE DE LA LIPOPROTEINE LIPASE

La fonction classique du tissu adipeux blanc est d'emmagasiner l'énergie sous forme de triglycérides qui seront relâchés en cas de besoin. Cependant, depuis plusieurs années, on regarde l'adipocyte comme une cellule très active d'un point de vue métabolique.¹² Illustrant cette importante activité métabolique, nous pouvons citer parmi les protéines qui y sont produites l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1), impliqué dans la fibrinolyse;¹³ l'angiotensinogène, le précurseur de l'angiotensine II;¹⁷⁰ le «*tumor necrosis factor- α* » (TNF- α), une cytokine responsable entre autres de l'amaigrissement chez des individus porteurs de cancer et impliquée dans la résistance à l'insuline;¹⁷¹ l'hormone leptine, impliquée dans la modulation de l'appétit;¹⁷² et la lipoprotéine lipase,¹⁶⁸ enzyme qui est l'objet de la présente étude.

Cependant, le tissu adipeux présente des caractéristiques différentes selon la localisation dans le corps et selon le sexe. Ces différences attirèrent l'attention de Vague, chercheur français qui a décrit pour la première fois que le patron de distribution de la graisse dans la partie supérieure du corps était associé à certains facteurs de risque cardio-vasculaires.¹⁷³ Plus tard, il a été noté que l'obésité abdominale, telle que définie par un rapport taille/hanche (RTH) augmenté, était directement associée à un risque augmenté des maladies cardio-vasculaires.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Plus récemment, on a défini que cette association était le résultat d'une forte corrélation entre le RTH et la quantité de graisses dans la région intra-abdominale.^{17,177} L'accumulation de la graisse intra-abdominale ou viscérale, dont la méthode de quantification la plus exacte est la tomographie axiale de l'abdomen,¹⁷⁸ fut alors incriminée comme néfaste pour la santé.¹⁷⁷ En effet, la graisse viscérale ou son substitut dans la majorité des études, le tour de taille, sont associés avec plusieurs anomalies métaboliques dont la résistance à l'insuline,¹⁷ le diabète de type 2, l'hypertension^{17,177} et la dyslipidémie.¹⁷⁷ L'étude des caractéristiques du tissu

adipeux viscéral a révélé que ses adipocytes avaient des particularités par rapport au tissu adipeux sous-cutané. Parmi celles-ci on peut citer la production augmentée de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1),¹³ de la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 3,¹⁴ de la protéine découplante 2 (UCP-2),¹⁵ une moindre production de leptine,¹⁶ et une susceptibilité accrue à la lipolyse.¹⁷ Les caractéristiques uniques des adipocytes intra-abdominaux sont vraisemblablement responsables de l'association entre l'accumulation de graisse viscérale et le risque élevé de maladies cardio-vasculaires.¹⁸⁻²¹

La lipoprotéine lipase, en tant qu'enzyme responsable de l'accumulation des triglycérides dans le tissu adipeux, a été suspectée comme cause de l'accumulation de graisses dans les différentes régions corporelles. Ainsi, il y a des différences marquées de l'activité de la LPL dans divers dépôts de tissu adipeux sous-cutané. Fried *et al.*¹⁷⁹ ont étudié l'activité de la LPL dans quatre dépôts de tissu adipeux sous-cutané (glutéal, fémoral, abdominal hypogastrique et abdominal épigastrique) et deux dépôts intra-abdominaux (mésentérique et omental). Les auteurs ont démontré que, chez les femmes obèses, l'activité de la LPL était plus élevée dans les régions périphériques sous-cutanées (fémorale et glutéale) par rapport aux régions abdominales sous-cutanées (hypogastrique et épigastrique), alors que chez les hommes, il n'y a pas eu de différences significatives entre ces quatre régions. Arner *et al.*¹⁸⁰ ont comparé l'activité et les niveaux d'ARNm de la LPL dans la région glutéale et abdominale chez les femmes et chez les hommes. Tout comme Fried *et al.*,¹⁷⁹ les auteurs ont démontré que l'activité de la LPL par cellule était plus élevée chez les femmes que chez les hommes autant dans la région abdominale que glutéale. Lorsque les deux sites de déposition de graisse ont été comparés, les femmes ont présenté une activité enzymatique plus forte dans la région glutéale que dans la région abdominale. Par contre, aucune différence n'a été trouvée chez les hommes. On convient de souligner que, dans cette étude, les niveaux d'ARNm ne suivent pas les changements d'activité, démontrant que les

différences d'activité découlent principalement de modifications post-traductionnelles. D'ailleurs, une activité plus élevée de la LPL dans le tissu adipeux sous-cutané des femmes que dans celui des hommes est retrouvée constamment dans les études.¹⁷⁹⁻¹⁸¹ Chez les hommes par contre, l'activité de la LPL est assez uniforme entre les différents dépôts sous-cutanés. Une autre façon d'exprimer ces données serait d'affirmer que les femmes ont une plus grande activité de la LPL dans la région glutéale/fémorale que les hommes, alors que dans la région abdominale, les différences entre les sexes sont moins évidentes.

Les études sur le comportement de la LPL dans le tissu adipeux viscéral par rapport au tissu sous-cutané montrent des résultats divergents. Dans l'étude citée plus haut, Fried *et al.*¹⁷⁹ ont également analysé l'activité de la LPL dans deux dépôts de graisse viscérale, la graisse mésentérique et la graisse épiploïque. Chez les hommes, aucune différence entre les deux dépôts viscéraux n'a été observée, de même qu'entre ceux-ci et les dépôts sous-cutanés. Chez les femmes par contre, le dépôt mésentérique a présenté une activité de la LPL plus forte que le dépôt omental. En plus, l'activité enzymatique dans la graisse mésentérique était plus forte et celle de la graisse omentale semblable à celle du tissu sous-cutané abdominal épigastrique. Dans une autre étude chez des obèses morbides, menée par le même groupe, il a été démontré que l'activité et les niveaux d'ARNm de la LPL dans des adipocytes en culture provenant du tissu abdominal sous-cutané répondent mieux à une stimulation insulinique que ceux provenant du tissu omental.¹⁸² Deux autres études ont montré que l'activité de la LPL était plus importante dans le tissu adipeux viscéral que dans le tissu sous-cutané,^{17,181} alors qu'une étude a montré le contraire.¹⁸³ La raison des différences entre ces études n'est pas claire. La localisation précise du prélèvement de graisses est une donnée importante: au moins deux études ont montré des différences entre divers dépôts intra-abdominaux,^{179,183} ainsi qu'entre divers dépôts sous-cutanés abdominaux.¹⁷⁹ En outre, les formes de LPL analysées dans les études ne coïncident pas toujours (total ou relâchée par

l'héparine) et les dénominateurs utilisés pour exprimer l'activité de l'enzyme non plus (surface cellulaire, poids du tissu).

Des études ayant analysé les différences de niveaux d'ARNm de la LPL entre les tissus adipeux sous-cutané et viscéral sont plus rares.^{16,182,184} Dans le travail de Fried *et al.*¹⁸² les résultats dépendent du sexe: chez les femmes, le tissu sous-cutané exprime plus de LPL que le tissu viscéral alors que chez les hommes, aucune différence n'a été observée. Dans les deux autres études, l'expression de la LPL était semblable dans les deux sites étudiés.^{16,184} Encore une fois, les raisons des ces trouvailles contradictoires ne sont pas claires. Les explications possibles incluent l'utilisation de techniques différentes de mesure de l'ARNm, ou des différences entre les sujets étudiés.

Seule une de ces études a mesuré simultanément l'activité et les niveaux d'ARNm.¹⁸² Cependant, les individus qui ont participé étaient très obèses et les conclusions peuvent ne pas s'appliquer à l'ensemble de la population. De plus, aucun travail ne s'est intéressé à vérifier la corrélation entre la LPL adipocytaire sous-cutanée et viscérale. Cette information est importante: d'une part, pour la compréhension globale de la physiologie de la déposition de la graisse ainsi que pour le métabolisme des lipoprotéines, et d'autre part, si on veut utiliser la graisse sous-cutanée abdominale comme marqueur dans le syndrome de résistance à l'insuline. La comparaison entre l'activité et les niveaux de l'ARNm de la LPL dans le tissu adipeux sous-cutané abdominal et viscéral sera donc l'objet du deuxième article présenté dans cette thèse.

JUSTIFICATION, HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

PREMIER ARTICLE

D'après la revue de la littérature précédente, nous constatons qu'aucune étude n'a vérifié le rôle de la résistance à l'insuline sur la LPL adipocytaire chez l'homme dans la période postprandiale.

Notre hypothèse à ce sujet est que la résistance à l'insuline entraîne une moindre activité de la lipoprotéine lipase adipocytaire dans la période postprandiale. Le défaut d'action de la lipoprotéine lipase occasionnerait une diminution du catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides et une hypertriglycémie postprandiale.

Les 3 objectifs spécifiques que nous voulons étudier sont les suivants:

1. Vérifier s'il existe une diminution, en période postprandiale, de l'expression de la LPL adipocytaire chez les individus insulino-résistants, en comparaison avec les individus insulino-sensibles.
2. Vérifier le lien possible entre une diminution des niveaux d'ARNm de la LPL, et une diminution éventuelle de l'activité ou de la quantité tissulaire de la LPL.
3. Explorer la relation entre les lipides sanguins et les variables plasmatiques et tissulaires de la LPL, en tenant compte de la résistance à l'insuline.

DEUXIEME ARTICLE

Les études portant sur la comparaison entre les tissus adipeux sous-cutané et viscéral ont mesuré soit l'ARNm, soit l'activité de la LPL. Aucune étude n'a comparé ces deux variables dans les deux tissus.

Dans le deuxième article de cette thèse, nous voulons comparer l'activité et les niveaux d'ARNm de la LPL dans le tissu adipeux des régions abdominale et viscérale, chez un groupe de sujets normaux ayant subi une chirurgie abdominale.

PREMIER ARTICLE

**INSULIN RESISTANCE AFFECTS THE REGULATION OF
LIPOPROTEIN LIPASE IN THE POSTPRANDIAL PERIOD
AND IN AN ADIPOSE TISSUE SPECIFIC MANNER**

Daniel Panarotto, Pierre Maheux

Departments of Medicine, Pharmacology and Physiology (Division
of Endocrinology and Metabolism), Université de Sherbrooke,
Sherbrooke Québec, Canada

To whom correspondence should be addressed:

Pierre Maheux, M.D., FRCPC
Division of Endocrinology and Metabolism
Université de Sherbrooke
3001, 12th Avenue North
Sherbrooke (Quebec)
Canada J1H 5N4
Phone:
Fax:
Email:

ABSTRACT

Insulin is a potent stimulator of adipose tissue lipoprotein lipase (LPL). Logically, the postprandial period would therefore be a privileged time of the day for the regulation of LPL by insulin in this tissue. It is not exactly clear to what extent a defect such as insulin resistance could affect this regulation and contribute to postprandial as well as fasting hypertriglyceridemia. No human studies have examined this phenomenon thoroughly in the postprandial period. Therefore, the aim of the present protocol was to study the complex relationship existing between insulin resistance and LPL in adipose tissue and in plasma, in the particular context of the postprandial period. To do so, 26 adult non-diabetic individuals (12 women and 14 men) with a wide range of whole-body insulin-mediated glucose uptake (as assessed with an insulin suppression test) were recruited. An abdominal subcutaneous fat biopsy on one occasion, and postheparin plasma on another occasion, were obtained 4 hours into a standardized meal profile administered in the fasting state. Postprandial triglyceride excursions (evaluated by the area under the curve during the metabolic meal profile) were inversely correlated to LPL activity measured in total as well as in the heparin-releasable adipose tissue fraction ($\rho=-0.70$, $p<0.001$, and, $\rho=-0.56$, $p<0.01$, respectively). Steady-state plasma glucose (SSPG) concentrations during the insulin suppression test, a reflect of the degree of insulin resistance, were also negatively correlated to adipose tissue LPL mRNA ($\rho=-0.50$, $p<0.02$) and total activity ($\rho=-0.48$, $p<0.02$). In conclusion, regulation of adipose tissue LPL is significantly affected in insulin resistant individuals studied in the postprandial period. This presumed impaired effect of insulin on LPL could be an important

contributor to the atherogenic dyslipidemia described in the insulin resistance syndrome.

INTRODUCTION

LPL is a key enzyme in the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins (1-3) and has been implicated in the pathogenesis of dyslipidemia in conditions associated with insulin resistance (4-6). This is not entirely surprising since insulin is one of the most potent known regulators of LPL (7,8). Insulin stimulates adipose tissue LPL by multiple mechanisms (9,10) and if these actions are impaired in this organ, defective clearance of triglyceride-rich lipoproteins might ensue. This hypothesis, although appealing, has been somewhat difficult to verify in humans, with published studies producing conflicting findings (7,8,11,12). Methodological differences such as different sample characteristics, sites of adipose tissue sample, and the type of LPL variables measured could have contributed to these contrary findings. Another problem is the fact that this relationship has frequently been examined only in patients with Type 2 diabetes in which hyperglycemia can theoretically be an important confounder (6). Moreover, with the exception of one paper from our group (13), adipose tissue LPL mRNA and LPL activity (total and heparin-releasable) have rarely been assessed in the same individuals. Insights into the precise cellular regulation of this enzyme are therefore limited.

Clinical studies have not examined the effect of insulin resistance on adipose tissue LPL in the postprandial period, even though this period is not only recognized as being very important in determining the overall lipoprotein profile (14,15), but it is clearly a time during which an impaired regulation of adipose tissue LPL by insulin could theoretically have serious consequences.

The present study was carried out to verify the importance of adipose tissue LPL in the postprandial period. More specifically, the goal of the study was to determine the influence of insulin resistance on adipose tissue and plasma LPL. For this purpose, postprandial steady-state mRNA, total tissue and heparin-releasable activity were measured, at the end of a mixed meal, in adipose samples obtained from normal individuals with a wide range of insulin resistance. In addition, plasma LPL activity was also assessed in the same individuals to gain more information on the relationship between LPL synthesized in adipose tissue and LPL anchored in body vasculature.

MATERIAL AND METHODS

Study population

Twenty-six volunteers were recruited for this study. They were in good general health and not taking any medication known to affect glucose or lipoprotein metabolism. All had a normal glucose tolerance test as assessed by a two-hour 75-g oral glucose tolerance (16). The study was conducted at the Clinical Research Centre of the Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (Sherbrooke, QC, Canada) and was approved by the institutional Ethics Committee. All volunteers gave their informed written consent.

Description of the metabolic procedures

Each research volunteer was studied on three different occasions for the following metabolic procedures: one standardized meal profile followed at 4 hours by an adipose tissue biopsy, a second meal profile followed at 4 hours by a post-heparin plasma LPL assessment, and, one insulin suppression test to assess the insulin-mediated glucose uptake. These procedures were always performed after a 12 h overnight fast, at which time an indwelling catheter was placed in the antecubital vein for blood sampling and was kept open with an infusion of saline. For the insulin suppression test, a second catheter was installed in the contralateral forearm for the infusion of glucose, insulin and somatostatin. Each procedure is briefly described below:

For the metabolic meal profile, a standardized breakfast was given at 08h00 followed at 10h00 by a snack (Ensure[®] 1.06 Kcal/mL). The caloric content of each meal was

calculated as being exactly 25% and 10% of the caloric needs of each individual, according to the Harrison-Benedict formula (17). The macronutrient composition of the breakfast was 60% of calories as carbohydrates, 12% as proteins and 28% as fat. The relative composition of the liquid formula snack was 54, 14 and 35% respectively. The volunteers took their meals in not more than 15 minutes. Blood samples were drawn at -15, 0, 30, 60, 90, 120, 180 and 240 minutes for measurement of triglycerides, insulin and glucose concentrations. At 240 minutes (4 hours), each volunteer either underwent an adipose tissue biopsy or an intravenous injection of heparin.

Biopsy of the subcutaneous open fat biopsy of the lower abdominal wall was performed under anaesthesia, as previously described (13). Approximately 1g of adipose tissue was obtained and immediately frozen between two blocks of dry ice, and kept frozen at -80°C until assayed for LPL mRNA and activity. Another similar fresh adipose tissue piece was quickly put in saline, gently minced, and frozen in dry ice to measure heparin-releasable LPL activity.

Plasma LPL activity and immunoreactive mass was measured after the intravenous injection of 100 U/kg of heparin. Blood samples were drawn in pre-chilled tubes 30 minutes after the injection. The samples were immediately centrifuged at 4°C, separated, aliquoted, frozen in an alcohol and dry ice bath, and kept at -80°C until assayed for activity and immunoreactive mass.

Finally, insulin-mediated glucose disposal was quantified by the insulin suppression test

as described previously (13). Briefly, steady-state plasma insulin and glucose (SSPG) concentrations were measured at 10 minutes intervals during the last 30 minutes of a 180-minute infusion of octreotide (0.5 $\mu\text{g}/\text{min}$), insulin (150 $\text{pmol}/\text{m}^2/\text{min}$), and glucose (1.33 $\text{mmol}/\text{m}^2/\text{min}$). Since steady-state plasma insulin concentrations were similar in all individuals, the higher the SSPG concentrations, the more insulin resistant the individual.

Measurement of LPL steady state mRNA levels

The concentration of LPL steady-state mRNA levels were determined by using a sensitive RNase protection assay (13,18). Total cellular RNA from adipose tissue samples was isolated using a guanidinium thiocyanate-phenol technique (19). Briefly, approximately 500 mg of adipose tissue were homogenized in 2.5 mL of TRIzol[®] Reagent (GibcoBRL Life Technologies, Burlington, Ontario) and the fatty cake resulting from a centrifugation at 4°C and 12000 g was discarded before going on with the other steps of the procedure. RNA was subsequently hybridized overnight with molar excess of [³²P]-labeled antisense LPL cRNA transcripts and the housekeeping gene 18S ribosomal cRNA. The mixture was then digested with RNases A and T1, and the protected fragments were separated on a 6% acrylamide urea denaturing gel. After electrophoresis, gels were quantified using a PhosphorImager[®] system with its ImageQuant[®] software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). The LPL mRNA content was normalized per unit of 18S ribosomal RNA and expressed in arbitrary units (AU) of 18S ribosomal cRNA.

Measurement of plasma and tissue LPL activity

LPL activity was determined in adipose tissue as well as postheparin plasma using a sonicated [^3H]-triolein emulsion as substrate, prepared according to Nilsson-Ehle and Schotz (20) and as described previously by our group (13,21). Briefly, 50 μl of a six-fold diluted post-heparin plasma to 150 μl of substrate was incubated for 30 min at 37°C. The [^3H]-oleic acid released was extracted and separated from [^3H]-triolein substrate as described by Belfrage et al. (22) and radioactivity quantified by liquid scintillation spectrometry. In order to distinguish the activity of plasma post-heparin LPL activity from that of residual hepatic lipase, 1 mol/L NaCl was used to inhibit LPL and hepatic lipase activities were determined in a separate incubation (23). These values were subtracted from the total lipolytic activity to obtain the post-heparin-LPL values. The results are expressed as mmol of non-esterified fatty acid (NEFA) released per hour per mL of post-heparin plasma or U/mL. In the case of adipose tissue, LPL activity was assessed in the heparin-releasable tissue fraction as well as in total tissue. For the former, 10 to 50 mg of small pieces of adipose tissue were incubated with 400 μl of extraction buffer (M199 medium [Hanks'salts plus L-glutamine]; 1% bovine serum albumin [BSA]; 5 units/mL of heparin) at pH 7.4 and for 45 minutes at 28°C, and LPL activity was assessed in the medium using the method described above. Total extractable adipose tissue LPL activity was measured after detergent extraction as described by Iverius and Brunzell (24). Approximately 150 mg of frozen adipose tissue were homogenized with a polytron in 300 μl of extraction buffer (0.5 % deoxycholate, 0.2 mol/L Tris, 0.02 mol/L sucrose, 1% BSA; 0.1 mL of 10 units/mL heparin and 0.02 % NP-40) at pH 8.6 and centrifuged for 15 min to separate the infranatant subsequently used for measurement of LPL activity. All

the incubations for adipose tissue were performed with heated human serum (as a source of apo CII) for 1 hour at 37°C. The results are expressed as mmol of NEFA released per hour per g of frozen tissue or U/g for both fractions.

Measurement of LPL immunoreactive mass

Post-heparin plasma LPL immunoreactive mass was determined by a commercial ELISA kit (MARKIT-F LPL; Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd, Osaka, Japan). The assay does not crossreact with human hepatic lipase, has a range of determination of 20 to 400 ng/mL and an intra-assay coefficient of variation less than 5%.

Hormonal and biochemical assays

Plasma insulin was determined using a human insulin-specific radioimmunoassay that did not cross-react with proinsulin (Linco Research Co, St Louis, MO, USA). The assay sensibility was 10 pmol/L. Plasma glucose was determined by the glucose oxidase procedure (DMA Inc, Arlington, Texas, USA). Postprandial plasma triglycerides were measured by the glycerol phosphate oxidase method (DMA Inc., Arlington, Texas, USA). Fasting triglycerides, HDL-C, LDL-C and total cholesterol were measured by the usual procedure utilized by the local hospital laboratory. LDL-C was calculated from triglycerides and HDL-C using the Friedewald formula (25). Finally, plasma apoproteins A-I and B were measured by nephelometry.

Statistical Analyses

Data are reported as mean \pm SEM unless otherwise indicated. The areas under the curve for triglycerides, insulin and glucose concentrations were calculated using the trapezoid method. Although insulin resistance, as measured by SSPG, is a continuous variable, we have also dichotomized it to separate an insulin resistant from an insulin sensitive subgroup using the median of this variable. A repeated measure ANOVA was used to compare the glucose, insulin and triglyceride excursions during the meal profile in both insulin resistance subgroups. For all other analyses, non-parametric tests were used; specifically the Mann-Whitney U-rank to compare continuous variables between insulin resistance subgroups and the Spearman test was used to verify correlation. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using the SPSS[®] software for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Volunteers' characteristics

Table 1 depicts some baseline characteristics of the volunteers. It can be appreciated that fasting plasma glucose was normal, that these volunteers were not particularly dyslipidemic, and that variables such as SSPG (insulin resistance) spanned a large range of values, giving good opportunity for looking at various types of correlations. This table also compares these variables across men and women. In general, men were heavier, had lower plasma HDL-C, higher plasma triglyceride and apoprotein B concentrations.

Simple correlation between insulin resistance and classical variables

Correlations were found between insulin resistance (estimated by SSPG) and meal test excursions (or AUC) for plasma insulin ($\rho=+0.70$; $p<0.001$) and plasma triglyceride concentrations ($\rho=+0.45$; $p<0.03$). As expected, there was also an inverse correlation between SSPG and plasma HDL-C concentrations ($\rho=-0.48$; $p<0.02$).

Variation of glucose, insulin and plasma triglycerides during the standardized meal profile

Figure 1 illustrates the variation in plasma glucose, insulin and triglycerides over the course of the standardized meal profile both in the insulin-resistant and in the insulin-sensitive subgroup. Plasma insulin excursions were significantly more important in the insulin-resistant subgroup ($p<0.001$; repeated-measure ANOVA) although there was no

statistically significant intergroup difference for plasma glucose concentration over time ($p=NS$; repeated-measure ANOVA). Taken together, these two observations indicate the existence of an insulin resistance phenomenon in the insulin-resistant subgroup. Plasma triglycerides were higher in the insulin resistance subgroup than in insulin sensitive counterparts at baseline and during the meal profile ($p<0.01$; repeated-measure ANOVA). We were able to observe a slow but steady increase in plasma triglycerides over the course of this standardized procedure even though the macronutrient content of the test meals was not especially rich in dietary fats. In the insulin-resistant subgroup, plasma triglycerides increased by $60.5\pm 12.5\%$ over the 4-hour meal test, as compared to $43.3\pm 11.8\%$ in the insulin sensitive subgroup, but this difference was not statistically significant.

Relationship between postprandial plasma triglycerides and adipose tissue LPL

The degree of postprandial hypertriglyceridemia, as assessed by the AUC, had a tendency to be inversely correlated to adipose tissue LPL steady-state mRNA levels ($\rho=-0.35$, $p=0.08$). However, postprandial hypertriglyceridemia was inversely correlated with adipose tissue total LPL activity ($\rho=-0.70$, $p<0.001$; Figure 2) and adipose tissue heparin-releasable LPL activity ($\rho=-0.56$, $p<0.01$). Along with these correlations in the postprandial period, it should be noted that total adipose tissue LPL activity was positively correlated with the LDL-C to apoB ratio ($\rho=+0.55$, $p<0.01$) as well as with the HDL-C to apoA ratio ($\rho=+0.80$, $p<0.0001$), both measured in the fasting state.

Relationship between insulin-mediated glucose disposal and LPL in the postprandial period

The degree of insulin resistance, measured by SSPG, was inversely correlated to adipose tissue LPL steady-state mRNA levels ($\rho=-0.50$, $p<0.02$) and adipose tissue total LPL activity ($\rho=-0.48$, $p<0.02$; Fig. 3). Therefore, the more insulin resistant an individual, the lower the adipose tissue LPL postprandially. This reduction in adipose tissue LPL was observed both at the level of the mRNA levels as well as the total tissue catalytic activity. Figure 4 depicts the differences between the insulin-sensitive and the insulin-resistant subgroups, for the LPL variables measured in this study for the adipose tissue as well as the postheparin plasma (activity and immunoreactive mass). It is clear from these data that only the adipose tissue variables appear to be affected by the insulin resistance defect.

Relationship between LPL mRNA and activity in adipose tissue

We examined correlations between steady-state mRNA levels and total as well as heparin-releasable LPL activity in adipose tissue. These correlations were performed in the entire study sample as well as in the two insulin resistance subgroups. In the whole study cohort, steady-state mRNA levels were positively correlated to both the total ($\rho=+0.46$, $p<0.03$) and the heparin-releasable ($\rho=+0.64$, $p<0.002$) LPL activity in adipose tissue. It is important to pinpoint that the correlation was stronger with the heparin-releasable LPL activity fraction.

In the insulin sensitive subgroup, the correlation between LPL steady-state mRNA levels

and total tissue activity was only statistically significant in the insulin sensitive subgroup ($\rho=+0.62$, $p<0.04$). No correlation was demonstrated in the insulin-resistant subgroup ($\rho=+0.03$, $p=0.91$).

DISCUSSION

In this study we examined inter-relations between LPL in adipose tissue and plasma, insulin resistance and plasma triglyceride levels in the postprandial period in a group of 26 healthy volunteers with normal glucose tolerance. Our results clearly show the important role of insulin resistance on adipose tissue LPL in the postprandial period. Our decision to measure LPL postprandially is supported by the knowledge that insulin is specifically an important regulator of adipose tissue LPL after a meal (5). If this adipose tissue regulation is indeed affected by insulin resistance, our experiments would confirm that it is intrinsically implicated in the reduced clearance of triglyceride-rich lipoproteins seen in human beings with impaired insulin-mediated glucose uptake. While there is some evidence in the literature that such a defect exists in some animal models with insulin resistance (26,27) as well as humans with various degrees of glucose tolerance (5,6), our study is the only one that has measured LPL postprandially both in adipose tissue and in plasma. We have previously shown that postheparin LPL activity, as well as steady-state LPL mRNA levels, were reduced in individuals with insulin resistance in the fasting state (13). Because LPL originating from adipose tissue is not generally recognized as being important in the fasting state, it seemed important to conduct our experiments after a standardized meal profile. Our experiments are further backed by the fact that postprandial period plays an important role in the plasma lipoprotein homeostasis (14,15).

The present study has provided several new and important insights. Firstly, our data

show clearly that excursions of plasma triglyceride levels during a double-meal test are well correlated to LPL activity in adipose tissue. The area-under-the-curve for plasma triglyceride levels was inversely correlated with both total and heparin-releasable LPL activity in adipose tissue obtained 240 minutes into a standardized meal profile. Of note, plasma triglycerides excursions were not correlated to plasma postheparin LPL activity and its correlation with adipose tissue steady-state mRNA levels was only borderline ($p=0.08$). One explanation for the latter observation may be that 240 minutes is not sufficient enough, in human beings, to stimulate transcription of the LPL gene adequately, and that indeed most of the postprandial increase in adipose tissue activity could be consequent to a post-translational regulation as previously shown (10,28). Alternatively, the lack of correlation between plasma triglycerides and LPL present in the vascular/plasma compartment (as assessed by the intravenous injection of a high dose of heparin) suggests that postprandial insulin has a predominant and concentrated effect locally on adipose tissue. The postprandial stimulation of LPL by insulin does not seem to modify the amount of LPL that has a potential of migrating throughout the vascular apparatus for its physiological action. To our knowledge, our study is the first to suggest the plasma and adipose tissue sets of variables for LPL are indeed dichotomized in the postprandial period. This phenomenon has been examined and discussed several times for skeletal muscle vs. adipose tissue (7,29) but, to our knowledge, this is the first time that such dichotomy is reported for adipose tissue and plasma.

The second part of our experiments examined correlations between LPL variables and insulin resistance measured as a continuous variable with the insulin suppression test,

or as a dichotomized variable (insulin-sensitive individuals vs. insulin-resistant). These analyses revealed that insulin resistance is associated with a postprandial reduction in LPL steady-state mRNA levels, total tissue activity, and heparin-releasable adipose tissue activity. Here again, plasma LPL activity in the vascular compartment was in no instance related to the degree of whole-body insulin mediated glucose uptake. Our observations therefore confirm that insulin resistance has a direct and selective effect on the postprandial expression of LPL in adipose tissue only. Given that LPL has a critical role in clearing triglyceride-rich lipoproteins from circulation postprandially, these observations provide an explanation of why insulin resistance can lead to fasting and postprandial hypertriglyceridemia and consequently to the appearance of low HDL and small dense LDL particles (30,31). This is confirmed, in our study, by the fact that we observed a positive correlation between adipose tissue LPL activity, measured in the postprandial period, and the LDL-C to apoprotein B ratio. These data, along with the ones on mRNA levels from our previous paper in the fasting state (13), suggest that insulin resistance exerts an effect on adipose tissue LPL expression postprandially and that this effect most certainly also extends into the postabsorptive period.

Finally, we should not neglect the interesting observation that adipose tissue steady-state mRNA levels for LPL were relatively well correlated to total as well as heparin-releasable adipose tissue activity in the postprandial period ($r=+0.46$ and $+0.64$ respectively; $p<0.03$). This finding is noteworthy because similar correlations were not observed in adipose tissue and in the postabsorptive state in our previous study (13). One explanation for this discrepancy could be the fact that plasma insulin concentrations

have some significant effect on gene expression after a meal even though it is generally accepted that the regulation is mostly post-transcriptional (10,28). However, it must also be emphasized that the correlation between tissue mRNA and tissue LPL activity were generally stronger for the heparin-releasable fraction ($r=+0.64$) as compared to total tissue activity ($r=+0.46$): this suggests that insulin influences maturation of the LPL molecules as well as their migration to the extracellular/vascular/heparin-releasable compartment. Among the subgroups of insulin sensitivity, an association between LPL mRNA and total tissue activity was observed only in the insulin-sensitive subgroup ($r=+0.62$ vs. $r=+0.03$). This observation is not incompatible with the possibility of an eventual impact of impaired insulin action on the expression of the LPL gene. If the insulin resistance defect prevents insulin from stimulating the LPL gene, a lesser (or absent) correlation between steady-state mRNA levels and tissue activity might be expected.

In conclusion, our study offers new insights on the predominant and selective effect of insulin resistance on the expression LPL by adipose tissue in the postprandial period. It also demonstrates that LPL is an important determinant of the severity of the hypertriglyceridemia in non-diabetic individuals with increasing degrees of insulin resistance. Giving the fact that this hypertriglyceridemia can lead to the generation of a highly atherogenic lipoprotein profile (31), our data exemplify how adipose tissue, through its specific production of LPL, can be pivotal in the insulin resistance syndrome.

ACKNOWLEDGMENTS

We also acknowledge the staff of the Clinical Research Center for the help in performing all metabolic test of this study. This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (MT-15097) and a scholarship from the Canadian Diabetes Association. We are also grateful to the Clinical Research Center of the Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke and the Joe Beattie Memorial Fund for their financial support.

Table 1. Volunteers' Characteristics.

	All	Men	Women
n	26	14	12
Age (yr)	52 ± 7	53 ± 7	51 ± 7
BMI (kg/m ²)	28.6 ± 3.6	28.9 ± 2.6	28.2 ± 4.6
Weight (kg)	79.5 ± 12.4	85.8 ± 10.3	72.0 ± 10.5**
Waist:hip ratio	0.98 ± 0.06	1.00 ± 0.04	0.96 ± 0.08*
Fasting glucose (mmol/L)	5.4 ± 0.7	5.6 ± 0.7	5.3 ± 0.7
Cholesterol (mmol/L)	5.26 ± 0.63	5.17 ± 0.95	5.37 ± 0.69
HDL-C (mmol/L)	1.08 ± 0.42	0.84 ± 0.17	1.37 ± 0.45**
LDL-C (mmol/L)	3.27 ± 0.81	3.22 ± 0.88	3.34 ± 0.75
Triglycerides (mmol/L)	2.10 ± 1.12	2.66 ± 1.16	1.45 ± 0.64**
Apoprotein B (g/L)	1.17 ± 0.28	1.27 ± 0.27	1.05 ± 0.25*
SSPI (pmol/L)	362 ± 127	380 ± 129	338 ± 125
SSPG (mmol/L)	11.6 ± 4.6	12.6 ± 3.8	10.3 ± 5.3

Mean ± SD

* p<0.05 and **p<0.01 compared to men (Mann-Whitney Rank test)

FIGURE LEGENDS

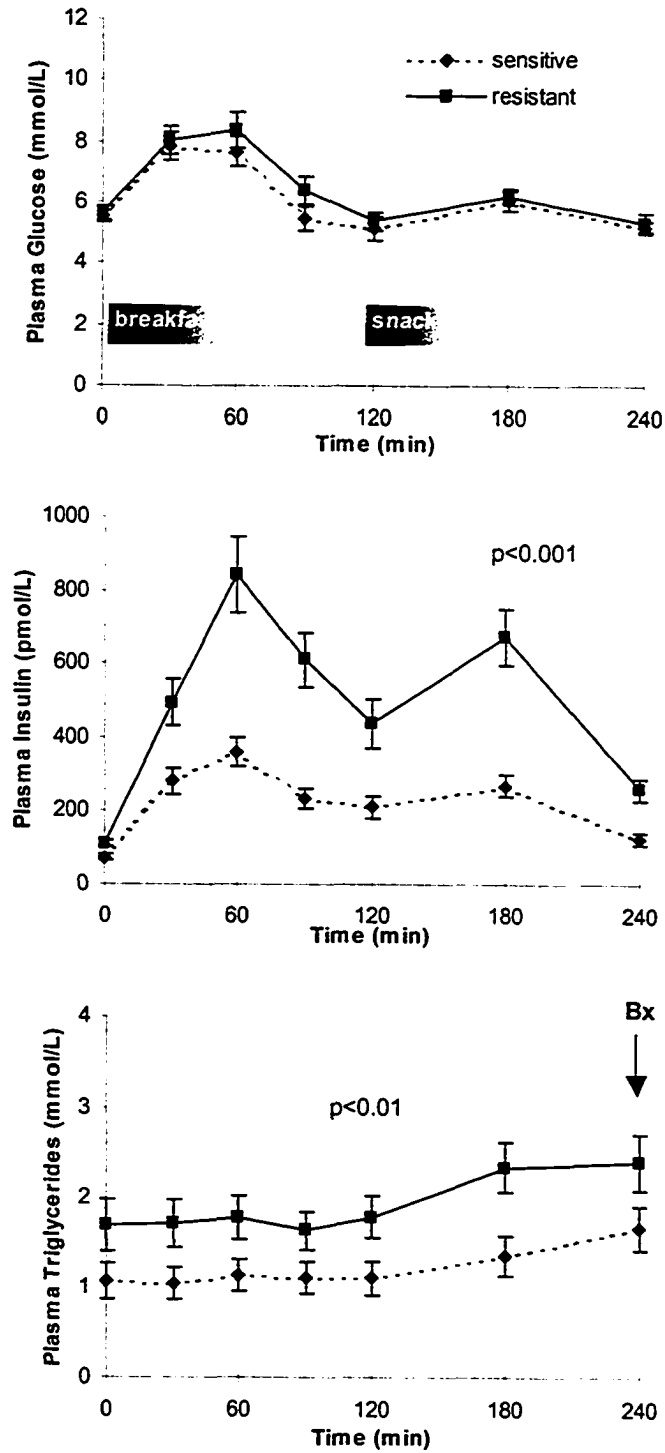
Figure 1. Plasma glucose, insulin and triglyceride excursions during a 240-minute metabolic meal profile in study volunteers divided, based on the SSPG obtained during the insulin suppression test, in insulin-sensitive and insulin resistant volunteers. A standardized breakfast was administered at 08h00 (T=0 min). “Bx” indicates the time at which the subcutaneous fat biopsy was performed during the double-meal metabolic test.

Figure 2. Relationship between AUC-TG (area-under-the-curve of plasma triglyceride concentration) and total extractable LPL activity in the adipose tissue biopsy obtained postprandially in the entire study sample ($\rho=-0.70$, $p<0.001$). One unit of LPL activity is the number of mmol of NEFA released per hour.

Figure 3. Relationship between total adipose tissue extractable LPL activity and SSPG obtained with the insulin suppression test in the entire study sample ($\rho=-0.48$, $p<0.02$). One unit of LPL activity is the number of mmol of NEFA released per hour.

Figure 4. Comparisons of several LPL variables in adipose tissue and in postprandial postheparin plasma in insulin-sensitive and insulin-resistant volunteers. LPL variables in the postheparin plasma as well as the subcutaneous adipose tissue samples were both measured 240 minutes into the double-meal test procedure.

FIGURE 1



January 4, 2001
 Insulin resistance and postprandial lipoprotein lipase

FIGURE 2

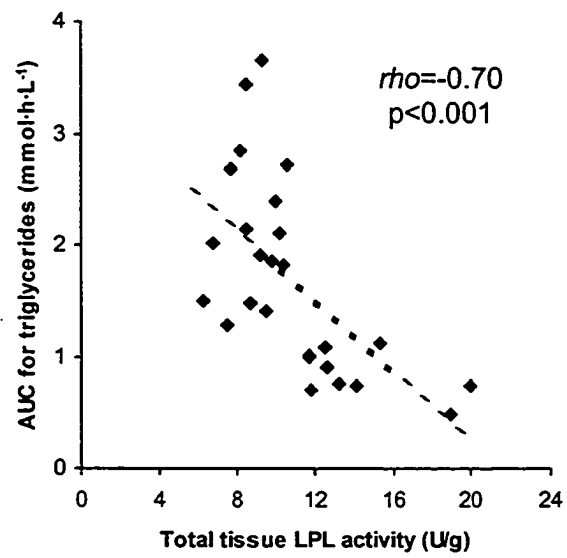


FIGURE 3

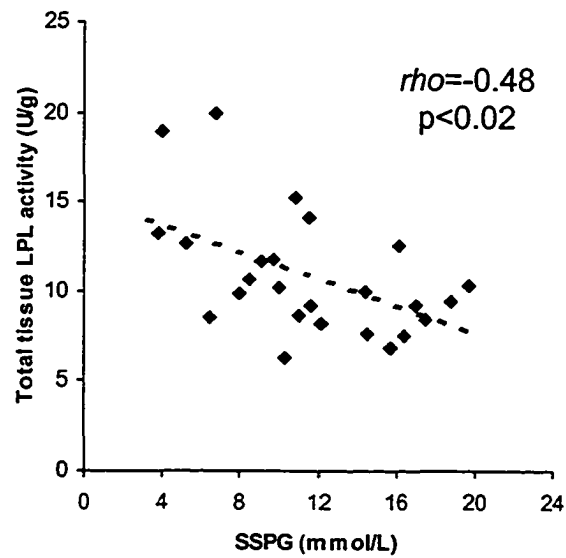
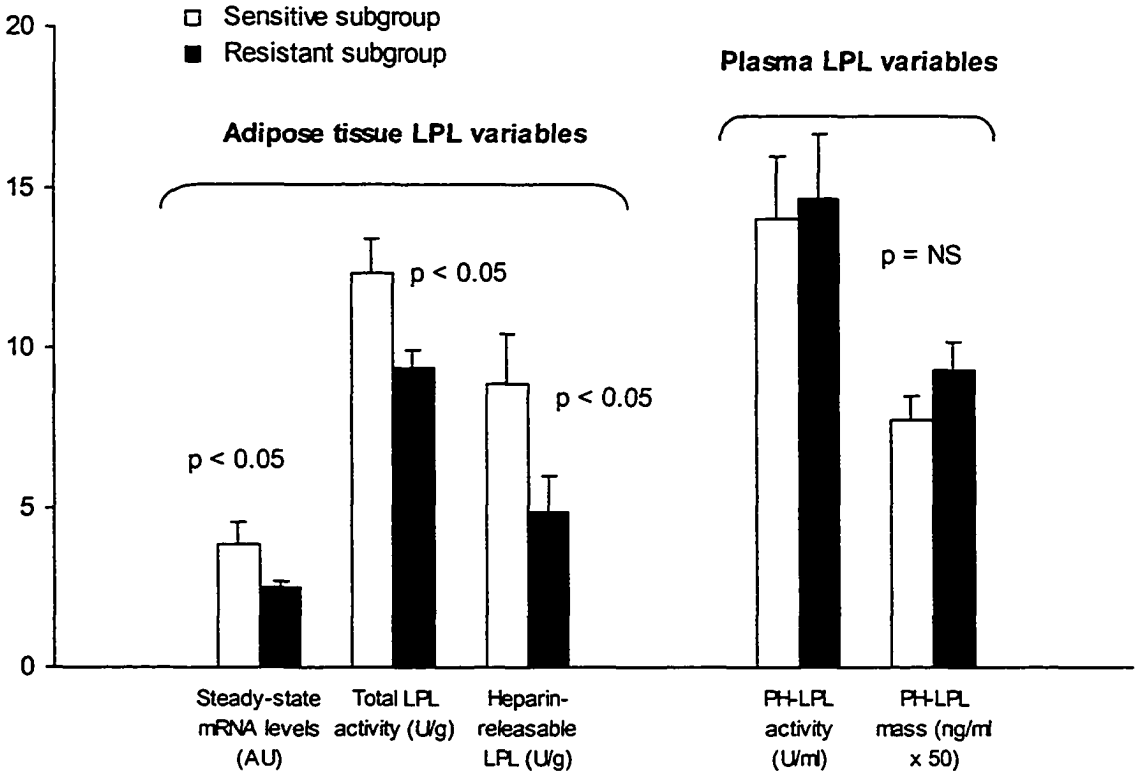


FIGURE 4



ABBREVIATIONS

BMI	Body mass index
LPL	Lipoprotein lipase
mRNA	Messenger ribonucleic acid
HDL-C	High Density Lipoprotein-Cholesterol
LDL-C	Low Density Lipoprotein-Cholesterol
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
SSPG	Steady State Plasma Glucose
SSPI	Steady State Plasma Insulin
NEFA	Non-Esterified Fatty Acid

REFERENCES

1. **Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G, Chajek-Shaul T, et al.** 1991 Lipoprotein lipase: site of synthesis and sites of action. *Atheroscl Rev.* 22:21-25.
2. **Eckel RH.** 1989 Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med.* 320:1060-1068.
3. **Taskinen M-R.** 1987 Lipoprotein lipase in hypertriglyceridemias. In: Borensztajn J, ed. *Lipoprotein Lipase.* Evener Publishers, Inc., Chicago:pp 201-228.
4. **Nikkilä EA, Huttunen JK, Ehnholm C.** 1977 Postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase in diabetes mellitus. Relationship to plasma triglyceride metabolism. *Diabetes.* 26:11-21.
5. **Pykalisto OJ, Smith PH, Brunzell JD.** 1975 Determinants of human adipose tissue lipoprotein lipase. Effect of diabetes and obesity on basal- and diet-induced activity. *J Clin Invest.* 56:1108-1117.
6. **Taskinen M-R, Nikkilä EA, Kuusi T, Harno K.** 1982 Lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins in untreated type 2 (insulin-independent) diabetes associated with obesity. *Diabetologia.* 22:46-50.
7. **Farese RV, Jr., Yost TJ, Eckel RH.** 1991 Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism.* 40:214-216.
8. **Sadur CN, Eckel RH.** 1982 Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase. Use of the euglycemic clamp technique. *J Clin Invest.* 69:1119-1125.
9. **Ong JM, Kirchgessner TG, Schotz MC, Kern PA.** 1988 Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem.* 263:12933-12938.
10. **Semenkovich CF, Wims M, Noe L, Etienne J, Chan L.** 1989 Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at post-transcriptional and post-translational levels. *J Biol Chem.* 264:9030-9038.
11. **Yki-Järvinen H, Taskinen MR, Koivisto VA, Nikkila EA.** 1984 Response of adipose tissue lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins to acute hyperinsulinaemia in man. *Diabetologia.* 27:364-369.
12. **Chen Y-DI, Facchini F, Landau C, Hollenbeck CB, Reaven GM.** 1994 Plasma post-heparin lipoprotein lipase activity is decreased in normal individuals who are resistant to insulin-mediated glucose uptake. *Endocrin Metab.* 1:153-158.
13. **Maheux P, Jeppesen J, Azhar S, Chen Y-DI, Reaven GM.** 1997 Relationship between insulin resistance and plasma post-heparin lipoprotein lipase activity and gene expression of adipose tissue lipoprotein lipase. *Diabetologia.* 40:850-858.
14. **Patsch JR, Miesenböck G, Hopferwieser T, et al.** 1992 Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease: Studies in the postprandial state. *Arterioscler Thromb.* 12:1336-1345.
15. **Karpe F, Steiner G, Olivecrona T, Carlson LA, Hamsten A.** 1993 Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins during alimentary lipemia. *J Clin Invest.* 91:748-758.

16. **Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** 1997 Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 20:1183-1197.
17. **Blackburn G, Bistran BR, Maini BS, Schlamm HT, Smith MF.** 1977 Nutritional and metabolic assessment of the hospitalized patient. *JPEN: Journal of Parenteral & Enteral Nutrition.* 1:11-22.
18. **Pape ME, Melchior GW, Marotti KR.** 1991 mRNA quantitation by a simple and sensitive RNase protection assay. *Genet Anal Tech Appl.* 8:206-213.
19. **Chomczynski P, Sacchi N.** 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.
20. **Nilsson-Ehle P, Schotz MC.** 1976 A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* 17:536-541.
21. **Panarotto D, Poisson J, Devroede G, Maheux P.** 2000 Lipoprotein lipase steady-state mRNA are lower in human omental versus subcutaneous abdominal adipose tissue. *Metabolism.* 49:1224-1227.
22. **Belfrage P, Vaughn M.** 1969 Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. *J Lipid Res.* 10:341-344.
23. **Nilsson-Ehle P, Ekman R.** 1977 Rapid, simple and specific assays for lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Artery.* 3:194-209.
24. **Iverius PH, Brunzell JD.** 1985 Human adipose tissue lipoprotein lipase: changes with feeding and relation to postheparin plasma enzyme. *Am J Physiol.* 249:E107-E114.
25. **Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS.** 1972 Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 18:499-502.
26. **Feingold KR, Marshall M, Gulli R, Moser AH, Grunfeld C.** 1994 Effect of endotoxin and cytokines on lipoprotein lipase activity in mice. *Arterioscler Thromb.* 14:1866-1872.
27. **Grunfeld C, Feingold KR.** 1996 Regulation of lipid metabolism by cytokines during host defense. *Nutrition.* 12 (1 suppl):S24-S26.
28. **Ong JM, Kern PA.** 1989 Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J Clin Invest.* 84:305-311.
29. **Taskinen M-R, Nikkilä EA, Nousiainen R, Gordin A.** 1981 Lipoprotein lipase activity in adipose tissue and skeletal muscle of human diabetics during insulin deprivation and restoration. *Scand J Clin Lab Invest.* 41:263-268.
30. **Reaven GM, Chen Y-D, Jeppesen J, Maheux P, Krauss RM.** 1993 Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense low density lipoprotein particles. *J Clin Invest.* 92:141-146.
31. **Laakso M, Sarlund H, Mykkänen L.** 1990 Insulin resistance is associated with lipid and lipoprotein abnormalities in subjects with varying degrees of glucose tolerance. *Arteriosclerosis.* 10:223-231.

DEUXIÈME ARTICLE

Lipoprotein Lipase Steady-State mRNA Levels Are Lower in Human Omental Versus Subcutaneous Abdominal Adipose Tissue

Daniel Panarotto, Jacques Poisson, Ghislain Devroede, and Pierre Maheux

Adipose tissue synthesizes lipoprotein lipase (LPL), which helps in the postprandial clearance of triglyceride-rich lipoproteins. Because visceral adipose tissue is generally accepted as the most important metabolic tissue, we sought to verify whether there are regional differences in the expression of LPL. Samples of adipose tissue from subcutaneous and omental fat deposits were obtained from 20 adults undergoing surgery. Total adipose tissue LPL activity was measured using a conventional radioactive substrate assay. Steady-state levels of LPL mRNA were assessed using the very sensitive RNase protection assay technique with 18S ribosomal RNA as an internal control. A correlation was demonstrated between LPL activity levels in subcutaneous and omental tissue ($r = .72$; $P < .01$) and between mRNA levels at both sites ($r = .47$, $P = .04$). LPL mRNA levels were significantly lower in omental compared with subcutaneous depots (omental v subcutaneous, 1.7 ± 0.7 v 2.1 ± 0.7 arbitrary units [AU] over 18S, $P < .05$). In paired comparisons, LPL mRNA levels in omental adipose tissue were, on average, $20\% \pm 7\%$ (range, -57% to $+9.0\%$) lower than the levels measured in subcutaneous adipose tissue ($P < .05$). In conclusion, these data suggest that subcutaneous adipose tissue is a reliable surrogate of the expression (activity and mRNA) of LPL in omental adipose tissue, even though omental depots express proportionally less LPL than subcutaneous depots.

Copyright © 2000 by W.B. Saunders Company

BECAUSE IT SYNTHESIZES lipoprotein lipase (LPL), adipose tissue is closely linked to the peripheral metabolism of circulating lipoproteins.¹ The anatomic distribution of adipose tissue has attracted much attention during recent years, having been clearly linked to various metabolic markers²⁻⁴ and a disposition to develop coronary artery disease.⁵⁻⁸ These cross-sectional data indicating a link between the accumulation of visceral fat tissue and cardiovascular risk have prompted numerous hypotheses on the physiologic role of this fat depot. Visceral adipose tissue, in comparison to the subcutaneous depot, has been shown to produce more plasminogen activator inhibitor-1,⁹ more uncoupling protein-2,¹⁰ and more type 3 17 β -hydroxysteroid deshydrogenase,¹¹ but less leptin.¹² All of these findings suggest that visceral adipose tissue is uniquely regulated and that it has intrinsic characteristics possibly involved in the pathogenesis of obesity, as well as cardiovascular disease.^{2,8} As a consequence, changes in the visceral expression of LPL could affect both the rate of fat accumulation and the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins.

Studies to ascertain if the expression of LPL is different in omental and subcutaneous adipose tissue have produced inconsistent results.¹²⁻¹⁸ Since adipose tissue LPL plays a pivotal role in lipid metabolism and is a major determinant of the amount of capillary-anchored enzyme available for the clearance of triglyceride-rich lipoproteins,¹⁹ it is highly desirable to define how

LPL is regulated in the two adipose tissue depots. An important corollary of such uncertainty is that while subcutaneous adipose tissue is usually the most accessible fat depot in clinical studies, changes in LPL in that depot might not be representative of events in intraabdominal adipose tissue.

Our study addresses these issues and shows that (1) LPL between omental and subcutaneous adipose tissue is well correlated and (2) there is a significant reduction of LPL expression in intraabdominal adipose tissue.

SUBJECTS AND METHODS

Study Population

Adipose tissue biopsies were obtained from 20 patients (12 men and 8 women) undergoing elective open-abdominal surgery at the Centre universitaire de santé de l'Estrie (Sherbrooke, Quebec, Canada). All patients fasted for at least 6 hours preoperatively. The surgical procedures included 16 laparotomies for bowel disease, 1 for gynecologic disease, 2 for lysis of abdominal adherence, and 1 for insertion of a dialysis catheter. One patient had chronic renal insufficiency. A posteriori, we found that the inclusion of this particular subject did not affect the strength of our analyses; therefore, we decided to leave this patient in the final analysis. All women were postmenopausal, and 5 of the 8 women who participated reported the use of estrogen replacement therapy. Besides this, no patient was using steroids or any medication known to affect LPL or lipid metabolism. The study was approved by the local hospital ethics committee, and all patients provided informed written consent.

Adipose Tissue Sampling

Biopsies of omental and subcutaneous adipose tissue (2 to 3 g each) were collected at the start of surgery. To avoid destruction of tissue and degradation of RNA, cauterization was not used on the biopsy site prior to sampling. After sampling, specimens were immediately frozen on dry ice and stored at -80°C until analysis for steady-state mRNA levels and total LPL tissue activity.

Measurement of Steady-State LPL mRNA Levels

The concentration of human LPL mRNA was determined with a RNase protection assay as described previously.²⁰ Total cellular RNA from adipose tissue samples was isolated using a guanidinium thiocyanate-phenol technique. Briefly, approximately 100 mg adipose tissue was homogenized in 1 mL TRIzol Reagent (GIBCO BRL Life

From the Department of Medicine (Division of Endocrinology and Metabolism) and Research Group on Diabetes and Metabolism, and Department of Surgery (Division of General Surgery), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada.

Submitted November 22, 1999; accepted March 2, 2000.

Supported by the Medical Research Council of Canada and the Canadian Diabetes Association, and in part by the Clinical Research Center of the Centre universitaire de santé de l'Estrie (Sherbrooke) and the Joe Beattie Memorial Fund.

Address reprint requests to Pierre Maheux, MD, Division of Endocrinology and Metabolism, Université de Sherbrooke, 3001, 12^eme Avenue Nord, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4.

Copyright © 2000 by W.B. Saunders Company

0026-0495/00/4909-0023\$10.00/0

doi:10.1053/meta.2000.8624

Technologies, Burlington, Ontario, Canada), and the fatty cake resulting from centrifugation at 4°C and 12,000 × g was discarded before proceeding with the other steps of the procedure. RNA was subsequently hybridized overnight with a molar excess of [³²P]-labeled antisense LPL cRNA transcripts and the housekeeping gene 18S ribosomal cRNA. The mixture was then digested with RNases A and T1, and the protected fragments were separated on a 6% acrylamide urea denaturing gel. After electrophoresis, the gels were quantified using a PhosphorImager system (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). The LPL mRNA content was normalized per unit of 18S ribosomal RNA and expressed as arbitrary units (AU) of 18S ribosomal cRNA.²⁰

Measurement of Total Tissue LPL Activity

The total extractable LPL activity was measured as described previously.²⁰ Briefly, approximately 150 mg frozen adipose tissue was homogenized with a polytron in 300 μL extraction buffer (0.5% deoxycholate, 0.2 mol/L Tris, 0.25 mol/L sucrose, 15% bovine serum albumin, 10 U/mL heparin, and 0.02% Nonidet P-40, pH 8.6) and centrifuged for 15 minutes. Samples of the infranatant below the fatty cake were diluted 1:15 with detergent-free extraction buffer. Aliquots (100 and 150 μL) were then mixed with 150 μL glycerol-stabilized [³H]-triolein substrate containing heated human serum, and the mixture was incubated for 1 hour at 37°C. The results are expressed as micromoles of nonesterified fatty acid released per hour (or unit) per 1 mg frozen adipose tissue.

Statistical Analyses

Data are the mean ± SD unless otherwise indicated. Because of the relatively small sample size, nonparametric tests were used in all analyses unless otherwise indicated. A Wilcoxon signed rank test was used to compare continuous variables on the same individual, and a Mann-Whitney U rank test was used to compare continuous variables between sexes. The Spearman test was used to verify correlations. A P value less than .05 was considered significant. All statistical analyses were performed with the software StatView 5.0 for Windows (SAS Institute, Chicago, IL).

RESULTS

Table 1 shows characteristics of the patients according to gender. No statistically significant differences were apparent

Table 1. Characteristics of the Subjects by Gender

Characteristic	Men	Women	All	P*
No. of subjects	12	8	20	
Age (yr)	58 ± 10	62 ± 9	59 ± 9	NS
BMI (kg/m ²)	27.6 ± 5.6	25.9 ± 6.4	26.9 ± 5.8	NS
Subcutaneous adipose tissue				
Total LPL activity (U/mg)	4.04 ± 0.90	4.67 ± 2.35	4.29 ± 1.61	NS
mRNA level (AU)	2.01 ± 0.65	2.33 ± 0.86	2.14 ± 0.74	NS
Omental adipose tissue				
Total LPL activity (U/mg)	4.34 ± 0.95	4.59 ± 1.63	4.44 ± 1.23	NS
mRNA level (AU)	1.71 ± 0.84	1.71 ± 0.71	1.71 ± 0.77	NS

*Men v women.

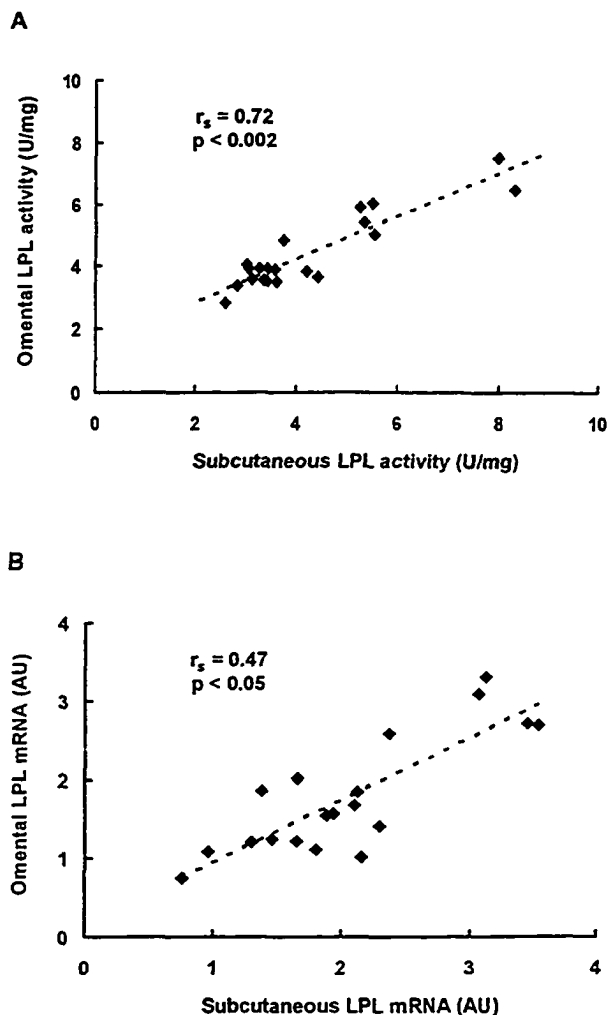


Fig 1. Relationship between total tissue LPL activity (A) and steady-state LPL mRNA concentrations (B) within subcutaneous or omental adipose tissue depots.

between men and women according to age or body mass index (BMI), nor were there any differences in LPL activity or steady-state mRNA between omental and subcutaneous adipose tissue.

LPL activity and steady-state levels of LPL mRNA were well correlated between subcutaneous and omental adipose tissue (Fig 1). The correlation coefficient was .72 and .47 for LPL activity and LPL mRNA levels, respectively. LPL activity was similar in both depots (4.3 ± 1.6 U/mg in subcutaneous tissue v 4.4 ± 1.2 U/mg in omental tissue, P = NS by Mann-Whitney U rank sum test), but mRNA levels were significantly reduced in omental adipose tissue (2.1 ± 0.7 AU) compared with subcutaneous tissue (1.7 ± 0.7 AU, P = .008 by Mann-Whitney U rank sum test) (Fig 2). This difference in LPL mRNA levels was present in both genders (data not shown). However, in this gender-stratified analysis, the statistical significance was lost in men but maintained in women (P = .13 for men and P < .05 for women).

Finally, we explored the relationship between total tissue LPL activity and mRNA levels in both subcutaneous and

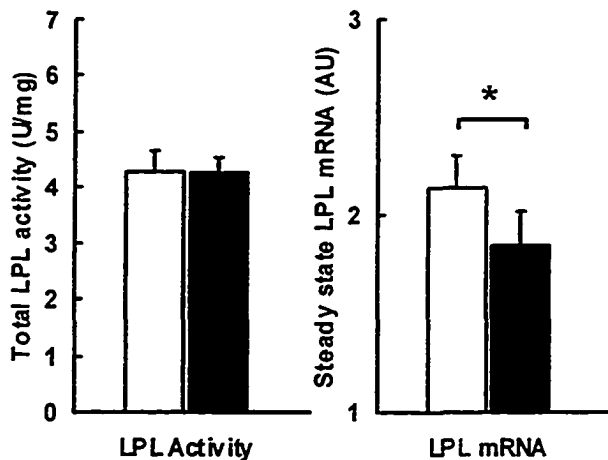


Fig 2. Difference in total tissue LPL activity and steady-state LPL mRNA levels in subcutaneous (□) and omental (■) adipose tissue. * $P = .008$. Error bars are the SEM.

omental adipose tissue. There was no correlation between these variables in either adipose tissue depot ($P > .05$ by Spearman test; data not shown).

DISCUSSION

There have been few published studies on the relationship of variables such as metabolic activity or mRNA levels between the omental and subcutaneous fat depots for the purpose of establishing whether subcutaneous tissue is a dependable surrogate for the less accessible visceral tissue. The fact that subcutaneous adipose tissue is usually not considered as important metabolically as visceral tissue has probably contributed to this situation.²⁻⁴ However, there are indications that some metabolic variables in subcutaneous adipose tissue correlate with plasma lipid and insulin concentrations,²¹ as well as with some variables of visceral obesity as measured by computed tomography.²² Our study supports these data by demonstrating that abdominal subcutaneous adipose tissue expresses LPL and that there are clear correlations for LPL between the subcutaneous and omental fat depots. If we do not take into account the relative volume of both fat depots, it is therefore not excluded that subcutaneous tissue can also theoretically contribute, via its LPL synthesis, to the overall metabolism of lipoproteins.

In this study, total extractable LPL activity did not differ between the two adipose tissue regions, but steady-state LPL mRNA levels were lower in omental versus subcutaneous adipose tissue. While some studies have compared LPL between subcutaneous and omental adipose tissue, the majority have measured either the activity¹⁵⁻¹⁸ or the mRNA level of LPL alone.^{12,14} Only the study by Fried et al¹³ measured both variables in the two adipose tissue regions. However, in this study, adipose tissue from morbidly obese individuals (mean BMI, 48 kg/m²) was placed in organ culture for 7 to 8 days. Under these conditions, there was less LPL mRNA and less LPL activity in response to insulin in omental adipose tissue; the basal LPL activity in each depot was not compared, but was shown to be unchanged in a prior study from the same group.¹⁷ In the other studies that measured LPL activity alone, there was

either higher^{15,16} or lower¹⁸ LPL activity in visceral compared with subcutaneous adipose tissue. The reasons for these discrepancies are not clear, but could be related to the fact that (1) it is sometimes the total extractable or heparin-releasable fraction that is assayed, and (2) LPL activity is expressed using various denominators such as cell surface area or tissue weight. While none of these denominators are perfect, we decided to express our activity data per whole tissue weight unit, the commonest denominator used in the literature. However, we are well aware that omental fat cells of women tend to be smaller and that the LPL activity per cell can actually be lower.¹⁷ This argument would concur with lower levels of LPL mRNA in the omental adipose tissue of women.

Despite the similar LPL activity, we found lower steady-state LPL mRNA levels in omental versus subcutaneous adipose tissue. Two other studies besides the one from Fried et al¹³ have examined this question, but none were able to detect any difference for LPL mRNA levels between visceral and subcutaneous adipose tissue.^{12,14} The reasons for these contrasting results are not clear, but could be due to the fact that mRNA was measured using a semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique that can be less exact under certain circumstances²³ or that the size of their study sample was too small. The fact that Fried et al¹³ found a significant difference with a less sensitive Northern blot analysis suggests that the observed differences might have been underlined by the fact that the study sample included only morbidly obese individuals. Eckel²⁴ had indeed previously shown that the higher the BMI, the higher the adipose tissue activity. It is of interest that in our study and that of Fried et al¹³ the difference in LPL mRNA levels was apparent in women only. The pathophysiologic relevance of such a finding is slightly beyond the scope of this report, but may indicate that visceral adipose tissue LPL in women is less responsive to physiologic stimuli such as insulin and glucocorticoids.

Although LPL mRNA levels were lower in omental adipose tissue, LPL activity was essentially the same at both sites. Furthermore, there was no correlation between total tissue LPL activity and steady-state mRNA levels in either of the adipose tissue depots. Given the variety of opportunities for posttranscriptional regulation of LPL,²⁵⁻²⁸ it is perhaps not surprising that mRNA concentrations have little to do with the total tissue LPL activity.²⁹ Our group²⁰ and others³⁰ have previously reported a similar lack of correlation. We assessed neither the changes in the intracellular partition of LPL nor the exact proportion of active to nonactive LPL molecules in the two fat depots. It remains plausible, therefore, that a reduced transcription of LPL in visceral adipose tissue may result in an altered intracellular partitioning of LPL, as well as changes in active LPL anchored on capillaries in the vicinity of this intraabdominal adipose tissue.

The fact that our study population included subjects from both genders, one patient with renal insufficiency, and some postmenopausal women should not preclude us from generalizing our findings to a larger population. As mentioned earlier, the inclusion of one patient with renal insufficiency did not impact our analyses in any way. More specifically, our sample has

given us the opportunity to study correlations over a 3- to 4-fold range of variation for any of the LPL variables (activity or mRNA). Despite this fact, we were still able to discern clear differences for LPL mRNA between the two fat depots, a finding corroborated by one other group.¹³

In conclusion, our data demonstrate that subcutaneous and omental LPL are positively correlated, and a subcutaneous abdominal fat biopsy can be a reasonably good surrogate for

omental adipose tissue. Alternatively, we have also shown that steady-state mRNA levels for LPL were significantly reduced in omental compared with subcutaneous fat of nondiabetic individuals. The physiologic relevance of this finding in conditions associated with insulin resistance remains to be elucidated, but the regional difference in LPL mRNA abundance indicates that adipose tissue of different depots may not contribute to serum LPL in the same proportion.

REFERENCES

- Zechner R: The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: Implications for energy and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 8:77-88, 1997
- Larsson B, Svärdsudd K, Welin L, et al: 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. *BMJ Clin Res Ed* 288:1401-1404, 1984
- Krotkiewski M, Bjorntorp P, Sjostrom L, et al: Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest* 72:1150-1162, 1983
- Lemieux S, Després JP, Moorjani S, et al: Are gender differences in cardiovascular disease risk factors explained by the level of visceral adipose tissue? *Diabetologia* 37:757-764, 1994
- Gautier JF, Mourier A, Dekerviler E, et al: Evaluation of abdominal fat distribution in noninsulin-dependent diabetes mellitus: Relationship to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1306-1311, 1998
- Peiris AN, Sothmann MS, Hoffmann RG, et al: Adiposity, fat distribution, and cardiovascular risk. *Ann Intern Med* 110:867-872, 1989
- Hartz AJ, Rupley DC, Kalkhoff RD, et al: Relationship of obesity to diabetes: Influence of obesity level and body fat distribution. *Prev Med* 12:351-357, 1983
- Kissebah AH, Krakower GR: Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev* 74:761-811, 1994
- Alessi MC, Peiretti F, Mornge P, et al: Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: Possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. *Diabetes* 46:860-867, 1998
- Oberkofler H, Liu YM, Esterbauer H, et al: Uncoupling protein-2 gene: Reduced mRNA expression in intraperitoneal adipose tissue of obese humans. *Diabetologia* 41:940-946, 1998
- Corbould AM, Judd SJ, Rodgers RJ: Expression of types 1, 2, and 3 17 β -hydroxysteroid deshydrogenase in subcutaneous abdominal and intra-abdominal adipose tissue of women. *J Clin Endocrinol Metab* 83:187-194, 1998
- Montagne CT, Prins JB, Sanders L, et al: Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* 47:1384-1391, 1998
- Fried SK, Russel CD, Grauso NL, et al: Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. *J Clin Invest* 92:2191-2198, 1993
- Lefebvre A-M, Laville M, Vega N, et al: Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 47:98-103, 1998
- Pedersen SB, Jønler M, Richelsen B: Characterization of regional and gender differences in glucocorticoid receptors and lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 78:1354-1359, 1994
- Mårin P, Andersson B, Ottosson M, et al: The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism* 11:1242-1248, 1992
- Fried SK, Kral JG: Sex differences in regional distribution of fat cell size and lipoprotein lipase activity in morbidly obese patients. *Int J Obes* 11:129-140, 1987
- Mauriège P, Marette A, Atgié C, et al: Regional variation in adipose tissue metabolism of severely obese premenopausal women. *J Lipid Res* 36:672-684, 1995
- Taskinen M-R: Lipoprotein lipase. In Borensztajn J (ed): *Lipoprotein Lipase in Hypertriglyceridemias*. Chicago, IL, Evener, 1989, pp 201-228
- Maheux P, Azhar S, Kern PA, et al: Relationship between insulin-mediated glucose disposal and regulation of plasma and adipose tissue lipoprotein lipase. *Diabetologia* 40:850-857, 1997
- Mauriège P, Després JP, Marcotte M, et al: Abdominal fat cell lipolysis, body fat distribution, and metabolic variables in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1028-1035, 1990
- Mauriège P, Brochu M, Prud'homme D, et al: Is visceral adiposity a significant correlate of subcutaneous adipose cell lipolysis in men? *J Clin Endocrinol Metab* 84:736-742, 1999
- Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE: Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *Biotechniques* 26:112-125, 1999
- Eckel RH: Lipoprotein lipase: A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 320:1060-1068, 1989 [published erratum appears in *N Engl J Med* 322:477, 1990]
- Ben-Zeev O, Stahnke G, Liu G, et al: Lipoprotein lipase and hepatic lipase: The role of asparagine-linked glycosylation in the expression of a functional enzyme. *J Lipid Res* 35:1511-1523, 1994
- Obunike J, Sivaram P, Paka L, et al: Lipoprotein lipase degradation by adipocytes: Receptor-associated protein (RAP)-sensitive and proteoglycan-mediated pathways. *J Lipid Res* 37:2439-2449, 1996
- Masuno H, Sakayama K, Okuda H: Effect of long-term treatment of 3T3-L1 adipocytes with chlorate on the synthesis, glycosylation, intracellular transport and secretion of lipoprotein lipase. *Biochem J* 329:461-468, 1998
- Enerbäck S, Gimble JM: Lipoprotein lipase gene expression: Physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochim Biophys Acta* 1169:107-125, 1993
- Braun JE, Severson DL: Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* 287:337-347, 1992
- Ong JM, Kern PA: Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J Clin Invest* 84:305-311, 1989

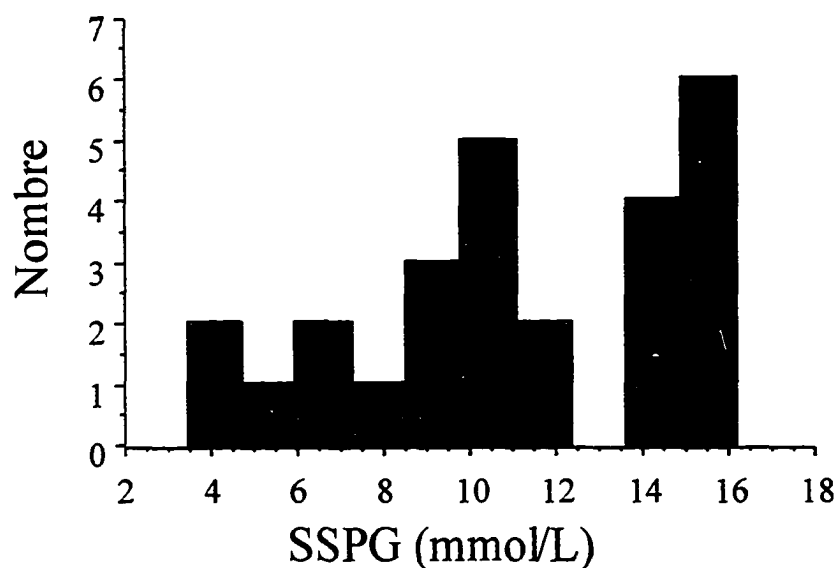
DISCUSSION

Ce doctorat s'est intéressé à la relation entre la résistance à l'insuline et la lipoprotéine lipase adipocytaire dans la période postprandiale. La réponse à notre question de recherche s'est élaborée au travers de deux articles. Dans le premier, nous avons vérifié l'hypothèse principale selon laquelle la résistance à l'insuline est associée à une diminution de l'activité de la LPL dans le tissu adipeux chez des individus en santé en période postprandiale. Nos résultats montrent que le phénomène de résistance à l'insuline est associé à une diminution de la LPL dans le tissu adipeux. La deuxième étude visait à comparer les variables concernant la LPL du tissu adipeux sous-cutané abdominal à celles du tissu viscéral, les anomalies métaboliques attribuées à cette dernière étant classiquement associées avec les maladies cardio-vasculaires. Les données obtenues dans ce dernier travail montrent qu'il existe une corrélation positive entre l'activité et les niveaux d'ARNm de la LPL des tissus sous-cutanés abdominal et viscéral. Pris dans leur ensemble, ces résultats pointent vers la diminution de la LPL du tissu adipeux comme une cause importante de l'hypertriglycémie associée au syndrome de résistance à l'insuline.

Avant d'aborder la discussion des résultats proprement dits, nous considérons important de commenter quelques caractéristiques générales de notre échantillon. Notre population de référence était composée d'environ 600 sujets ayant au moins un facteur de risque pour le diabète. Tous ont passé un test de tolérance au glucose pour dépister la maladie. Plusieurs de ces individus étaient diabétiques de type 2 et intolérants au glucose, deux conditions accompagnées d'une résistance à l'insuline. Afin qu'une corrélation entre résistance à l'insuline et LPL puisse être détectée, il était important que les sujets

sélectionnés aient des valeurs de «*steady-state plasma glucose*» (SSPG)^c situées sur tout le continuum de la variable. Il était aussi important de s'assurer que l'hyperglycémie (à jeun ou postprandiale) ne soit pas une variable confondante. Par conséquent, nous nous sommes assurés d'obtenir un échantillon adéquat en sélectionnant des individus présentant un test de tolérance au glucose normal, lesquels sont moins résistants à l'insuline que les intolérants au glucose et les diabétiques de type 2. Nous pouvons constater, par la Figure 6, que cette stratégie d'échantillonnage nous a permis d'avoir des participants ayant des valeurs de SSPG distribuées sur une large échelle, variant de très sensibles à très résistants à l'insuline.

Figure 6 Distribution du SSPG



^c Le SSPG représente la moyenne des glycémies obtenues durant les 30 dernières minutes du test de suppression à l'insuline. Plus le SSPG est élevé, plus l'individu est considéré résistant à l'insuline.

La définition de résistance à l'insuline est controversée autant sur le plan physiopathologique que sur le plan épidémiologique. Plusieurs tests sont couramment utilisés pour mesurer la résistance à l'insuline mais le clamp euglycémique hyperinsulinémique demeure l'étalon.¹⁸⁵ D'autres méthodes sont le test de tolérance intraveineuse à l'insuline, le « *minimal model* », le modèle HOMA, et le test de suppression à l'insuline.^{185,186} Ce dernier est relativement simple à réaliser, demande moins d'expertise et est moins coûteux que le clamp euglycémique hyperinsulinémique tout en ayant une excellente corrélation avec ce dernier.¹⁸⁷ Pour ces raisons, ce test est largement utilisé pour l'évaluation de la résistance à l'insuline *in vivo* et a été utilisé dans notre étude. En effet, autant le clamp euglycémique hyperinsulinémique et le test de suppression à l'insuline, sont des tests reproductibles, mais ont le désavantage d'être longs à faire et relativement coûteux.¹⁸⁶ D'autres tests, comme le modèle HOMA, sont rapides, peu coûteux, mais leur validité et leur reproductibilité sont relativement discutables.¹⁸⁶ Donc, il n'existe pas de méthode de quantification de la résistance à l'insuline qui soit, en même temps, d'application peu laborieuse, peu coûteuse, rapide et fiable. Pour cette raison, la résistance à l'insuline n'est pas mesurée à large échelle et il manque d'études épidémiologiques pour définir la normalité. Faute d'avoir une meilleure définition, l'approche classique est de classier les individus par la médiane, ou en tertiles et quartiles de la variable qui représente la résistance à l'insuline. Notre étude n'échappe pas à ces contraintes et nous avons utilisé une approche semblable pour classier nos volontaires, c'est à dire que nous les avons séparés selon la médiane du SSPG. Bien que cette définition de résistance à l'insuline soit tout à fait arbitraire, elle n'est pas dépourvue de signification clinique. En effet, lorsque nous évaluons le profil métabolique postprandial de nos volontaires nous constatons qu'ils présentent des anomalies caractéristiques du syndrome métabolique,^{8,39,40,188} telles qu'illustrées dans la figure 1, premier article. Nous pouvons constater que les individus résistants à l'insuline présentent des valeurs plus élevées d'insuline et de triglycérides après un repas. Par ailleurs, leur courbe de glycémie est identique à celle des individus sensibles à l'insuline, ce qui atteste de leur normalité en ce qui concerne

la tolérance au glucose. En outre, nos volontaires étaient des individus avec un âge moyen de 52 ans, avaient un IMC moyen de 28.6 kg /m² et n'étaient pas forcément hyperlipidémiques (tableau 1, premier article).

Ceci dit, nous pouvons passer à la discussion de nos résultats. La majorité des variables impliquées dans les analyses des objectifs de cette thèse ont été mesurées sur une échelle continue. Donc, nous avons vérifié l'association entre elles par des corrélations. Les résultats de ces analyses montrent qu'en général, plus un individu est résistant à l'insuline, plus la LPL adipocytaire est basse. Plus spécifiquement, les taux d'ARNm ainsi que l'activité enzymatique totale et relâchée par l'héparine sont négativement corrélés avec la résistance à l'insuline, mesurée ici avec le test de suppression à l'insuline. Les coefficients de corrélation obtenus par le test de Spearman varient de 0,48 à 0,55 et sont statistiquement significatifs à une valeur $p < 0,02$. D'un point de vue statistique, ces associations ne nous permettent pas d'établir une relation de cause à effet entre les variables étudiées. Cependant, la connaissance de la physiologie de la LPL nous permet d'inférer que c'est la résistance à l'insuline qui influence l'enzyme et non le contraire. Toutefois, il est possible qu'un troisième élément puisse être associé avec chacune des variables impliquées dans la corrélation. À cet égard, il est important de considérer le degré d'obésité, mesuré dans notre étude par l'IMC, comme une variable confondante potentielle. En effet, l'IMC est classiquement corrélé à la fois avec la LPL adipocytaire et la résistance à l'insuline.⁴⁶ Nous avons donc construit un modèle de régression linéaire dans lequel l'inclusion de l'IMC n'a pas influencé la corrélation entre la résistance à l'insuline et les variables enzymatiques adipocytaires (données non montrées). Ces analyses supportent l'hypothèse que la présence d'une résistance à l'insuline provoque une diminution de la quantité de l'enzyme LPL active au niveau de l'adipocyte.

Comme alternative pour les analyses de corrélations, nous avons comparé les moyennes des variables enzymatiques adipocytaires de la LPL entre les individus sensibles et résistants à l'insuline. Pour ce faire, nous avons analysé la résistance à l'insuline comme une variable dichotomique, tout en étant conscients que cette approche statistique est moins puissante que l'analyse corrélationnelle des variables sur une échelle continue. Avec le test de Mann-Whitney, l'activité enzymatique totale, celle relâchée par l'héparine ainsi que les niveaux d'ARNm étaient diminuées chez les individus résistants par rapport aux sensibles à l'insuline. (Figure 4, premier article). Considérant les deux approches utilisées, les résultats globaux de ce premier groupe d'analyses répondent au premier objectif proposé par ce travail et confirment notre hypothèse principale selon laquelle l'adipocyte, en condition de résistance à l'insuline, présente une diminution de l'activité de la LPL en période postprandiale.

Bien que le SSPG soit corrélé avec les taux d'ARNm et l'activité de la LPL, aucune association n'a pu être observée avec la masse immunoréactive tissulaire de la LPL (résultats non montrés). De plus, la masse immunoréactive de LPL dans l'adipocyte n'est corrélée ni avec l'activité de l'enzyme ni avec les taux d'ARNm. Nous envisageons deux possibilités pour expliquer l'absence de ces corrélations. Tout d'abord, il est possible que la traduction des molécules d'ARNm en molécules de LPL ne soit pas uniforme entre les individus entraînant l'absence de corrélation entre les niveaux d'ARNm et la quantité de LPL. Puisque l'augmentation de l'activité de la LPL chez les sujets sensibles à l'insuline ne doit pas passer par la synthèse (manque de corrélation entre résistance à l'insuline et la masse immunoréactive, manque de corrélation entre ARNm et la masse immunoréactive), on peut supposer que le même facteur modulateur (insuline) stimule l'ARNm et l'activité de l'enzyme de façon indépendante de la quantité de protéine dans la cellule. Une deuxième explication est celle liée au fait que l'analyse semi-quantitative de la masse immunoréactive réalisée par la méthode d'immunobuvardage de type Western n'ait pas eu la sensibilité suffisante pour détecter de petites

différences entre les échantillons. En effet, l'utilisation de la technique d'immunobuvardage de type Western n'utilise qu'un seul anticorps spécifique et est plusieurs fois moins sensible qu'un ELISA utilisant deux anticorps dirigés contre des épitopes protéiques distincts. Ce manque de sensibilité aurait pu masquer une corrélation existant entre la quantité de LPL et 1) les niveaux d'ARNm de la LPL ou 2) la résistance à l'insuline.

Par contre, nous avons trouvé une corrélation entre les niveaux d'ARNm et l'activité de la LPL dans l'adipocyte. Plus important, les niveaux d'ARNm corrélaient mieux avec l'activité de la LPL relâchée par l'héparine qu'avec l'activité enzymatique totale. Ces résultats nous suggèrent que dans la période postprandiale, plus les niveaux d'ARNm augmentent plus il y a de l'enzyme active dans l'adipocyte et *vice versa*. Ces données sont intéressantes face à la constatation que la dissociation entre les taux d'ARNm et l'activité enzymatique dans l'adipocyte est une trouvaille constante dans plusieurs études publiées dans la littérature. Il est donc possible que, après un repas, la machinerie intracellulaire agisse en unisson pour maximiser la quantité de LPL active dans le compartiment endothélial, où elle serait disponible pour dégrader les triglycérides des lipoprotéines plasmatiques. Les données discutées dans ce paragraphe répondent au deuxième objectif de cette thèse.

En règle générale, nos données sont corroborées par les résultats d'autres études. Cependant, il faut noter que, chez le rat, l'induction d'une résistance à l'insuline par une diète riche en graisses provoque une augmentation, plutôt qu'une diminution de la LPL adipocytaire.^{189,190} Bien qu'il soit clair que la LPL adipocytaire ne se comporte pas de façon semblable chez le rongeur et chez l'humain, les raisons de cette disparité ne sont pas claires. Boivin *et al.*¹⁹⁰ proposent que les changements morphologiques des adipocytes suite à la prise de poids pourraient expliquer la résistance de la LPL à l'action de l'insuline. Puisque leurs animaux nourris avec une diète riche en graisses n'avaient pas pris plus de

poids que les animaux du groupe témoin, la LPL adipocytaire ne serait pas assujettie aux effets nuisibles de la résistance à l'insuline. Cette hypothèse n'est cependant pas appuyée par les données de Kusunoki *et al.*,¹⁸⁹ dont les rats résistants à l'insuline présentaient une augmentation de la LPL adipocytaire en période postprandiale, ceci malgré un poids élevé par rapport aux animaux témoins. Nos données ne supportent pas cette hypothèse non plus car l'IMC ne modifie pas la relation entre la résistance à l'insuline et la LPL adipocytaire chez nos volontaires. Comme autre alternative, Boivin *et al.*¹⁹⁰ suggèrent que le temps d'exposition à la résistance à l'insuline pourrait déterminer son effet sur la LPL adipocytaire. Il semble également nécessaire de considérer la possibilité que les effets de l'insuline - et de la résistance à l'insuline - chez les rongeurs et l'être humain sont fondamentalement distincts. Les causes de ces différences pour la LPL demeurent cependant un mystère.

Des études chez l'homme montrent des résultats divergents. L'activité de la LPL dans le plasma post-héparine semble être diminuée chez les individus résistants à l'insuline.^{166,167} Par contre, dans plusieurs études, l'activité de l'enzyme dans le tissu adipeux n'était pas corrélée avec la résistance à l'insuline.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Ces études ont cependant été menées chez des individus à jeun, une période caractérisée par un faible taux plasmatique d'insuline. Dans un article de revue, Eckel *et al.*¹⁶⁹ ont compilé les données de plusieurs études pour arriver à la conclusion que plus l'individu est résistant à l'insuline, moins la LPL adipocytaire répond à une stimulation insulinique. Ces données sont également en accord avec les résultats obtenus chez des individus obèses, dont la réponse de la LPL adipocytaire à l'insuline ou à la prise d'un repas est amoindrie, et ce malgré une activité enzymatique accrue à jeun.^{156,157} Récemment, Maheux *et al.*¹¹ ont vérifié les niveaux d'ARNm, la masse protéique et l'activité totale de la LPL adipocytaire chez un groupe de 19 hommes en santé. Dans cette étude, la résistance à l'insuline était inversement corrélée avec les niveaux adipocytaires d'ARNm ($r=-0,68$ $p<0.001$), mais pas avec la masse immunoréactive ni avec l'activité adipocytaire totale de l'enzyme.

L'activité de la LPL relâchée par l'héparine au niveau de l'adipocyte n'a pas été mesurée dans cette étude. Donc, il semble que chez des individus à jeun, la résistance à l'insuline provoque une diminution des ARNm de la LPL dans l'adipocyte mais que cette diminution ne se reflète pas par une moindre activité enzymatique. Il y a donc une dissociation entre la production d'ARNm et la quantité finale d'enzyme active dans l'adipocyte des individus à jeun. Par contre, dans l'état postprandial, il semble y avoir harmonie entre la production d'ARNm et l'activation de l'enzyme. En effet, dans l'état postprandial, la résistance à l'insuline diminue l'ARNm de la LPL dans l'adipocyte, l'activation de l'enzyme et sa translocation vers le compartiment endothélial. De plus, les niveaux d'ARNm et les activités enzymatiques totale et relâchée par l'héparine sont corrélées dans notre étude alors que ces variables ne montraient pas de relation dans l'étude de Maheux *et al.*¹¹ faite à jeun.

Il faut souligner que les volontaires étudiés par Maheux *et al.*¹¹ et les nôtres n'étaient pas tout à fait comparables, bien que nous ne puissions pas déterminer avec précision si les différences sont statistiquement significatives (Tableau 3). En général, nos volontaires semblent être plus obèses, plus hypertriglycéridémiques et plus résistants à l'insuline que ceux étudiés par Maheux *et al.*¹¹ mais nous ne croyons pas que ces différences aient pu influencer la relation entre la résistance à l'insuline et la LPL adipocytaire. Toutefois, la différence majeure entre les deux études concerne à l'inclusion d'individus du sexe féminin. En effet, l'étude de Maheux *et al.*¹¹ n'a évalué que des hommes alors que notre échantillon comportait 46% de femmes. Comme nous discuterons plus tard, quelques corrélations trouvées dans notre étude étaient significatives exclusivement chez les femmes. Ce fait pourrait, théoriquement expliquer les différences entre les deux études concernant la relation entre la résistance à l'insuline et l'activité lipasique adipocytaire.

Tableau 3. Comparaison entre l'étude de Maheux *et al.* et la nôtre.

	Étude de Maheux ¹¹ (n = 19)	Notre étude
Sexe	19 H	14 H / 12 F
Âge (années) *	56 ± 9	52 ± 7
IMC (kg/m ²) *	26,5 ± 3,4	28,6 ± 3,6
Triglycérides (mmol/l) *	1,3 ± 0,6	2,1 ± 1,1
SSPG (mmol/l) *	8,4 ± 4,3	11,6 ± 4,6
Glucose (mmol/l) *	5,3 ± 0,7	5,6 ± 0,7

* Moyenne ± écart-type.

L'interprétation des résultats de notre étude et de celle de Maheux *et al.*¹¹ nous permet d'avancer plusieurs hypothèses sur le mécanisme par lequel la résistance à l'insuline est associée à une diminution de LPL au niveau de l'adipocyte. Dans la période postprandiale, le défaut d'action de l'insuline sur l'adipocyte serait associé avec des niveaux d'équilibre d'ARNm de la LPL plus faibles chez les individus résistants à l'insuline. Nous pouvons envisager deux mécanismes pour expliquer cet effet. Tout d'abord, la résistance à l'insuline peut avoir un effet direct sur le gène de la LPL, inhibant ainsi sa transcription. Alternativement, la présence d'une résistance à l'action de l'insuline pourrait causer une dégradation plus rapide des ARNm de la LPL. Il n'y a malheureusement pas d'éléments dans notre étude permettant de favoriser l'une ou l'autre des ces hypothèses - il s'agit de limites attendues d'études faites chez l'humain. Il faut donc retourner à des données de la littérature animale ou *in vitro* pour appuyer ou non l'un de ces deux concepts. À notre connaissance, deux études ont mesuré directement le taux de transcription du gène de la LPL par l'insuline, et leurs résultats sont concordants: l'insuline ne semble pas avoir d'effet mesurable sur la transcription du gène de la LPL.^{137,139} Par exclusion, on en conclut que l'insuline amène une augmentation des niveaux d'équilibre des ARNm par des modifications post-transcriptionnelles, c'est-à-dire par une stabilisation accrue des

molécules d'ARNm, augmentant ainsi leur demi-vie.¹³⁹ Aucune étude n'a toutefois fourni de preuves directes capables de soutenir cette hypothèse. Curieusement, Semenkovich *et al.*¹³⁷ ont montré que la demi-vie des ARNm de la LPL n'était pas modifiée par l'insuline sur une période de 48 heures. En conclusion, il n'est pas encore possible d'élucider avec certitude les mécanismes par lesquels la résistance à l'insuline mène à une plus faible quantité de molécules d'ARNm de la LPL au niveau de l'adipocyte dans le syndrome de résistance à l'insuline. Il n'en demeure pas moins que, chez l'homme, le phénomène est observé à la fois à jeun¹¹ et en période postprandiale (dans notre étude). De surcroît, nos données suggèrent que ce phénomène est indépendant des niveaux plasmatiques de glucose, puisque notre étude a été faite chez des volontaires humains avec une tolérance au glucose normale. Théoriquement, il est donc possible que la moindre quantité d'ARNm soit causée par un défaut d'action de l'insuline sur l'adipocyte ou par l'hyperinsulinémie ambiante. Cette dernière hypothèse est cependant moins vraisemblable puisque aucune donnée n'a démontré que l'insuline diminuait directement les concentrations d'équilibre d'ARNm de la LPL.

Quelle qu'en soit la cause, il est probable que la différence des niveaux d'équilibre de l'ARNm de la LPL retrouvée entre les individus résistants et sensibles à l'insuline soit durable, puisque leur demi-vie est longue (environ 48 h).¹³⁷ En d'autres mots, si la résistance à l'insuline est associée avec des niveaux d'équilibre d'ARNm plus faibles dans la période postprandiale, il est probable que cet effet soit toujours présent même à jeun, comme dans l'étude de Maheux *et al.*¹¹ Ainsi, même dans la période postprandiale, lorsque les taux plasmatiques d'insuline sont élevés, le défaut de l'action de l'insuline sur l'adipocyte pourrait continuer d'empêcher la maturation et la translocation des molécules de LPL vers le compartiment endothélial. Ce phénomène pourrait être de plus en plus important à mesure que la résistance à l'insuline s'aggrave. Évidemment, lorsque les taux d'insuline sont faibles, comme en période de jeûne, la maturation et la migration de la LPL vers le compartiment endothélial pourrait être

moins efficace et ce, indépendamment des niveaux d'ARNm. Les hypothèses proposées ci-dessus pourraient théoriquement expliquer plusieurs corrélations retrouvées dans notre étude: SSPG vs activité totale de la LPL; SSPG vs activité relâchée par l'héparine; SSPG vs ARNm ; ARNm vs activité de la LPL totale et relâchée par l'héparine.

Même si nous ne l'avons pas décrit dans notre article principal, nous avons réalisé un autre groupe d'analyses concernant la relation entre la LPL adipocytaire et la LPL dans le plasma post-héparine. Classiquement, il est reconnu que les particules riches en triglycérides sont dégradées par les molécules de LPL tapissant la surface endothéliale et dont l'activité peut être mesurée dans le plasma après une injection d'héparine. Il est donc important de savoir quelle est la contribution de la LPL adipocytaire à l'activité mesurée dans le plasma post-héparine (LPL PH). Notre hypothèse à ce sujet était que l'activité de l'enzyme dans l'adipocyte contribuait majoritairement à l'activité de la LPL PH en période postprandiale. Une forte corrélation entre les deux variables devrait donc confirmer notre hypothèse. En effet, la corrélation entre la LPL adipocytaire totale et la LPL du plasma post-héparine était positive et statistiquement significative ($Rho = 0,58$; $p = 0,008$). Toutefois, lorsque nous réalisons une analyse de régression linéaire, nous constatons que la LPL adipocytaire n'explique que 34 % de la variabilité de la LPL PH. Selon ces analyses, la LPL adipocytaire contribue donc de manière significative à la LPL PH. Comme la masse musculaire est quantitativement importante, nous pouvons inférer que le muscle contribue aussi significativement à la LPL PH. Il est possible qu'à l'état postprandial, la LPL adipocytaire augmente et contribue de façon prédominante à la LPL PH. Il nous est malheureusement impossible de confirmer cette hypothèse, la LPL musculaire n'ayant pas été mesurée dans notre étude.

L'objectif ultime dans l'étude de la relation entre résistance à l'insuline et activité de la LPL dans le tissu adipeux est de savoir si ces anomalies ont une répercussion sur le métabolisme des lipides. Le

troisième objectif de cette thèse était donc de vérifier la relation entre les triglycérides plasmatiques et la variable LPL sous ses différentes formes. Les résultats de notre dernière série d'analyses montrent que les triglycérides postprandiaux, tels que mesurés par la surface sous la courbe des triglycérides après un repas, présentent une corrélation négative avec toutes les variables enzymatiques adipocytaires, hormis la masse immunoréactive. (Figure 2, premier article) Parmi toutes ces corrélations, la relation entre l'activité totale de la LPL adipocytaire et les triglycérides postprandiaux est la plus forte ($Rho = 0,70$; $p < 0,0001$). Il faut remarquer que l'activité adipocytaire totale de la LPL est reliée de façon indépendante aux triglycérides plasmatiques même lorsque nous tenons compte des variables confondantes comme la résistance à l'insuline, le sexe, et l'IMC ou le poids. Ces résultats montrent que la LPL adipocytaire est un déterminant majeur de la concentration plasmatique de triglycérides et répondent au troisième objectif spécifique proposé dans cette thèse.

Comment la LPL adipocytaire peut donc contribuer à la dégradation des triglycérides plasmatiques si elle n'explique, dans les faits, que 34% de la variation de la LPL relâchée dans le plasma par l'héparine? Notre hypothèse, à cet effet, est que l'insuline favorise spécifiquement l'action de la LPL accrochée à l'arbre vasculaire aux abords du tissu adipeux et que son effet dans d'autres organes serait minime dans la période postprandiale. Cette hypothèse est très excitante face à la découverte récente que l'insuline agit spécifiquement sur les cellules endothéliales présentes dans le tissu adipeux pour provoquer la relâche d'une substance qui favorise la sécrétion des molécules de LPL par l'adipocyte.⁹⁵ Cet effet s'ajouterait ainsi à d'autres actions connues de l'insuline sur la LPL adipocytaire comme l'augmentation des ARNm, la synthèse, la maturation et la sécrétion. Les effets globaux de l'insuline sur la LPL adipocytaire permettraient donc aux triglycérides d'être préférentiellement entreposés dans le tissu adipeux en période postprandiale.

Bien que non incluses dans notre premier article, certaines analyses de nos données ont été répétées en considérant le fait que nos volontaires incluaient des hommes et des femmes. Nous avons été surpris de constater que plusieurs corrélations, significatives chez les femmes, disparaissaient complètement chez les hommes (Tableau 4). Quelques exemples de ces corrélations sont les suivants: entre l'ARNm de la LPL et l'activité totale de la LPL dans l'adipocyte; l'activité totale de la LPL dans l'adipocyte et l'activité de la LPL dans le plasma post-héparine; les triglycérides postprandiaux et, d'une part les variables adipocytaires de la LPL (ARNm, activité totale et relâchée par l'héparine), d'autre part l'activité de la LPL dans le plasma post-héparine. Nous pourrions, par exemple, interpréter la meilleure corrélation entre les ARNm et l'activité tissulaire chez la femme comme une maturation plus efficace des molécules de LPL dans le tissu adipeux. Alternativement, l'enzyme produite dans les adipocytes des femmes semble en meilleur lien avec la LPL plasmatique post-héparine (corrélation LPL adipocytaire vs LPL PH). Finalement, chez les femmes, la LPL semble être plus efficace pour dégrader les triglycérides plasmatiques dans la période postprandiale comme la corrélation entre LPL PH ou LPL adipocytaire totale et les triglycérides postprandiaux était plus forte que chez les hommes.

Nous sommes conscients que notre étude n'a pas été conçue pour vérifier des différences éventuelles entre les sexes et que les données dérivées *a posteriori* de ces analyses doivent être interprétées avec précaution. Il n'en demeure pas moins que ces résultats sont intéressants et suggèrent que la modulation de la LPL pourrait être distincte chez les femmes et chez les hommes.

Il est bien connu que l'activité de la LPL dans les différents dépôts graisseux diffère entre les hommes et les femmes.¹⁷⁹ Toutefois, très peu d'études ont évalué les mécanismes spécifiques de cette divergence. À notre connaissance, aucune étude n'a exploré le type de différence entre les sexes observée dans notre article. Les mécanismes impliqués dans cette modulation de la LPL spécifique au

sexe ne sont pas clairs. Nous pouvons néanmoins tenter d'avancer que les femmes tireraient peut-être un avantage d'un point de vue évolutif à manipuler adéquatement les réserves de graisses, puisque cette précieuse source d'énergie est essentielle à la fertilité, la grossesse et l'allaitement. La dichotomie de la modulation de la LPL entre les sexes pourraient contribuer théoriquement aux différences du profil lipidique entre les hommes et les femmes pré-menopausées.

Ces données renforcent l'idée que le comportement du tissu adipeux est physiologiquement distinct entre les sexes. En effet, la leptine, une protéine produite par les adipocytes et impliquée dans la modulation de l'appétit, est trois fois plus élevée chez les femmes que chez les hommes. De plus, nous avons démontré récemment que cette protéine est diminuée chez des individus ayant une anomalie du métabolisme du glucose, et ce exclusivement chez les femmes (annexe).

Tableau 4. Corrélations ayant un résultat différent dépendamment du sexe.

	ARNm (UA)		LPL PH (U/ml)		SSC-TG	
	F	M	F	M	F	M
LPL-A totale (U/g)	0,89***	0,01	0,83**	0,07	-0,82**	-0,50
LPL-A RH (U/g)	0,60*	0,61*	0,58	0,01	-0,58*	-0,24
LPL PH (U/ml)	0,86**	0,05	-	-	-0,76*	-0,33
ARNm (UA)	-	-	0,86**	0,05	-0,81**	-0,08

LPL-A: lipoprotéine lipase adipocytaire; RH: relâchée par l'héparine; PH: post-héparine

Rho de Spearman. *p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,0005

Notre première étude a démontré que la LPL adipocytaire est diminuée en cas de résistance à l'insuline et suggère que cette anomalie soit partiellement responsable de l'hypertriglycémie postprandiale

chez ces individus. Cette conclusion dérive de données obtenues par une biopsie de tissu adipeux prélevée dans la région sous-cutanée abdominale. L'étude idéale serait celle qui permettrait d'évaluer la physiologie de la LPL dans tous les dépôts de tissu adipeux chez l'humain. Ceci est impraticable dans une étude comme la nôtre, dont les tests métaboliques exigent déjà beaucoup de disponibilité et de motivation de la part du groupe de volontaires de recherche. Notre choix de nous limiter qu'au tissu adipeux sous-cutané abdominal repose cependant sur deux prémisses :

1. Plusieurs études suggèrent que le tissu adipeux sous-cutané abdominal a une forte activité LPL, autant chez les hommes,¹⁸⁰ que chez les femmes.¹⁷⁹⁻¹⁸¹ Il appert donc que l'activité LPL dans la région abdominale contribue de façon significative à l'activité LPL globale de tout l'organisme.
2. L'accumulation de graisses dans le tissu adipeux abdominal, telle que représentée par le tour de taille ou par le rapport taille/hanche, est associée à plusieurs anomalies métaboliques et à un risque augmenté de maladies cardio-vasculaires. Il est donc possible que les adipocytes de cette région aient des caractéristiques spécifiques prédisposant à l'athérosclérose. Les associations trouvées entre facteurs de risque cardio-vasculaires et tour de taille sont, par contre, expliquées le plus souvent par la forte corrélation existant entre ce dernier et la quantité de graisse viscérale, évaluée par tomographie axiale. L'accumulation de tissu adipeux dans l'abdomen est, en effet, associée avec plusieurs facteurs de risque pour les maladies cardio-vasculaires¹⁸⁻²¹ et ces associations sont indépendantes et plus fortes que celles obtenues avec le tour de taille ou le rapport taille/hanche. Pour ces raisons, l'emmagasinage de tissu adipeux viscéral est aujourd'hui reconnu comme étant responsable de plusieurs facteurs de risque cardio-vasculaires.^{17,177} Donc, les altérations éventuelles de la LPL dans le tissu adipeux sous-cutané abdominal auraient un impact physiologique encore plus prononcé si elles reflétaient les événements observés dans le tissu adipeux viscéral.

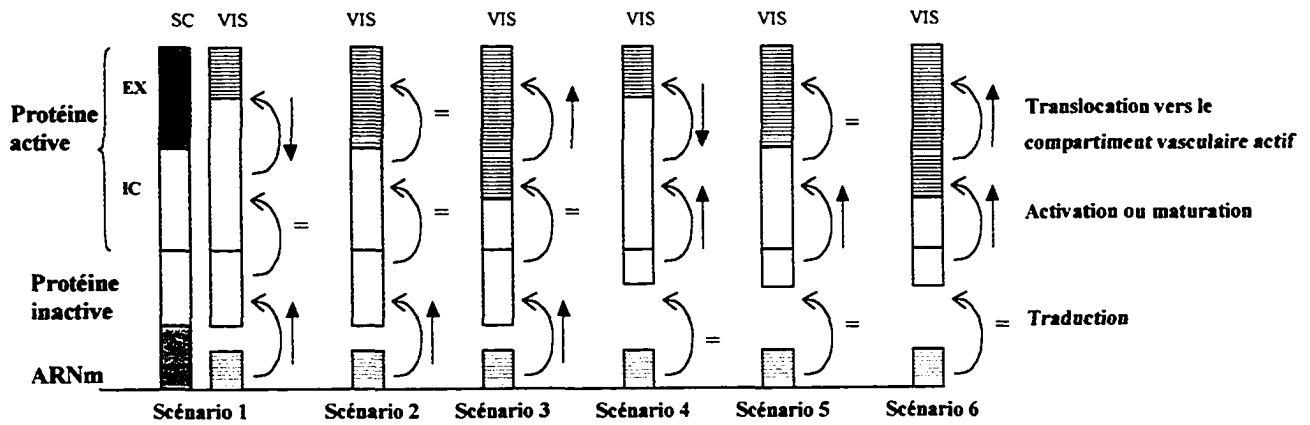
Nous avons décidé de mener une étude pour mieux comprendre les liens entre le dépôt de graisse viscéral et celui sous-cutané abdominal. La population ciblée par cette étude incluait des individus subissant une intervention chirurgicale abdominale pour des maladies non infectieuses. Nous avons obtenu des données sur 20 patients, 12 hommes et 8 femmes, âgés de 59 ans en moyenne et ayant un IMC moyen de 27 kg/m². Nous avons mesuré l'activité et les niveaux d'ARNm de la LPL dans deux échantillons de tissu adipeux prélevés 1) dans la région abdominale sous-cutanée, la localisation étant similaire à celle utilisée dans notre premier article, et, 2) dans une biopsie de tissu adipeux provenant de la région viscérale.

Nous avons fait deux types d'analyse avec les données obtenues: des corrélations et des moyennes. La comparaison des moyennes montre que, malgré une moindre quantité d'ARNm, le tissu adipeux viscéral présente des niveaux d'ARNm et une activité LPL bien corrélés à ceux du tissu abdominal sous-cutané. Ces données suggèrent que l'ARNm de la LPL est produit en moindre quantité (ou est plus dégradé) dans le tissu viscéral. Comme l'activité lipasique tissulaire totale était identique dans les deux dépôts, il est possible que la traduction de la LPL en molécules d'enzyme active est plus efficace dans le tissu viscéral que dans le tissu abdominal sous-cutané. Ces données suggèrent donc que des facteurs modulateurs auraient un effet distinct sur le processus de production de la LPL dans le tissu adipeux viscéral. Il est connu que les niveaux d'enzyme active dans l'adipocyte peuvent être modulés de façon transcriptionnelle et post-transcriptionnelle.^{48,136,137,140-144} D'ailleurs, cette divergence entre les niveaux d'ARNm et l'activité enzymatique a été rapportée dans plusieurs études.^{11,124,137} De plus, face aux particularités des adipocytes du tissu viscéral,¹³⁻¹⁷ il ne serait pas surprenant que la LPL y soit modulée très différemment. Comme nous n'avons mesuré ni la quantité de protéine ni l'activité de la

LPL dans le compartiment fonctionnel, nous ne pouvons pas estimer quel mécanisme exact est à l'origine de cette dissociation pour l'ARNm et l'activité de la LPL entre les deux dépôts tissulaires.

Nous pouvons envisager en principe plusieurs scénarios en relation avec les données de ce deuxième article, tels qu'illustrés dans la Figure 7. Dans tous les cas, il faut prendre en compte que la traduction et/ou la maturation/activation de la LPL sont probablement plus efficaces dans le tissu adipeux viscéral comme une activité lipasique semblable de l'enzyme a été retrouvée dans ce tissu face à des niveaux d'ARNm diminués. Il est possible que l'enzyme active soit distribuée de façon différentielle entre le compartiment intracellulaire et le compartiment endothélial dans les deux dépôts étudiés. Ainsi, la LPL endothéliale peut être diminuée, semblable ou augmentée dans le tissu adipeux viscéral comparé au tissu adipeux sous-cutané. Nous considérons que toutes les possibilités sont concevables, mais les données de notre étude ne nous permettent pas d'avoir un indice permettant de privilégier l'une d'entre elles puisque nous n'avons mesuré que la LPL tissulaire totale.

Figure 7. Scénarios possibles pour la modulation post-transcriptionnelle de la lipoprotéine lipase dans deux dépôts adipeux différents.



EX = extracellulaire ou relâchable par l'héparine
 IC = intracellulaire
 SC = tissu adipeux sous-cutané
 VIS = tissu adipeux viscéral

L'objectif principal de l'étude était de vérifier dans quelle mesure l'activité et les niveaux d'ARNm de la LPL dans le tissu adipeux sous-cutané étaient corrélés avec ces mêmes variables dans le tissu adipeux viscéral. Pour l'ARNm de la LPL, la corrélation était de 0,42 ($p = 0,03$) selon le test de Spearman, ce qui dénote une corrélation modérées entre les deux tissus par rapport à cette variable. Par contre, la corrélation pour l'activité de la LPL a été 0,72 ($p < 0,0001$). Par ailleurs, en effectuant une régression linéaire, on se rend compte que l'activité LPL dans le tissu adipeux sous-cutané explique à 83% de la variabilité de l'activité LPL dans le tissu viscéral. Quelle que soit l'analyse utilisée, ces résultats confirment notre hypothèse suggérant que l'activité de la LPL mesurée dans le tissu sous-cutané abdominal est un excellent reflet de celle du tissu viscéral.

Signalons que, dans les dernières décades, les recherches se sont concentrées sur le tissu adipeux viscéral, considéré depuis comme nuisible à la santé, et l'importance du tissu sous-cutané a été reléguée à un deuxième rang. Cependant, le tissu adipeux sous-cutané abdominal pourrait théoriquement avoir aussi un rôle important dans le métabolisme des lipoprotéines. En effet, quelques études montrent que la quantité de graisse entreposée dans le tissu sous-cutané peut être un déterminant des lipides et des taux d'insuline plasmatiques.¹⁹¹ Nous croyons qu'une éventuelle altération de la LPL dans le tissu adipeux sous-cutané pourrait avoir une répercussion importante dans le métabolisme des lipoprotéines. Cette hypothèse est appuyée, d'une part, par le fait que le volume du dépôt sous-cutané est proportionnellement beaucoup plus grand que celui du tissu viscéral (80% vs 20% respectivement)¹⁷ et, d'autre part, par les données de notre deuxième étude, qui montrent une excellente corrélation pour les variables concernant la LPL entre les deux dépôts graisseux.

Nous avons également répété ces analyses en divisant l'échantillon par sexe. Ces analyses ont révélé des résultats intéressants. Notamment, les niveaux plus bas d'ARNm dans le tissu adipeux viscéral sont

observés exclusivement chez les femmes. La diminution de l'ARNm dans le tissu adipeux viscéral chez les femmes pourrait se traduire par une moindre migration de la LPL active vers le compartiment endothélial (Figure 7 - scénarios 1 et 4). Cette hypothèse est envisageable puisque la corrélation entre les niveaux d'ARNm et la LPL relâchée par l'héparine chez les femmes dans notre première étude a été de $Rho = 0,60$ ($p = 0,03$). Cette hypothèse est très attrayante car une éventuelle diminution de l'activité LPL dans le tissu adipeux viscéral chez les femmes pourrait expliquer leur tendance à accumuler moins de graisses dans cette région.¹⁹² Il appert que cette différence entre les sexes pourrait être attribuée à une diminution de la puissance statistique due à la stratification de l'échantillon. Toutefois, les résultats du premier article de cette thèse suggèrent que ces observations découlent d'une vraie différence biologique entre les sexes. Les niveaux d'activité et d'ARNm de la LPL ont déjà été rapportés comme étant différents dans plusieurs régions de dépôt de tissu adipeux entre les hommes et les femmes,¹⁷⁹⁻¹⁸¹ et il est donc possible que ces différences soient responsables du patron distinct pour la distribution des graisses corporelles entre les deux sexes.

D'une façon générale, les sujets de cette deuxième étude étaient plus âgés et leur poids était légèrement moins élevé que ceux de notre étude principale, tel qu'indiqué dans le Tableau 5. Par contre, la proportion d'hommes et de femmes dans les deux échantillons n'était pas différente d'un point de vue statistique.

Bien que les échantillons des deux études soient relativement comparables, cette deuxième étude présente plusieurs différences comparées à celles présentées dans notre premier article. Premièrement, notre première étude comptait seulement des individus non-diabétiques.

Tableau 5. Comparaison de l'échantillon dans nos deux études.

	Premier article (n = 26)	Deuxième article (n = 20)	Valeur P
Sexe	14 H/12 F	12 H/8 F	0,679 **
Âge (années) *	52,0 ± 7,1	59,8 ± 9,9	0,003 §
Poids (kg) *	79,4 ± 12,4	72,1 ± 17,0	0,051 §
Poids (kg) *	79,4 ± 12,4	72,1 ± 17,0	0,051 §
IMC (kg/m ²) *	28,6 ± 3,6	27,0 ± 5,9	0,046 §
IMC (kg/m ²) *	28,6 ± 3,6	27,0 ± 5,9	0,046 §

* Moyenne ± écart-type.

** Selon le test du Chi carré.

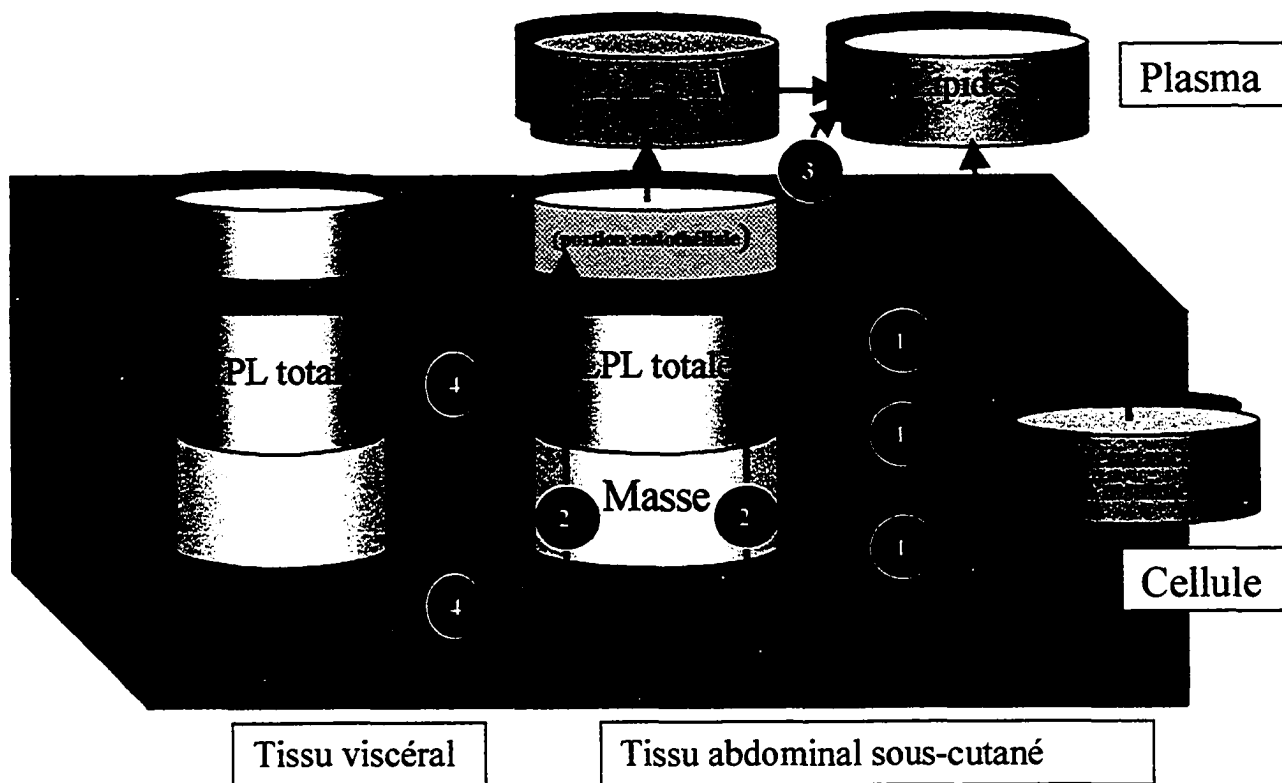
§ Selon le test de Mann-Whitney.

Bien que ces individus aient eu au moins un facteur de risque pour le diabète, ils ne possédaient effectivement aucune maladie détectable par un examen physique et des analyses de laboratoire de routine. Par contre, les participants de la deuxième étude avaient un ou des problèmes de santé. Tous étaient certainement stressés et on peut supposer que leurs niveaux d'adrénaline et de glucocorticoïdes étaient plus élevés que chez les individus en santé considérés dans notre premier article. Certains de ces éléments pourraient affecter spécifiquement la LPL dans un des deux dépôts plutôt que dans l'autre et diminuer la force d'une éventuelle corrélation. D'ailleurs, un effet différentiel des glucocorticoïdes sur l'activité de la LPL dans les adipocytes sous-cutanés et viscéraux en culture a été démontré.¹⁸² Évidemment, nous ne pouvons pas savoir, par cette étude, si la résistance à l'insuline a une action différentielle dans un ou l'autre tissu. Cela demeure possible puisque l'hormone semble avoir une action plus importante dans le tissu adipeux sous-cutané.¹⁸²

Considérant tous les facteurs confondants potentiels, nous estimons que la corrélation de 0,72 entre l'activité de la LPL dans les deux dépôts étudiés est très satisfaisante. Nous pouvons prévoir que cette corrélation serait encore plus importante dans une population très sélectionnée et donc plus homogène, par exemple celle de notre première étude. Les résultats obtenus lors de cette étude nous assurent donc que les biopsies faites dans le tissu adipeux abdominal sous-cutané fournissent des informations représentatives du comportement de la LPL dans la graisse viscérale. Ces données répondent ainsi au quatrième objectif spécifique de cette thèse.

À ce point, nous jugeons opportun de faire un bref rappel des objectifs, résultats et conclusions de notre étude (Figure 8). Notre objectif général était de vérifier les liens éventuels entre la résistance à l'insuline et la lipoprotéine lipase dans la période postprandiale chez un groupe de volontaires non-diabétiques. Plus spécifiquement, nous avons démontré que une corrélation entre la résistance à l'insuline et, d'une part les niveaux d'équilibre d'ARNm de la LPL, et d'autre part, l'activité enzymatique (objectif 1). Notre interprétation de ces résultats est que la résistance à l'insuline mène simultanément à une diminution des ARNm de la LPL et de la maturation de l'enzyme. L'effet de la résistance à l'insuline sur ces deux variables explique la corrélation entre les niveaux d'équilibre d'ARNm et l'activité lipasique tissulaire (objectif 2). Comme attendu, plus l'activité de la LPL adipocytaire est basse, plus les taux plasmatiques des triglycérides sont élevés (objectif 3). Il est intéressant de noter que la LPL adipocytaire est un déterminant plus important des triglycérides que la LPL vasculaire post-héparine. Finalement, l'activité et les niveaux d'équilibre des ARNm de la LPL dans le tissu sous-cutané sont corrélés avec les mêmes variables dans le tissu viscéral (objectif 4). Ces résultats suggèrent que l'hypertriglycéridémie postprandiale, présente dans le syndrome de résistance à l'insuline, est en partie occasionnée par une diminution de la LPL adipocytaire.

Figure 8. Schéma montrant les principales corrélations décrites dans notre étude



➡ Corrélations trouvées dans l'étude; ❶ numéro des objectifs.

FORCES ET LIMITES DE L'ETUDE

FORCES

- La principale force de notre thèse repose sur l'étude d'individus après un repas. L'étude de la relation entre la résistance à l'insuline et la LPL adipocytaire en période postprandiale est l'un des aspects originaux les plus importants de notre étude. Notre étude gagne du crédit face au rôle pivot de la LPL dans l'hypertriglycémie postprandiale, cette dernière étant de plus en plus reconnue comme facteur un de risque cardio-vasculaire.
- La mesure des niveaux d'ARNm, de la masse protéique, et des activités totale et relâchée par l'héparine de la LPL dans l'adipocyte nous a permis non seulement de savoir que la résistance à l'insuline affecte la LPL adipocytaire mais aussi de définir le niveau intracellulaire touché par ce défaut.
- Nous avons étudié le tissu adipeux abdominal alors que la majorité des autres études se sont concentrées sur le tissu adipeux périphérique. Nous estimons que le site de prélèvement du tissu adipeux choisi dans notre étude est représentatif des altérations physiopathologiques susceptibles de se manifester chez l'individu sain ou malade. Nous avons aussi eu la chance de mener une étude dans laquelle nous avons montré que l'activité et les niveaux d'ARNm étaient corrélés entre la graisse abdominale sous-cutanée et la graisse viscérale. Ces données renforcent le choix du site de prélèvement du tissu adipeux dans notre étude principale.

- Comme notre étude était composée d'hommes et de femmes, nous avons pu explorer des différences au niveau de la physiologie de la LPL entre les deux sexes. Les résultats de cette sous-analyse ne sont pas définitifs mais soulèvent des hypothèses intéressantes et ouvrent la porte à d'autres initiatives de recherche.
- La grande majorité des études traitant de la problématique étudiée dans cette thèse ont été faites chez des rongeurs ou avec des cellules en culture. Bien que ce genre d'études permette une grande flexibilité de manipulation des conditions expérimentales, son extrapolation à l'être humain peut toujours être mise en doute. Notre étude élimine ce problème puisqu'elle a été menée chez l'être humain. En conséquence, nos résultats ont un impact direct sur la connaissance de la physiologie humaine.

LIMITES

L'exécution d'une étude chez l'homme est sans doute une force de notre étude, mais est également à l'origine de quelques limites.

- Les participants de notre étude ont consenti volontairement à au moins 4 visites, quelques-unes pouvant avoir une durée de six heures. Les tests effectués comprenaient des infusions de médicaments et une biopsie de tissu adipeux. Bien que ces tests ne représentent qu'un risque très minime pour l'intégrité des participants, ils étaient sans doute assez invasifs. La première difficulté de notre étude a été donc de recruter des volontaires, tâche évitable dans le cas d'une étude sur les animaux. Cette difficulté a limité le nombre de participants et, par conséquent, la puissance de

certaines analyses, surtout lorsque des sous-groupes de sujets ont été comparés. Nous sommes conscients que certains résultats négatifs de notre étude pourraient être dus à la petite taille de notre échantillon. Cependant, ce facteur ne nous a pas empêché de répondre à notre question de recherche principale et n'a pas nuit à la validité de l'étude.

- Il s'est avéré impossible de proposer aux volontaires des interventions qui leur auraient demandé encore plus de temps et d'inconvénients que ceux déjà inhérents à notre projet. Autrement, nous aurions pu, par exemple, faire plusieurs biopsies de tissu adipeux: avant, pendant et après le repas test. Cette procédure nous aurait permis de suivre l'évolution de nos variables au cours du repas test. Nous avons choisi de réaliser le prélèvement 4 h après le début du repas puisque certaines études suggèrent que la stimulation maximale de la LPL par l'insuline a lieu après cet intervalle de temps. Cependant, il est probable que les différentes variables adipocytaires mesurées (activité, quantité de protéine et ARNm) aient une cinétique variée suite à la stimulation par l'insuline et le repas. Toutefois, l'observation de la courbe d'insulinémie durant le repas suggère que la stimulation du tissu adipeux par l'hormone a été adéquate. Nous avons administré deux repas aux volontaires: le premier au temps 0 et le deuxième au temps 120 minutes. Nous pouvons observer à la figure 1 de notre premier article que la hausse de l'insuline survient après chaque repas et que le dernier pic d'augmentation est observé au temps 180 minutes, soit une heure avant le prélèvement du tissu adipeux. Donc, nous pouvons supposer que la stimulation des variables enzymatiques dans le tissu adipeux par l'insuline était optimale, voire peut-être maximale, dans cette période.
- Comme dans toute étude transversale, les corrélations ont constitué le principal outil statistique employé. Typiquement, ce genre d'analyse ne permet pas d'établir une relation de cause à effet entre les variables étudiées. Nous avons inféré le sens des corrélations en nous appuyant sur des

bases solides de connaissance de la physiologie apportées par les études antérieures. De plus, des analyses de régression linéaire nous ont permis de connaître l'effet des variables confondantes potentielles sur les corrélations étudiées. Nous croyons donc que ces arguments nous permettent d'établir avec un degré de certitude acceptable la relation de causalité entre les variables étudiées dans notre thèse.

- Nous n'avons pas mesuré la LPL dans le tissu musculaire au cours de notre étude. Évidemment, la connaissance du comportement de la LPL musculaire avant et après un repas, conjointement avec les données obtenues grâce à la biopsie de tissu adipeux, nous aurait fourni des informations précieuses sur la contribution respective de chaque tissu à la LPL post-héparine. Cependant, pour les raisons décrites précédemment, il était virtuellement impossible pour les volontaires de se soumettre à cette intervention. L'absence de cette information est néanmoins secondaire pour répondre à notre question de recherche principale. Nous croyons que cette question pourrait faire l'objet d'une étude future.

AVANCEMENT DES CONNAISSANCES APPORTE PAR CETTE ETUDE

L'idée que la diminution de la LPL en période postprandiale est responsable de l'hypertriglycéridémie observée lors de la résistance à l'insuline était répandue, mais aucune étude ne l'avait prouvée auparavant. Les données générées par notre étude n'ont pas de répercussions immédiates sur le changement de la pratique médicale courante. Cependant, les connaissances qu'elle apporte peuvent permettre de mieux comprendre la dyslipidémie associée à la résistance à l'insuline, une condition rencontrée quotidiennement par le clinicien. Par exemple, une nouvelle classe de médicaments utilisés pour traiter le diabète, appelés les thiazolidinediones, ont des effets connus sur les lipides plasmatiques. Le principal mécanisme d'action de ces médicaments est de réduire la résistance à l'insuline au niveau de l'adipocyte. Face aux informations découlant de cette étude, il devient très attirant de proposer que l'un des mécanismes par lesquels ces médicaments affectent les lipides plasmatiques touche une activation plus efficace de la LPL adipocytaire.

En outre, les données de notre étude renforcent également l'idée que la période postprandiale est un moment au cours de laquelle les altérations du métabolisme lipidique peuvent avoir une répercussion très importante en ce qui concerne la genèse de l'athérosclérose. Cette hypothèse est très en vogue et des études sont actuellement en cours pour établir le rôle des triglycérides postprandiaux dans les maladies cardio-vasculaires.

HYPOTHESES DECOULANT DE CE TRAVAIL ET PERSPECTIVES D'AVENIR

La LPL est une enzyme dont l'action aboutit à deux sortes de conséquences distinctes. En premier lieu, elle permet aux tissus d'utiliser ou d'emmagasiner les acides gras transportés par les lipoprotéines plasmatiques. En deuxième lieu, elle transforme les lipoprotéines riches en triglycérides. Comme il existe une interdépendance entre toutes les lipoprotéines plasmatiques, l'action de la LPL touche le métabolisme des lipides en général.

La LPL contrôle l'entrée d'acides gras dans l'adipocyte. Une diminution de la LPL chez les individus résistants à l'insuline pourrait constituer un mécanisme modulateur pour empêcher l'accumulation de graisses. D'ailleurs, chez certains groupes d'individus obèses qui perdent du poids, l'amélioration de la résistance à l'insuline est associée avec une augmentation de la LPL adipocytaire, corroborant ainsi le rôle de la LPL comme «porte d'entrée» des lipides dans le tissu adipeux.

Notre étude soulève l'hypothèse que des différences de modulation de la LPL entre hommes et femmes pourraient expliquer la différence du profil lipidique ou de la distribution graisseuse entre les sexes. Cette question de recherche est importante et mérite des études plus approfondies.

La voie de signalisation intracellulaire par laquelle l'insuline mène ses actions sur la LPL adipocytaire est très peu connue. Cette avenue de recherche est très excitante face aux données démontrant que la résistance à l'insuline pourrait avoir une spécificité intracellulaire.

La contribution spécifique de chaque tissu à la LPL plasmatique relâchée par l'héparine mérite également d'être explorée davantage. Notre étude démontre que la LPL adipocytaire est un déterminant

majeur des niveaux de triglycérides postprandiaux mais le rôle de la LPL musculaire reste à être évalué.

La LPL a aussi un rôle dans la captation de particules chylomicrons résiduelles par le foie ainsi que pour la captation de lipoprotéines dans la paroi endothéliale. La diminution de la LPL adipocytaire en conditions de résistance à l'insuline démontrée dans notre étude aurait-t-elle une implication pour ces fonctions accessoires de l'enzyme? La réponse à ces questions demande à être éclaircie.

CONCLUSION GENERALE

La résistance à l'insuline est une anomalie fréquente dans la population générale et des études récentes suggèrent qu'elle est un facteur de risque pour les maladies cardio-vasculaires. La dyslipidémie contribue certainement aux effets néfastes de la résistance à l'insuline sur le système cardio-vasculaire. Les résultats de nos études suggèrent que la diminution de l'activité LPL adipocytaire en période postprandiale est un déterminant important de l'hypertriglycéridémie associée au syndrome de résistance à l'insuline. La diminution de la dégradation des triglycérides par la LPL assume une importance majeure si l'on considère l'hypothèse actuelle selon laquelle l'hypertriglycéridémie postprandiale est impliquée dans la genèse de l'athérosclérose.

REFERENCES

1. Bourdelais P. L'homme nouveau du XX^e siècle. *L'Histoire* 226, 46-55 (1998).
2. Blair SN, Kampert JB, Kohl HW, 3rd, Barlow CE, Macera CA, Paffenbarger RS, Jr. & Gibbons LW. Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. *JAMA* 276, 205-210 (1996).
3. Paffenbarger RS, Jr., Hyde RT, Wing AL & Hsieh CC. Physical activity, all-cause mortality, and longevity of college alumni. *N. Engl. J. Med.* 314, 605-613 (1986).
4. Kato H, Tillotson J, Nichaman MZ, Rhoads GG & Hamilton HB. Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California. *Am. J. Epidemiol.* 97, 372-385 (1973).
5. Marmot MG, Syme SL, Kagan A, Kato H, Cohen JB & Belsky J. Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California: prevalence of coronary and hypertensive heart disease and associated risk factors. *Am. J. Epidemiol.* 102, 514-525 (1975).
6. Dawber TR, Meadors GF & Moore FEJ. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am. J. Public Health* 4, 279-286 (1951).
7. Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. Summary of the second report of the national cholesterol education program (NCEP). Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel II). *J. Am. Med. Assoc.* 269, 3015-3023 (1993).
8. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595-1607 (1988).

9. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ & Despres JP. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* **95**, 69-75 (1997).
10. Lamarche B, Tchernof A, Mauriege P, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ & Despres JP. Fasting insulin and apolipoprotein B levels and low-density lipoprotein particle size as risk factors for ischemic heart disease. *JAMA* **279**, 1955-1961 (1998).
11. Maheux P, Jeppesen J, Azhar S, Chen Y-DI & Reaven GM. Relationship between insulin resistance and plasma post-heparin lipoprotein lipase activity and gene expression of adipose tissue lipoprotein lipase. *Diabetologia* **40**, 850-858 (1997).
12. Flier JS. The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway? *Cell* **80**, 15-18 (1995).
13. Alessi MC, Peiretti F, Morange P, Henry M, Nalbone G & Juhan-Vague I. Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: Possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. *Diabetes* **46**, 860-867 (1998).
14. Corbould AM, Judd SJ & Rodgers RJ. Expression of types 1, 2, and 3 17 β -hydroxysteroid deshydrogenase in subcutaneous abdominal and intra-abdominal adipose tissue of women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 187-194 (1998).
15. Oberkofler H, Liu YM, Esterbauer H, Hell E, Krempler F & Patsch W. Uncoupling protein-2 gene: reduced mRNA expression in intraperitoneal adipose tissue of obese humans. *Diabetologia* **41**, 940-946 (1998).
16. Montagne CT, Prins JB, Sanders L, Zhang J, Sewter CP, Digby J, Byrne CD & O'Rahilly S. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* **47**, 1384-1391 (1998).

17. Mårin P, Andersson B, Ottosson M, Olbe L, Chowdhury B, Kvist H, Holm G, Sjöström L & Björntorp P. The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism* **11**, 1242-1248 (1992).
18. Gautier JF, Mourier A, Dekerviler E, Tarentola A, Bigard AX, Villette JM, Guezennec CY & Cathelineau G. Evaluation of abdominal fat distribution in noninsulin-dependent diabetes mellitus: relationship to insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 1306-1311 (1998).
19. Peiris AN, Sothmann MS, Hoffmann RG, Hennes MI, Wilson CR, Gustafson AB & Kissebah AH. Adiposity, fat distribution, and cardiovascular risk. *Ann. Intern. Med.* **110**, 867-872 (1989).
20. Hartz AJ, Rupley DC, Kalkhoff RD & Rimm AA. Relationship of obesity to diabetes: influence of obesity level and body fat distribution. *Prev. Med.* **12**, 351-357 (1983).
21. Kissebah AH & Krakower GR. Regional adiposity and morbidity. *Physiol. Rev.* **74**, 761-811 (1994).
22. Fontbonne A, Charles MA, Thibault N, Richard JL, Claude JR, Warnet JM, Rosselin GE & Eschwège E. Hyperinsulinaemia as a predictor of coronary heart disease mortality in a healthy population: the Paris Prospective Study, 15-year follow-up. *Diabetologia* **34**, 356-361 (1991).
23. Després J-P, Lamarche B, Mauriège P, Cantin B, Dagenais GR, Moorjani S & Lupien P-J. Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N. Engl. J. Med.* **334**, 952-957 (1996).
24. Ducimetière P, Eschwège E, Papoz L, Richard JL, Claude JR & Rosselin G. Relationship of plasma insulin levels to the incidence of myocardial infarction and coronary heart disease mortality in a middle-aged population. *Diabetologia* **19**, 205-210 (1980).
25. White MR & Kahn CR. The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* **269**, 1-4 (1994).
26. Shepherd PR & Kahn BB. Glucose transporters and insulin action. Implications for Insulin Resistance and Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* **341**, 248-257 (1999).

27. Kahn BB. Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J. Clin. Invest.* **89**, 1367-1374 (1992).
28. Zierath JR, He L, Guma A, Odegaard Wahlstrom E, Klip A & Wallberg-Henriksson H. Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia* **39**, 1180-1189 (1996).
29. Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ & Dohm GL. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J. Clin. Invest.* **95**, 2195-2204 (1995).
30. Bjornholm M, Kawano Y, Lehtihet M & Zierath JR. Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. *Diabetes* **46**, 524-527 (1997).
31. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y & Satoh S. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* **372**, 182-186 (1994).
32. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, 3rd, Johnson RS & Kahn CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* **372**, 186-190 (1994).
33. Ahmad F, Azevedo JL, Cortright R, Dohm GL & Goldstein BJ. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J. Clin. Invest.* **100**, 449-458 (1997).
34. Condorelli G, Vigliotta G, Iavarone C, Caruso M, Tocchetti CG, Andreozzi F, Cafieri A, Tecce MF, Formisano P, Beguinot L & Beguinot F. PED/PEA-15 gene controls glucose transport and is overexpressed in type 2 diabetes mellitus. *EMBO J.* **17**, 3858-3866 (1998).

35. Golay A, Chen Y-DI & Reaven GM. Effect of differences in glucose tolerance on insulin's ability to regulate carbohydrate and free fatty acid metabolism in obese individuals. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **62**, 1081-1088 (1986).
36. Hollenbeck CB & Reaven GM. Variations in insulin-stimulated glucose uptake in healthy individuals with normal glucose tolerance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **64**, 1169-1173 (1987).
37. Facchini FS, Hollenbeck CB, Jeppesen J, Chen Y-DI & Reaven GM. Insulin resistance and cigarette smoking. *Lancet* **339**, 1128-1130 (1992). [Erratum published in *Lancet* **339**:1492, 1992.].
38. Ferrannini E, Buzzigolo G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Brandi L & Bevilacqua R. Insulin resistance in essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* **317**, 350-357 (1987).
39. Laakso M, Sarlund H & Mykkänen L. Insulin resistance is associated with lipid and lipoprotein abnormalities in subjects with varying degrees of glucose tolerance. *Arteriosclerosis* **10**, 223-231 (1990).
40. Laws A & Reaven GM. Evidence for an independent relationship between insulin resistance and fasting plasma HDL-cholesterol, triglyceride and insulin concentrations. *J. Intern. Med.* **231**, 25-30 (1992).
41. Reaven GM, Chen Y-D, Jeppesen J, Maheux P & Krauss RM. Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense low density lipoprotein particles. *J. Clin. Invest.* **92**, 141-146 (1993).
42. Botker HE, Moller N, Ovesen P, Mengel A, Schmitz O, Orskov H & Bagger JP. Insulin resistance in microvascular angina (Syndrome X). *Lancet* **342**, 136-140 (1993).

43. Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K & Laakso M. Cardiovascular risk factors clustering with endogenous hyperinsulinaemia predict death from coronary heart disease in patients with Type II diabetes. *Diabetologia* **43**, 148-155 (2000).
44. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **27**, 503-519 (1998).
45. Hayden MR, Vergani C, Humphries SE, Kirby L, Shukin R & McLeod R. The genetics and molecular biology of apolipoprotein CII. *Advances in Experimental Medicine & Biology* **201**, 241-251 (1986).
46. Eckel RH. Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1060-1068 (1989). [Erratum published in *N Engl J Med* **322**:477, 1990].
47. Bergö M, Olivecrona G & Olivecrona T. Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *Biochem. J.* **313**, 893-898 (1996).
48. Enerbäck S & Gimble JM. Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at transcriptional and post-transcriptional level. *Biochim. Biophys. Acta* **1169**, 107-125 (1993).
49. Krauss RM. Atherogenicity of triglyceride-rich lipoproteins. *Am. J. Cardiol.* **81**, 13B-17B (1998).
50. Caslake MJ, Packard CJ, Series JJ, Yip B, Dagen MM & Shepherd J. Plasma triglyceride and low density lipoprotein metabolism. *Eur. J. Clin. Invest.* **22**, 96-104 (1992).
51. Kleinman Y, Eisenberg S, Oschry Y, Gavish D, Stein O & Stein Y. Defective metabolism of hypertriglyceridemic low density lipoprotein in cultured human skin fibroblasts. *J. Clin. Invest.* **75**, 1796-1803 (1985).
52. Steinberg D. Low-density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* **272**, 20963-20966 (1997).

53. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ & Hayden MR. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* **22**, 336-345 (1999).
54. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ & Schmitz G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.* **22**, 347-351 (1999).
55. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P & Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet.* **22**, 352-355 (1999).
56. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH & Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **271**, 518-520 (1996).
57. Combettes-Souverain M, Milliat F, Sérougne C, Férézou J & Lutton C. SR-BI et métabolisme du cholestérol. *Médecine/Sciences* **15**, 1252-1258 (1999).
58. Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Lipid Res.* **34**, 1255-1274 (1993).
59. Brinton EA, Eisenberg S & Breslow JL. Increased apo A-I and apo A-II fractional catabolic rate in patients with low high density lipoprotein-cholesterol levels with or without hypertriglyceridemia. *J. Clin. Invest.* **87**, 536-544 (1991).
60. Zilversmit DB. Atherogenesis: A postprandial phenomenon. *Circulation* **60**, 473-485 (1979).
61. Zilversmit DB. Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clin. Chem.* **41**, 153-158 (1995).

62. Xiang SQ, Cianflone K, Kalant D & Sniderman AD. Differential binding of triglyceride-rich lipoproteins to lipoprotein lipase. *J. Lipid Res.* **40**, 1655-1662 (1999).
63. Grundy SM & Mok HY. Chylomicron clearance in normal and hyperlipidemic man. *Metabolism: Clinical & Experimental* **25**, 1225-1239 (1976).
64. Lewis GF & Steiner G. Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin-resistant state. *Diabetes Care* **19**, 390-393 (1996).
65. Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Weller B & Steiner G. Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. *J. Clin. Invest.* **95**, 158-166 (1995).
66. Sparks JD & Sparks CE. Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion. *Biochim. Biophys. Acta* **1215**, 9-32 (1994).
67. Malmstrom R, Packard CJ, Watson TD, Rannikko S, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Jarvinen H, Shepherd J & Taskinen MR. Metabolic basis of hypotriglyceridemic effects of insulin in normal men. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* **17**, 1454-1464 (1997).
68. Malmstrom R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Jarvinen H, Shepherd J & Taskinen MR. Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia* **40**, 454-462 (1997).
69. Taghibiglou C, Carpentier A, Van Iderstine SC, Chen B, Rudy D, Aiton A, Lewis GF & Adeli K. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance - Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular apoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J. Biol. Chem.* **275**, 8416-8425 (2000).
70. Coppack SW, Jensen MD & Miles JM. In vivo regulation of lipolysis in humans. *J. Lipid Res.* **35**, 177-193 (1994).

71. Durrington PN. Triglycerides are more important in atherosclerosis than epidemiology has suggested. *Atherosclerosis* **141 Suppl 1**, S57-S62 (1998).
72. Hokanson JE & Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J. Cardiovasc. Risk* **3**, 213-219 (1996).
73. Patsch JR, Miesenböck G, Hopferwieser T, Mühlberger V, Knapp E, Dunn JK, Gotto AM, Jr. & Patsch W. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease: Studies in the postprandial state. *Arterioscler. Thromb.* **12**, 1336-1345 (1992).
74. Ryu JE, Howard G, Craven TE, Bond MG, Hagaman AP & Crouse JR. Postprandial triglyceridemia and carotid atherosclerosis in middle-aged subjects. *Stroke* **23**, 823-828 (1992).
75. Maranhão RC, Feres MC, Martins TM, Mesquita CH, Toffoletto O, Vinagre CGC, Gianinni SD & Pileggi F. Plasma kinetics of a chylomicron-like emulsion in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* **126**, 15-25 (1996).
76. Karpe F, Hellénus M-L & Hamsten A. Differences in postprandial concentrations of very-low-density lipoprotein and chylomicron remnants between normotriglyceridemic and hypertriglyceridemic men with and without coronary heart disease. *Metabolism* **48**, 301-307 (1999).
77. Karpe F. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J. Intern. Med.* **246**, 341-355 (1999).
78. Hahn PF. Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin. *Science* **98**, 19-20 (1943).
79. Anderson NG & Fawcett B. An antichylomicronemic substance produced by heparin injection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **74**, 768-771 (1950).

80. Korn ED. Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase. I. Isolation and characterization of the enzyme from normal rat heart. *J. Biol. Chem.* **245**, 1-14 (1955).
81. Korn ED. Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase. II. Substrate specificity and activation of coconut oil. *J. Biol. Chem.* **245**, 15-26 (1955).
82. Ranganathan G, Ong JM, Yukht A, saghizadeh M, Simsolo RB, Pauer A & Kern PA. Tissue-specific expression of human lipoprotein lipase. Effect of the 3'-untranslated region on translation. *J. Biol. Chem.* **270**, 7149-7155 (1995).
83. Briquet-Laugier V, Ben-Zeev O, White A & Doolittle MH. cld and lec23 are disparate mutations that affect maturation of lipoprotein lipase in the endoplasmic reticulum. *J. Lipid Res.* **40**, 2044-2058 (1999).
84. Ong JM & Kern PA. The role of glucose and glycosylation in the regulation of lipoprotein lipase synthesis and secretion in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **264**, 3177-3182 (1989).
85. Ben-Zeev O, Stahnke G, Liu G, Davis RC & Doolittle MH. Lipoprotein lipase and hepatic lipase; the role of asparagine-linked glycosylation in the expression of a functional enzyme. *J. Lipid Res.* **35**, 1511-1523 (1994).
86. Hill JS, Yang D, Nikazy J, Curtiss LK, Sparrow JT & Wong H. Subdomain chimeras of hepatic lipase and lipoprotein lipase. Localization of heparin an cofactor binding. *J. Biol. Chem.* **273**, 30979-30984 (1998).
87. Murthy V, Julien P & Gagne C. Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. *Pharmacol. Ther.* **70**, 101-135 (1996).
88. Salinelli S, Lo J-Y, Mims MP, Zsigmond E, Smith LC & Chan L. Structure-function relationship of lipoprotein lipase-mediated enhancement of very low density lipoprotein binding and catabolism by the low density lipoprotein receptor. Functional importance of a properly folded surface loop covering the catalytic center. *J. Biol. Chem.* **271**, 21906-21913 (1996).

89. Nykjaer A, Nielsen M, Lookene A, Meyer N, Roigaard H, Etzerodt M, Beisiegel U, Olivecrona G & Gliemann J. A Carboxyl-Terminal Fragment of Lipoprotein Lipase Binds to the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and Inhibits Lipase-Mediated Uptake of Lipoprotein in Cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 31747-31755 (1994).
90. Dugi KA, Dichek HL, Talley GD, Brewer HB, Jr. & Santamarina-Fojo S. Human lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates. *J. Biol. Chem.* **267**, 25086-25091 (1992).
91. Dugi KA, Dichek HL & Santamarina-Fojo S. Human hepatic and lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **270**, 25396-25401 (1995).
92. Chang SF, Reich B, Brunzell JD & Will H. Detailed characterization of the binding site of the lipoprotein lipase-specific monoclonal antibody 5D2. *J. Lipid Res.* **39**, 2350-2359 (1998).
93. Braun JEA & Severson DL. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem. J.* **287**, 337-347 (1992).
94. Semb H & Olivecrona T. Mechanisms for turnover of lipoprotein lipase in guinea pig adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **921**, 104-115 (1987).
95. Knutson VP. The release of lipoprotein lipase from 3T3-L1 adipocytes is regulated by microvessel endothelial cells in an insulin-dependent manner. *Endocrinology* **141**, 693-701 (2000).
96. Masuno H, Sakayama K & Okuda H. Effect of long-term treatment of 3T3-L1 adipocytes with chlorate on the synthesis, glycosylation, intracellular transport and secretion of lipoprotein lipase. *Biochem. J.* **329**, 461-468 (1998).
97. Low MG. Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins. *FASEB J.* **3**, 1600-1608 (1989).

98. Czajek-Shaul T, Halimi O, Ben-Naim M, Stein O & Stein Y. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C releases lipoprotein lipase from the heparin releasable pool in rat heart cell cultures. *Biochim Biophys Acta* **1014**, 178-183 (1989).
99. Chan BL, Lisanti MP, Rodriguez-Boulan E & Seltiel AR. Insulin-stimulated release of lipoprotein lipase by metabolism of its phosphatidylinositol anchor. *Science* **241**, 1670-1672 (1988).
100. Obunike JC, Sivaram P, Paka L, Low MG & Goldberg IJ. Lipoprotein lipase degradation by adipocytes: receptor-associated protein (RAP)-sensitive and proteoglycan-mediated pathways. *J. Lipid Res.* **37**, 2439-2449 (1996).
101. Saxena U, Witte LD & Goldberg IJ. Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids. *J. Biol. Chem.* **264**, 4349-4355 (1989).
102. Amri EZ, Teboul L, Vannier C, Grimaldi PA & Ailhaud G. Fatty Acids Regulate the Expression of Lipoprotein Lipase Gene and Activity in Preadipose and Adipose Cells. *Biochem. J.* **314**, 541-546 (1996).
103. Saxena U, Klein MG & Goldberg IJ. Metabolism of endothelial cell-bound lipoprotein lipase. Evidence for heparan sulfate proteoglycan-mediated internalization and recycling. *J. Biol. Chem.* **265**, 12880-12886 (1990).
104. Fredenrich A. Role of apolipoprotein CIII in triglyceride-rich lipoprotein metabolism [Review]. *Diabetes Metab.* **24**, 490-495 (1998).
105. Strickland DK, Zounnas MZ & Argraves WS. LDL receptor-related protein : a multiligand receptor for lipoprotein and proteinase catabolism. *FASEB J.* **9**, 890-898 (1995).
106. Mahley RW & Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism : key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Lipid Res.* **40**, 1-16 (1999).

107. Williams SE, Inoue I, Tran H, Fry GL, Pladet MW, Iverius P-H, Lalouel J-M, Chappell DA & Strickland DK. The carboxyl-terminal domain of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor (LRP) and mediates binding of normal very low density lipoproteins to LRP. *J. Biol. Chem.* **269**, 8653-8658 (1994).
108. Krapp A, Zhang H, Ginzinger D, Liu M-S, Lindberg A, Olivecrona G, Hayden MR & Beisiegel U. Structural features in lipoprotein lipase necessary for the mediation of lipoprotein uptake into cells. *J. Lipid Res.* **36**, 2362-2373 (1995).
109. Nykjaer A, Bengtsson-Olivecrona G, Lookene A, Moestrup SK, Petersen CM, Weber W, Beisiegel U & Gliemann J. The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds lipoprotein lipase and beta-migrating very low density lipoprotein associated with the lipase. *J. Biol. Chem.* **268**, 15048-15055 (1993).
110. Osborne JC, Bengtsson-Olivecrona G, Lee NS & Olivecrona T. Studies on inactivation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry* **24**, 5606-5611 (1985).
111. Eisenberg S, Sehakey E, Olivecrona T & Vlodavsky I. Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J. Clin. Invest.* **90**, 2013-2021 (1992).
112. Rutledge JC, Woo MM, Rezai AA, Curtiss LK & Goldberg IJ. Lipoprotein lipase increases lipoprotein binding to the artery wall and increases endothelial layer permeability by formation of lipolysis products. *Circ. Res.* **80**, 819-828 (1997).
113. Howard EH, Kastelein JJP, Zwinderman AH, Gagné E, Jukema JW, Reymer PWA, Groenemeyer BE, Lie KI BA, Hayden MR & Jansen H. Lipoprotein lipase activity is decreased in a large cohort of patients with coronary artery disease and is associated with changes in lipids and lipoproteins. *J. Lipid Res.* **40**, 735-743 (1999).

114. Deshaies Y. Plasma lipoprotein cholesterol and triglycerides and lipoprotein lipase activity in epididymal white adipose tissue of rats fed high sucrose or high corn oil diets. *Can J Physiol Pharmacol* **64**, 885-891 (1985).
115. Nilsson-Ehle P, Carlström S & Belfrage P. Rapid effects on lipoprotein lipase activity in adipose tissue of humans after carbohydrate and lipid intake. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **35**, 373-378 (1975).
116. Pykalisto OJ, Smith PH & Brunzell JD. Determinants of human adipose tissue lipoprotein lipase. Effect of diabetes and obesity on basal- and diet-induced activity. *J. Clin. Invest.* **56**, 1108-1117 (1975).
117. Lithell H, Boberg J, Hellsing K, Lundqvist G & Vessby B. Lipoprotein-lipase activity in human skeletal muscle and adipose tissue in the fasting and the fed states. *Atherosclerosis* **30**, 89-94 (1978).
118. Sadur CN, Yost TJ & Eckel RH. Fat feeding decreases insulin responsiveness of adipose tissue lipoprotein lipase. *Metabolism* **33**, 1043-1047 (1984).
119. Groot PHE, deBoer BCJ, Haddeman E, Houtsmuller UMT & Hulsmann WC. Effect of dietary fat composition on the metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins in the postprandial phase in meal-fed rats. *J. Lipid Res.* **29**, 541-551 (1988).
120. Murphy MC, Zampelas A, Puddicombe SM, Furlonger NP, Morgan LM & Williams CM. Pretranslational regulation of the expression of the lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) gene by dietary fatty acids in the rat. *Br. J. Nutr.* **70**, 727-736 (1993).
121. Semb H & Olivecrona T. Two different mechanisms are involved in nutritional regulation of lipoprotein lipase in guinea-pig adipose tissue. *Biochem. J.* **262**, 505-511 (1989).
122. Doolittle MH, Ben-Zeev O, Elovson J, Martin D & Kirchgessner TG. The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. *J. Biol. Chem.* **265**, 4570-4577 (1990).

123. Olivecrona T, Bergö M, Hultin M & Olivecrona G. Nutritional regulation of lipoprotein lipase. *Can. J. Cardiol.* **11(suppl G)**, 73G-78G (1995).
124. Ong JM & Kern PA. Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **84**, 305-311 (1989).
125. Picard F, Naïmi N, Richard D & Deshaies Y. Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes* **48**, 452-459 (1999).
126. Taskinen M-R & Nikkilä EA. Lipoprotein lipase activity of adipose tissue and skeletal muscle in insulin-deficient human diabetes. Relation to high-density and very-low-density lipoproteins and response to treatment. *Diabetologia* **17**, 351-356 (1979).
127. Nikkilä EA, Huttunen JK & Ehnholm C. Postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase in diabetes mellitus. Relationship to plasma triglyceride metabolism. *Diabetes* **26**, 11-21 (1977).
128. Taskinen M-R, Nikkilä EA, Kuusi T & Harno K. Lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins in untreated type 2 (insulin-independent) diabetes associated with obesity. *Diabetologia* **22**, 46-50 (1982).
129. Pfeifer MA, Brunzell JD, Best JD, Judzewitsch RG, Halter JB & Porte D, Jr. The response of plasma triglyceride, cholesterol, and lipoprotein lipase to treatment in non-insulin-dependent diabetic subjects without familial hypertriglyceridemia. *Diabetes* **32**, 525-531 (1983).
130. Taylor KG, Galton DJ & Holdsworth G. Insulin-independent diabetes: a defect in the activity of lipoprotein lipase in adipose tissue. *Diabetologia* **16**, 313-317 (1979).
131. Yost TJ, Froyd KK, Jensen DR & Eckel RH. Change in skeletal muscle lipoprotein lipase activity in response to insulin/glucose in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* **44**, 786-790 (1995).

132. Taskinen M-R, Nikkilä EA, Nousiainen R & Gordin A. Lipoprotein lipase activity in adipose tissue and skeletal muscle of human diabetics during insulin deprivation and restoration. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **41**, 263-268 (1981).
133. Terrettaz J, Cusin I, Etienne J & Jeanrenaud B. In vivo regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in normal rats made hyperinsulinemic and in hyperinsulinemic genetically-obese (*fa/fa*) rats. *Int. J. Obes.* **18**, 9-15 (1994).
134. Tavangar K, Murata Y, Pedersen ME, Goers JF, Hoffman AR & Kraemer FB. Regulation of lipoprotein lipase in the diabetic rat. *J. Clin. Invest.* **90**, 1672-1678 (1992).
135. Simsolo RB, Ong JM, Bahman S & Kern PA. Effect of improved diabetes control on the expression of lipoprotein lipase in human adipose tissue. *J. Lipid Res.* **33**, 89-95 (1992).
136. Ong JM, Kirchgessner TG, Schotz MC & Kern PA. Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **263**, 12933-12938 (1988).
137. Semenkovich CF, Wims M, Noe L, Etienne J & Chan L. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at post-transcriptional and post-translational levels. *J. Biol. Chem.* **264**, 9030-9038 (1989).
138. Previato L, Parrott CL, Santamarina-Fojo S & Brewer HB, Jr. Transcriptional regulation of the human lipoprotein lipase gene in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 18958-18963 (1991).
139. Raynolds MV, Awald P, Gordon DF, Gutierrez-Hartmann A, Rule DC, Wood WM & Eckel RH. Lipoprotein lipase gene expression in rat adipocytes is regulated by isoproterenol and insulin through different mechanisms. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1416-1422 (1990).
140. Speake BK, Parkinson C & Robinson DS. The effect of insulin on the synthesis of lipoprotein lipase in rat adipose tissue. *Horm. Metab. Res.* **17**, 637-640 (1985).

141. Vydelingum N, Drake RL, Etienne J & Kissebah AH. Insulin regulation of fat cell ribosomes, protein synthesis, and lipoprotein lipase. *Am. J. Physiol.* **8**, E121-E131 (1983).
142. Eckel RH, Prasad JE, Kern PA & Marshall S. Insulin regulation of lipoprotein lipase in cultured isolated rat adipocytes. *Endocrinology* **114**, 1665-1671 (1984).
143. Spooner PM, Chernick SS, Garrison MM & Scow RO. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity and release in 3T3-L1 adipocytes. Separation and dependence of hormonal effects on hexose metabolism and synthesis of RNA and protein. *J. Biol. Chem.* **254**, 10021-10029 (1979).
144. Kern PA, Marshall S & Eckel RH. Regulation of lipoprotein lipase in primary cultures of isolated human adipocytes. *J. Clin. Invest.* **75**, 199-208 (1985).
145. Yki-Järvinen H, Taskinen MR, Koivisto VA & Nikkila EA. Response of adipose tissue lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins to acute hyperinsulinaemia in man. *Diabetologia* **27**, 364-369 (1984).
146. Farese RV, Jr., Yost TJ & Eckel RH. Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism* **40**, 214-216 (1991).
147. Sadur CN & Eckel RH. Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase. Use of the euglycemic clamp technique. *J. Clin. Invest.* **69**, 1119-1125 (1982).
148. Patten RL. The reciprocal regulation of lipoprotein lipase activity and hormone-sensitive lipase activity in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **245**, 5577-5584 (1970).
149. Desai K & Hollenberg CH. Regulation, by insulin, of lipoprotein lipase and phosphodiesterase activities in rat adipose tissue. *Isr. J. Med. Sci.* **2**, 540-550 (1975).
150. Vydelingum N, Kissebah AH & Wynn V. The role of calcium in insulin action. V. Importance of cyclic guanosine 3':5' monophosphate and calcium ions in insulin stimulation of lipoprotein lipase activity and protein synthesis in adipose tissue. *Horm. Metab. Res.* **10**, 38-46 (1978).

151. Bourdeaux A-M, Giudicelli Y, Rebourcet M-C, Nordmann J & Nordmann R. Evidence against the involvement of cyclic GMP in the insulin-stimulation of lipoprotein lipase activity in fat cells. *Experientia* **36**, 913-914 (1980).
152. Kraemer FB, Takeda D, Natsu V & Sztalryd C. Insulin regulates lipoprotein lipase activity in rat adipose cells via wortmannin- and rapamycin-sensitive pathways. *Metabolism* **47**, 555-559 (1998).
153. Ranganathan G, Kaakaji R & Kern PA. Role of protein kinase C in the translational regulation of lipoprotein lipase in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 9122-9127 (1999).
154. Sadur CN, Yost TJ & Eckel RH. Insulin responsiveness of adipose tissue lipoprotein lipase is delayed but preserved in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **59**, 1176-1182 (1984).
155. Taskinen M-R & Nikkilä EA. Lipoprotein lipase activity in adipose tissue and in postheparin plasma in human obesity. *Acta Med. Scand.* **202**, 399-408 (1977).
156. Nilsson-Ehle P. Impaired regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in obesity. *Int. J. Obes.* **5**, 695-699 (1981).
157. Eckel RH & Yost TJ. Weight reduction increases adipose tissue lipoprotein lipase responsiveness in obese women. *J. Clin. Invest.* **80**, 992-997 (1987).
158. Taskinen M-R & Nikkilä EA. Basal and postprandial lipoprotein lipase activity in adipose tissue during caloric restriction and refeeding. *Metabolism* **36**, 625-630 (1987).
159. Eckel RH, Yost TJ & Jensen DR. Sustained weight reduction in moderately obese women results in decreased activity of skeletal muscle lipoprotein lipase. *Eur. J. Clin. Invest.* **25**, 346-402 (1995).
160. Rebuffe-Scrive M, Basdevant A & Guy-Grand B. Nutritional induction of adipose tissue lipoprotein lipase in obese subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **202**, 399-408 (1983).

161. Kern PA, Ong JM, Saffari B & Carty J. The effects of weight loss on the activity and expression of adipose-tissue lipoprotein lipase in very obese humans. *N. Engl. J. Med.* **322**, 1053-1059 (1990).
162. Schwartz RS & Brunzell JD. Increase of adipose tissue lipoprotein lipase activity with weight loss. *J. Clin. Invest.* **67**, 1425-1430 (1981).
163. Reitman JS, Kosmakos FC, Howard BV, Taskinen M-R, Kuusi T & Nikkilä EA. Characterization of lipase activities in obese Pima indians. Decreases with weight reduction. *J. Clin. Invest.* **70**, 791-797 (1982).
164. Jiang ZY, Lin Y-W, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, Yamauchi T, White MF & King GL. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (*fa/fa*) rats. *J. Clin. Invest.* **104**, 447-457 (1999).
165. Jansen H, Hop W, van Tol A, Bruschke AVG & Birkenhäger JC. Hepatic lipase and lipoprotein lipase are not major determinants of the low density lipoprotein subclass pattern in human subjects with coronary heart disease. *Atherosclerosis* **107**, 45-54 (1994).
166. Chen Y-DI, Facchini F, Landau C, Hollenbeck CB & Reaven GM. Plasma post-heparin lipoprotein lipase activity is decreased in normal individuals who are resistant to insulin-mediated glucose uptake. *Endocrin Metab* **1**, 153-158 (1994).
167. Knudsen P, Eriksson J, Lahdenperä S, Kahri J, Groop L & Taskinen M-R. Changes of lipolytic enzymes cluster with insulin resistance syndrome. Botnia Study Group. *Diabetologia* **38**, 344-350 (1995).
168. Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G, Chajek-Shaul T, Carpentier Y, Deckelbaum R, Hultin M, Peterson J, Patsch J & Vilaró S. Lipoprotein lipase: site of synthesis and sites of action. *Atheroscl Rev* **22**, 21-25 (1991).

169. Eckel RH, Yost TJ & Jensen DR. Alterations in lipoprotein lipase in insulin resistance. *Int. J. Obes.* **19 (suppl 1)**, S16-S21 (1995).
170. Frederich RC, Jr., Kahn BB, Peach MJ & Flier JS. Tissue-specific nutritional regulation of angiotensinogen in adipose tissue. *Hypertension* **19**, 339-344 (1992).
171. Hotamisligil GS, Shargill NS & Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87-91 (1993).
172. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L & Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432 (1994). [Published erratum appears in *Nature* 374:479, 1995].
173. Vague J. La différenciation sexuelle. Facteur déterminant des formes de l'obésité. *Presse Med.* **55**, 339-340 (1947).
174. Larsson B, Svärdsudd K, Welin L, Wilhelmsen L, Björntorp 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* **288**, 1401-1404 (1984).
175. Lapidus L, Bengtsson C, Larsson B, Pennert K, Rybo E & Sjöström 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.* **289**, 1257-1261 (1984).
176. Lerner DJ & Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am. Heart J.* **111**, 383-390 (1986).
177. Peiris AN, Hennes MI, Evans DJ, Wilson CR, Lee MB & Kissebah AH. Relationship of anthropometric measurements of body fat distribution to metabolic profile in premenopausal women. *Acta Med. Scand. Suppl.* **723**, 179-188 (1988).

178. 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.* **44**, 739-746 (1986).
179. Fried SK & Kral JG. Sex differences in regional distribution of fat cell size and lipoprotein lipase activity in morbidly obese patients. *Int. J. Obes.* **11**, 129-140 (1987).
180. Arner P, Lithell H, Wahrenberg H & Brönnegård M. Expression of lipoprotein lipase in different human subcutaneous adipose tissue regions. *J. Lipid Res.* **32**, 423-429 (1991).
181. Pedersen SB, Jønler M & Richelsen B. Characterization of regional and gender differences in glucocorticoid receptors and lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**, 1354-1359 (1994).
182. Fried SK, Russel CD, Grauso NL & Brodin RE. Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. *J. Clin. Invest.* **92**, 2191-2198 (1993).
183. Mauriège P, Marette A, Atgié C, Bouchard C, Theriault G, Bukowiecki LK, Marceau P, Biron S, Nadeau A & Despres JP. Regional variation in adipose tissue metabolism of severely obese premenopausal women. *J. Lipid Res.* **36**, 672-684 (1995).
184. Lefebvre A-M, Laville M, Vega N, Riou JP, van Gaal L, Auwerx J & Vidal H. Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* **47**, 98-103 (1998).
185. Robert JJ. Méthodes de mesure de la résistance à l'insuline. *Presse Med.* **24**, 15-22 (1995).
186. Martínez FJ, Villa E, Serrano J & García-Robles R. Diagnosis of insulin resistance. *Drugs* **46** (suppl 2), 165-171 (1993).
187. Greenfield MS, Doberne L, Kraemer F, Tobey T & Reaven G. Assessment of insulin resistance with the insulin suppression test and the euglycemic clamp. *Diabetes* **30**, 387-392 (1981).

188. Reaven GM, Brand RJ, Chen Y-D, Mathur AK & Goldfine I. Insulin resistance and insulin secretion are determinants of oral glucose tolerance in normal individuals. *Diabetes* **42**, 1324-1332 (1993).
189. Kusunoki M, Hara T, Tsutsumi K, Nakamura T, Miyata T, Sakakibara F, Sakamoto S, Ogawa H, Nakaya Y & Storlien LH. The lipoprotein lipase activator, NO-1886, suppresses fat accumulation and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Diabetologia* **43**, 875-880 (2000).
190. Boivin A, Montplaisir I & Deshaies Y. Postprandial modulation of lipoprotein lipase in rats with insulin resistance. *Am. J. Physiol.* **267**, E620-E627 (1994).
191. Mauriège P, Després J-P, Marcotte M, Ferland M, Tremblay A, Nadeau A, Moorjani S, Lupien P-J, Thériault G & Couchard C. Abdominal fat cell lipolysis, body fat distribution, and metabolic variables in premenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **71**, 1028-1035 (1990).
192. Lemieux S, Després J-P, Moorjani S, Nadeau A, Thériault G, Prud'homme D, Tremblay A, Bouchard C & Lupien P-J. Are gender differences in cardiovascular disease risk factors explained by the level of visceral adipose tissue? *Diabetologia* **37**, 757-764 (1994).

ANNEXE

The Degree of Hyperinsulinemia and Impaired Glucose Tolerance Predicts Plasma Leptin Concentrations in Women Only: A New Exploratory Paradigm

Daniel Panarotto, Jean-Luc Ardilouze, Daniel Tessier, and Pierre Maheux

Plasma leptin has been shown to correlate positively with many indices of obesity, as well as insulin resistance. For a given body weight, the levels are higher in women than in men, but the reasons for this difference are not clear. Insulin has been shown to stimulate leptin production by adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. Previous studies have reported that leptin levels are similar in diabetic and nondiabetic individuals. However, these studies were not performed in newly diagnosed diabetics, and other variables (such as gender) could have confounded the results. Therefore, the goal of the present cross-sectional study is to examine the effect of metabolic variables (such as glucose and insulin) on plasma leptin concentrations in men and women separately. We measured leptin levels in 48 subjects (17 with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus, 13 with impaired glucose tolerance [IGT], and 18 normal individuals). The 3 groups were well matched for gender, age, and body mass index (BMI). When adjusted for the BMI and gender, a statistically significant gender-related difference in mean plasma leptin was observed across the 3 glucose tolerance subgroups ($P < .03$ by analysis of covariance [ANCOVA]). More specifically, plasma leptin levels were, on average, 44% lower in women with diabetes or IGT versus normal women ($P < .02$). No such between-group difference was observed in the men. In univariate analysis in the same female subgroup, plasma leptin correlated positively with fasting insulin ($r_s = +.43$, $P < .06$) and negatively with 2-hour post-75-g glucose load plasma glucose concentration ($r_s = -.54$, $P < .02$). In a multiple regression model controlling for the BMI in the female subgroup, circulating insulin and glucose concentrations 2 hours after the 75-g glucose load were good predictors of fasting plasma leptin ($r = +.38$, $P = .02$ and $r = -.70$, $P < .001$, respectively). Leptin levels in women appear to be influenced independently and to an important degree by ambient plasma glucose and plasma insulin concentrations. These findings suggest that the synthesis of leptin by adipose tissue is more susceptible to *in vivo* regulation by insulin and glucose in women than in men. Plasma leptin concentrations were also lower in women with IGT or type 2 diabetes versus normal women, suggesting that fasting and/or postprandial hyperglycemia interferes with the stimulatory effect of plasma insulin on the synthesis of leptin by adipose tissue in women only.

Copyright © 2000 by W.B. Saunders Company

LEPTIN, the 167-amino acid peptide product of the *ob* gene, was cloned in 1994,¹ but its exact physiological role and mode of regulation in man is still a matter of intense discussion.^{2,3} The recent interest in the measurement of leptin by radioimmunoassay has generated a huge amount of information on the principal determinants and nondeterminants of plasma leptin in a number of pathophysiological conditions in man. To date, most of the clinical data have been observational and were obtained from case-control studies in which the findings were not always interpreted with regard to all of the now well-recognized confounding variables.

The information currently available regarding the variable plasma concentrations of leptin in man illustrates 2 different and complex issues. The first is that whereas insulin regulates the expression of leptin by adipose tissue *in vitro*,⁴⁻⁶ similar activity seems to occur *in vivo* in humans only after infusions of insulin lasting from 4 to 72 hours,⁷⁻¹⁰ as compared with rodents, wherein the action appears much faster.^{4,11,12} In clinical conditions characterized by insulin resistance such as impaired glucose tolerance (IGT), type 2 diabetes mellitus, and, to some extent, polycystic ovary syndrome, a defect in the action of insulin could theoretically lead either directly or indirectly to important changes in plasma leptin. One way in which this might occur is that for a given body fat mass, an impairment in the action of insulin on adipocytes leads to a reduction in the synthesis of leptin by adipose tissue. Alternatively, if insulin resistance does not blunt the effects of insulin on adipose tissue, the compensatory hyperinsulinemia found in insulin-resistant patients could lead to an increase in leptin production by adipose tissue. However, to date, the majority of researchers have found no differences in plasma leptin levels between diabetic and nondiabetic individuals¹⁻⁴ or between normal

women and those with polycystic ovary syndrome.¹³⁻¹⁵ The reason(s) for the absence of differences in plasma leptin between these insulin-sensitive and insulin-resistant populations is not clear. Even if most of these studies controlled for body adiposity, these findings suggest that other factors are involved in the regulation of leptin production.

The second important consideration arising from the available data is that for a given body mass index (BMI), plasma leptin is usually severalfold higher in women than in men.^{2,16} The reasons for this dichotomy and its physiological or pathophysiological implications have not been well established. The involvement of female sex hormone levels,^{2,17} the reduced androgen levels in women,^{2,18} and/or the favored distribution of fat toward the subcutaneous region in women^{2,19,20} have been proposed as possible explanations, but none of these fully explain the higher plasma levels of leptin in women. The situation is therefore complex and needs a more definitive answer. More specifically, what other factor(s) could be impli-

From the Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada.

Submitted September 22, 1999; accepted February 16, 2000.

Supported by the Centre de Recherche Clinique du Centre Universitaire de Santé de l'Estrie (Sherbrooke), the Joe Beattie Memorial Fund, and the Canadian Diabetes Association, and in part by a scholarship (to D.P.) from the Association Diabète Québec (Montreal, Quebec).

Address reprint requests to Pierre Maheux, MD, Division of Endocrinology and Metabolism, Université de Sherbrooke, 3001, 12^{ème} Avenue Nord, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4.

Copyright © 2000 by W.B. Saunders Company

0026-0495/00/4908-0024\$10.00/0

doi:10.1053/meta.2000.7745

cated and which parameters of glucose metabolism could influence this gender difference?

To address the 2 aforementioned problems, therefore, a cross-sectional study was performed (1) to explore the hypothesis that men and women differ with regard to plasma leptin levels as a result of differing regulatory effects of plasma insulin and glucose on adipose tissue, and (2) to define the precise influence of the glucose tolerance status and the degree of hyperinsulinemia on plasma leptin in both genders.

Our results not only confirm a dichotomy in plasma leptin levels in men and women, but suggest that hyperinsulinemia and hyperglycemia play independent and determinant roles in the production of leptin in women specifically.

SUBJECTS AND METHODS

Study Population

Forty-eight Caucasian subjects (age, 40 to 70 years; mean \pm SD, 56 ± 8) were recruited, comprising 17 individuals with type 2 diabetes mellitus, 13 subjects with IGT, and 18 normal individuals. All subjects had recently been screened from a large community-based diabetes program in which individuals with a random capillary glucose level over 8 mmol/L were invited for an oral glucose tolerance test. The classification was based on World Health Organization (WHO) criteria²¹ using a standard 2-hour 75-g glucose tolerance test administered in the morning after a 12-hour fast and preceded by 3 days of unrestricted carbohydrate intake. Therefore, all diabetic and glucose-intolerant subjects included in the present study were newly diagnosed, and none had used oral hypoglycemic agents or insulin. The mean BMI was 27.9 ± 2.5 kg/m² (range, 20.8 to 32.6); 44% (21 of 48) were women. Of the 21 women, 16 were postmenopausal, and of these, 7 (44%) were receiving estrogen, a replacement therapy that does not affect plasma leptin concentrations.²² The level of physical activity (in kilojoules per day) was estimated in each subject using a questionnaire developed and validated by Sallis et al.²³

Hormonal Assays

Plasma insulin was determined using a human insulin-specific radioimmunoassay that does not cross-react with proinsulin (Linco Research, St Louis, MO). Fasting plasma immunoreactive leptin was determined using a commercial double-antibody radioimmunoassay

(Linco Research). The leptin radioimmunoassay uses a rabbit anti-human leptin antibody and detects immunoreactive human leptin with a sensitivity of 0.5 ng/mL in plasma. The intraassay coefficient of variation was less than 5% across the range of standard (1 to 100 ng/mL), whereas the interassay coefficient of variation estimated by the use of 2 control pools was 2.3 ± 0.1 ng/mL (mean \pm SD) (5.1%) and 12.5 ± 0.7 ng/mL (5.3%), respectively.

Statistical Analysis

Plasma leptin, glucose, and insulin were not normally distributed variables. All statistical analyses therefore used nonparametric tests or logarithmically transformed variables. Between-group comparisons of variables were performed using the Mann-Whitney *U* rank-sum test or the Kruskal-Wallis test, depending on the number of groups to be compared. Relationships between plasma leptin and independent variables were assessed using the Spearman rank correlation coefficient (r_s). Comparisons of continuous variables among the 3 groups were made using analysis of covariance (ANCOVA) to control for the influence of confounding variables (gender and BMI) on leptin concentrations across the different subgroups of glucose tolerance. To validate the results obtained with ANCOVA, several multiple regression models were established using the log-transformed leptin concentration as the dependent variable. Data are presented as the mean \pm SEM unless otherwise indicated. Differences were considered significant at a *P* value less than .05. All statistical analyses were performed with the software StatView 5.0 for Windows (SAS Institute, Chicago, IL). A power calculation analysis for the multiple linear regression was performed a posteriori using the software nQuery Advisor 3.0 for Windows (Statistical Solutions, Saugus, MA) and following guidelines established by Cohen.²⁴

RESULTS

Patients' Baseline Characteristics

The physical and metabolic characteristics of the subjects in this protocol are summarized in Table 1 according to gender and glucose tolerance status. The subjects were comparable for most variables, with the exception of a higher body weight and waist to hip ratio in the male subgroup. Subjects with diabetes

Table 1. Comparison of Subjects by Gender and Diagnosis of Glucose Tolerance

Variable	Men (n = 27)			P*	Women (n = 21)			P*
	Normal	IGT	Diabetic		Normal	IGT	Diabetic	
No. of subjects	10	8	9		8	5	8	
Age (yr)	55 \pm 10	58 \pm 9	59 \pm 6	NS	56 \pm 7	54 \pm 5	55 \pm 9	NS
BMI (kg/m ²)	27.4 \pm 2.1	28.8 \pm 2.5	27.6 \pm 2.4	NS	27.9 \pm 2.5	26.0 \pm 3.3	28.9 \pm 2.3	NS
Weight (kg)	80.4 \pm 11.5	81.9 \pm 10.3	82.2 \pm 8.4	NS	74.3 \pm 11.5	65.2 \pm 4.8	70.0 \pm 7.6	NS
Waist to hip ratio	0.91 \pm 0.04	0.90 \pm 0.08	0.93 \pm 0.05	NS	0.83 \pm 0.03	0.85 \pm 0.08	0.86 \pm 0.06	NS
Physical activity (kJ/d)	559 \pm 300	725 \pm 293	515 \pm 361	NS	545 \pm 274	684 \pm 315	737 \pm 399	NS
Systolic blood pressure (mm Hg)	136 \pm 15	133 \pm 11	147 \pm 11	NS	142 \pm 12	138 \pm 7	136 \pm 20	NS
Diastolic blood pressure (mm Hg)	89 \pm 8	85 \pm 8	89 \pm 7	NS	92 \pm 9	88 \pm 8	90 \pm 9	NS
Plasma glucose (mmol/L)								
Fasting	4.6 \pm 0.3	5.5 \pm 0.8	7.1 \pm 1.6	<.001	4.8 \pm 0.4	4.7 \pm 0.3	7.1 \pm 1.5	<.001
2-h post-75-g load	5.7 \pm 1.5	9.1 \pm 1.2	15.1 \pm 3.2	<.001	5.0 \pm 1.1	8.9 \pm 1.2	15.6 \pm 2.6	<.001
Plasma insulin (pmol/L)								
Fasting	58 \pm 15	99 \pm 46	83 \pm 37	NS	73 \pm 21	72 \pm 22	82 \pm 25	NS
2-h post-75-g load	416 \pm 314	793 \pm 634	358 \pm 235	NS	349 \pm 215	618 \pm 312	388 \pm 190	NS
Plasma leptin (ng/mL)	4.7 \pm 2.4	5.3 \pm 3.1	5.1 \pm 3.1	NS	23.9 \pm 12.6	14.1 \pm 6.6	13.1 \pm 2.3	<.07

NOTE. Results are the mean \pm SD.

*Kruskal-Wallis test in each gender subgroup.

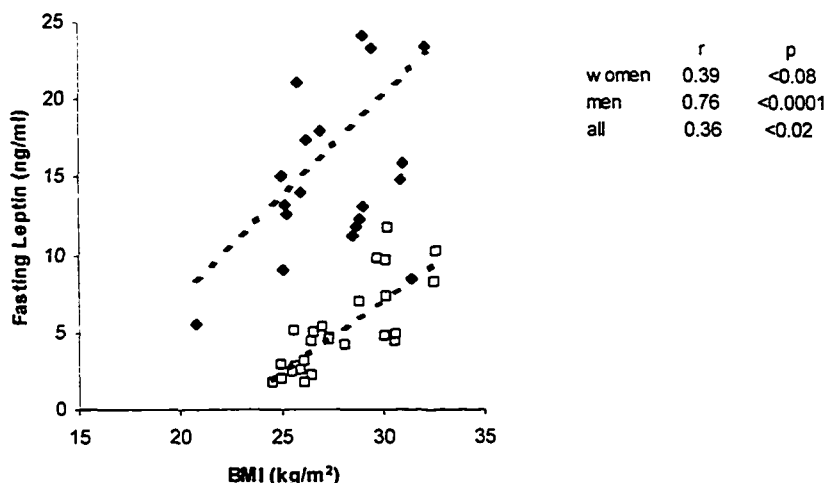


Fig 1. Relationship between fasting plasma leptin and the BMI in men (\square) and women (\blacklozenge). Spearman correlation coefficients (r_s) and associated P values are shown.

exhibited, on average, mildly elevated fasting plasma glucose, confirming that these were newly diagnosed diabetics. Despite this specific characteristic of the diabetic subgroup, fasting and 2-hour post-75-g glucose load insulin did not differ significantly versus normal subjects in each gender subgroup. However, when plasma insulin data from both gender subgroups were pooled for analysis, subjects with IGT had, on average, plasma insulin concentrations that were significantly higher ($P < .02$) versus the normal and diabetic subjects (normal 386 ± 264 , IGT 726 ± 524 , and diabetics 372 ± 209 pmol/L, mean \pm SD). This latter analysis therefore confirms the presence of compensatory hyperinsulinemia in the IGT subgroup and some signs of impaired insulin secretion in the subjects with diabetes.

Figure 1 shows that the fasting leptin concentration correlated positively with the BMI ($r_s = .36$, $P < .02$ across the entire group, Spearman rank correlation coefficient) and was, in general 3-fold higher in women versus men. The correlation between the BMI and fasting leptin was stronger in men versus women (men, $r_s = .76$, $P < .0001$; women, $r_s = .39$, $P < .08$, Spearman rank correlation coefficient).

Differences in Plasma Leptin Across Glucose Tolerance Diagnoses

On the whole and independent of gender, there was no statistically significant apparent difference in mean fasting leptin concentrations between the 3 glucose tolerance sub-

groups (normal 13.2 ± 3.0 , IGT 8.7 ± 1.8 , and diabetic 8.9 ± 1.2 ng/mL, $P > .05$, Kruskal-Wallis test; combined data not shown in Table 1). Controlling for gender and the BMI, a statistically significant ($P < .03$ by ANCOVA) gender-related difference in the mean plasma leptin level was revealed (Fig 2). Plasma leptin levels were, on average, 44% lower ($P < .02$ by ANCOVA controlling for BMI) in women with diabetes or IGT versus normal women. No such between-group difference was observed in the men ($P > .05$ by ANCOVA controlling for BMI).

Correlations Between Plasma Leptin and Glucose Concentrations

To define more specifically the relationship between the glucose tolerance status and plasma leptin, simple correlation analyses were performed using plasma glucose as a continuous variable. The relationship between fasting plasma leptin and 2-hour post-75-g glucose load plasma glucose showed clear sex differences (Fig 3), being statistically significant in women ($r_s = -.54$, $P < .02$) but not in men. No significant correlations were apparent in either sex between plasma leptin and fasting glucose ($r_s = -.32$, $P > .05$).

The use of a multiple regression analysis model showed an independent effect of plasma glucose on fasting leptin in the female subgroup specifically. In this model (using log-transformed fasting leptin as the dependent variable), both the

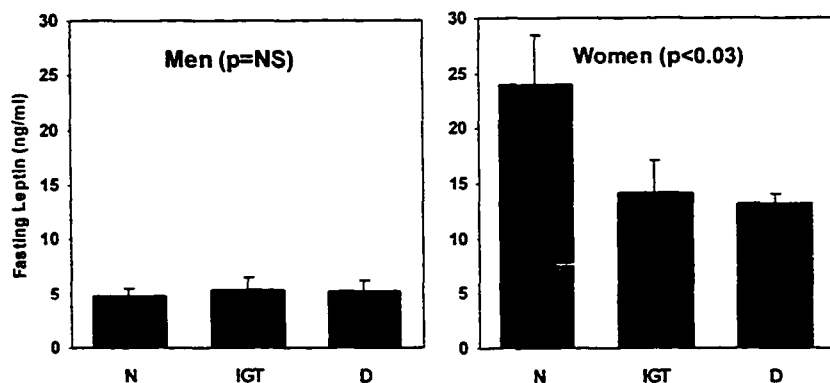


Fig 2. Differences in fasting plasma leptin in men and women in the 3 groups, normal (N), IGT, and D (diabetes). P values obtained by ANCOVA (controlling for BMI) are shown for each gender subgroup. Data are the mean \pm SEM.

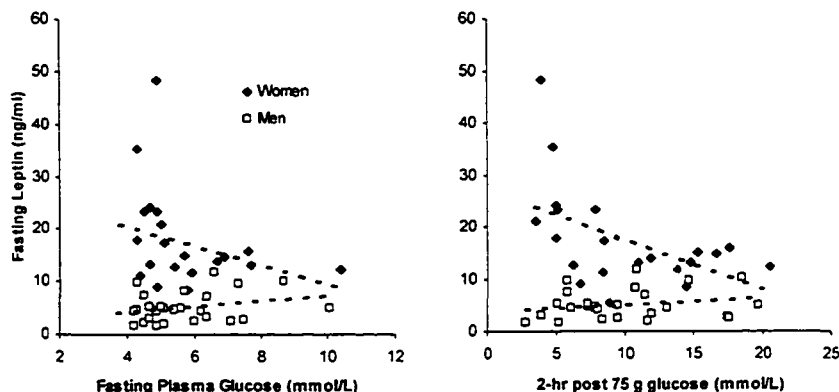


Fig 3. Relationships between fasting plasma leptin and fasting plasma glucose and 2-hour post-75-g load plasma glucose in men (□) and women (◆). Spearman correlation coefficients (r_s) and associated P values are shown for each gender subgroup. For women, the r_s for fasting plasma glucose was $-.31$ ($P = .16$), and for 2-hour post-75-g load glucose, $-.54$ ($P < .02$). For men, the r_s for fasting plasma glucose was $+.24$ ($P = .23$), and for 2 hour post-75-g load glucose, $+.15$ ($P = .45$).

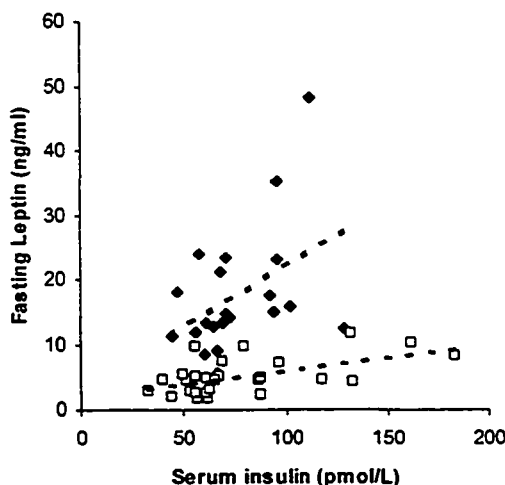
BMI and log-transformed 2-hour post-75-g glucose load glucose levels were strong and independent predictors of plasma leptin in women ($r = +.53$, $P < .003$ and $r = -.62$, $P < .001$, respectively). When the 2-hour post-75-g glucose load glucose concentration was replaced in this model by the log-transformed fasting glucose concentration, the latter variable had a predictive value that tended toward significance ($r = -.39$, $P = .06$).

Correlations Between Plasma Leptin and Insulin Concentrations

Univariate and multivariate analyses were performed between fasting plasma leptin and fasting plasma insulin concentrations (Fig 4). Fasting insulin correlated positively with fasting leptin across the entire group ($r_s = .35$, $P < .02$, Spearman rank correlation coefficient). When the analyses were controlled for gender, a correlation between leptin and insulin was again apparent and was generally stronger in both sexes (women, $r_s = .42$, $P < .06$; men, $r_s = .42$, $P < .04$).

Several regression models were used to clarify the relationship between plasma leptin and insulin concentrations (Table 2). In these analyses, plasma insulin, BMI, and plasma glucose were used as the independent variables. Since the 2-hour level was more strongly correlated with plasma leptin than the fasting plasma glucose concentration, we present results obtained with the 2-hour post-75-g glucose load glucose and insulin concen-

trations in Table 2. Analyses performed with the fasting glucose and insulin concentrations showed more or less the same results, but the standardized coefficients and R^2 were noticeably less strong (data not shown). The first analysis was performed for the entire study group and included gender as an independent variable. In this model (Table 2), the BMI, gender, 2-hour post-75-g glucose load glucose and insulin concentrations were all independent predictors of fasting plasma leptin. The model for the entire study group had predictive values (R^2) of .79, thus explaining approximately 80% of the total variability of fasting plasma leptin. Because of the significant gender differences observed in this study, multiple regression analyses were also performed within each gender subgroup (Table 2). A marked correlation between female gender and fasting plasma leptin was again observed: the BMI, 2-hour post-75-g load insulin, and 2-hour post-75-g load glucose were all independent predictors of fasting plasma leptin. In the male subgroup, neither the 2-hour post-75-g load insulin nor the 2-hour post-75-g load glucose had a statistically significant association with plasma leptin. In women, the standardized coefficients for the 2-hour post-75-g load insulin and glucose were not only statistically significant but also several-fold higher than those calculated for the entire study sample or for the male subgroup. The statistical power for the 3 regression models has been carefully calculated using a 2-tailed α level of .05 and taking into account the respective sample size, the number of covariates, and the adjusted R^2 obtained. The statistical power of each



	r	p
women	0.43	<0.06
men	0.42	<0.04
all	0.35	<0.02

Fig 4. Relationship between fasting plasma leptin, and fasting plasma insulin in men (□) and women (◆). Spearman correlation coefficients (r_s) and associated P values are shown for each gender subgroup and for the entire study sample.

Table 2. Regression Models With Fasting Plasma Leptin (log-transformed) as the Dependent Variable

Independent Variable	Coefficient	Standardized Coefficient	t	P
Entire study group (N = 48)				
Intercept	-0.969	-0.969	-3.495	.001
M/F	0.550	0.777	11.611	<.001
BMI (kg/m ²)	0.054	0.385	5.474	<.001
2-h post-75-g load insulin (pmol/L)*	0.184	0.163	2.314	.026
2-h post-75-g load glucose (mmol/L)*	-0.244	-0.150	-2.195	.034
<i>R</i> ² = .80, adjusted <i>R</i> ² = .79				
Female subgroup (n = 21)				
Intercept	-0.197	-0.197	-0.476	.640
BMI (kg/m ²)	0.051	0.671	4.735	<.001
2-h post-75-g load insulin (pmol/L)*	0.316	0.384	2.686	.016
2-h post-75-g load glucose (mmol/L)*	-0.623	-0.695	-5.150	<.001
<i>R</i> ² = .71, adjusted <i>R</i> ² = .66				
Male subgroup (n = 27)				
Intercept	-1.669	-1.669	-4.370	<.001
BMI (kg/m ²)	0.080	0.787	4.469	<.001
2-h post-75-g load insulin (pmol/L)*	0.000	0.000	0.000	.999
2-h post-75-g load glucose (mmol/L)*	0.087	0.077	0.609	.548
<i>R</i> ² = .65, adjusted <i>R</i> ² = .61				

*Log-transformed variables.

of the models presented in Table 2 was uniformly and individually 99%, confirming that our analyses were based on a sufficient number of subjects.

DISCUSSION

Plasma leptin levels were measured in a population of 48 Caucasian subjects who had undergone a standard diagnostic 2-hour oral glucose tolerance test. The specific aim of the study was to explore the relationships between serum fasting leptin and other parameters such as plasma glucose and plasma insulin across genders. The study population contained subjects of both sexes who were not morbidly obese but had 1 of 3 different glucose tolerance phenotypes. As expected, women were found to have higher plasma leptin levels than men and plasma leptin correlated positively with the BMI, confirming that the study sample was comparable to other cohorts.^{2,16,25,26} The diabetic subgroup included mostly patients with mild and newly diagnosed diabetes mellitus, none of whom were taking any hypoglycemic agents or insulin, which could theoretically influence plasma leptin.

When mean plasma leptin levels in the 3 groups were initially compared, no differences were apparent, a finding that corresponded with many previously published studies.²⁵⁻³⁰ However, when the analysis was controlled for gender and the BMI, statistically significant differences in leptin levels were revealed in women between the diabetic and IGT groups and the normal group. This finding emphasizes the problem of comparing leptin levels solely in univariate analyses. It is not clear why our data

are different from those previously published. One explanation could be that the diabetic patients included in previous studies were not recently diagnosed and consequently had treatments that could have theoretically influenced plasma insulin concentrations, the degree of insulin resistance, and/or plasma leptin concentrations.^{2,25-28}

To further explore the apparent differences in leptin concentrations between normal, IGT, and diabetic individuals, another series of statistical analyses were conducted using plasma glucose not as a categorical and diagnostic variable as suggested by the WHO²¹ but rather as a continuous variable. In these analyses, 2-hour post-75-g load plasma glucose correlated inversely with plasma leptin in women only, supporting the aforementioned results obtained with ANCOVA in subjects categorized according to 2-hour post-75-g load plasma glucose concentrations (WHO criteria) and gender. To our knowledge, only one research group³¹ has shown an independent link between plasma leptin and plasma glucose. That group reported lower leptin levels in poorly controlled and morbidly obese diabetics compared with well-controlled diabetics, glucose-intolerant subjects, or normal subjects. However, the study was conducted in subjects with a BMI greater than 40 kg/m², and the reduction in plasma leptin was largely confined to the uppermost quartile of the plasma glucose distribution (up to 25.5 mmol/L), which corresponded to poorly controlled diabetes. More recently, one group has shown that HbA_{1c} was negatively correlated with serum leptin concentrations in patients with an established diagnosis of diabetes mellitus.³² However, our study is the first to show that an independent link between plasma leptin and plasma glucose is not unique to obese and very hyperglycemic individuals.

The apparently more important predictive value of 2-hour post-75-g load glucose (v fasting glucose) in our study is probably related to the fact that the former was the variable used for determining the glucose tolerance status of each participant. However, one could also speculate that the 2-hour post-75-g load plasma glucose level may be more important for the regulation of leptin production by adipose tissue. To our knowledge, no in vitro study has demonstrated a direct effect of glucose, independent of insulin, on the adipose tissue expression of leptin in animals or humans. A direct effect of glucose on the expression of other genes has been described,³³ but such an inhibitory effect on leptin production would need further investigation.

Finally, we examined the link between plasma leptin and insulin concentrations and found, like others,^{7,16,34,35} a positive correlation between plasma leptin and plasma insulin in univariate and multivariate analysis. Our multivariate regression analysis was performed to control for gender, BMI, and 2-hour post-75-g load plasma glucose, and the results confirmed that plasma insulin was an independent predictor of plasma leptin. Here, again, this finding was specific for the female subgroup, as shown by the multiple regression models within each gender subgroup (Table 2). In the specific regression model outlined in the female subgroup, both the 2-hour post-75-g load plasma insulin and the 2-hour post-75-g load plasma glucose correlated with fasting plasma leptin, which further supports the data

presented. In other words, circulating glucose and insulin concentrations appear to have important and independent effects on plasma leptin in women.

A priori, our data suggest that a chronic state of hyperinsulinemia in women, as demonstrated by an increase in plasma insulin, is likely to increase plasma leptin. A number of researchers have reported higher fasting leptin levels in insulin-resistant subjects,^{34,36} but it is not always easy to confirm whether the increased synthesis of leptin by adipose tissue is caused by the insulin resistance defect or by the compensatory hyperinsulinemia. Three lines of evidence favor the latter explanation. First, insulin has been shown to directly increase the expression of *ob* gene and mRNA levels in animals^{4,5,11,12} and in humans.⁷⁻¹⁰ Second, when insulin resistance and plasma insulin levels are measured in the same subjects and entered in the same regression models, plasma insulin is clearly a significant predictor of plasma leptin, whereas insulin resistance unexpectedly loses its predictive value.^{35,37,38} Third, one study³⁹ has shown that prepubertal type 1 diabetics have higher leptin levels than nondiabetics and that this association was probably caused by the hyperinsulinemia present in these patients, further supporting the role of chronic hyperinsulinemia in leptin secretion. These observations suggest that the response of adipose tissue to leptin is therefore not affected by the insulin resistance phenomenon. Our data go further by suggesting that this regulatory effect of insulin on leptin seems to occur in women only. This effect is important but not unique to insulin, as indicated by our finding that plasma glucose also has a significant impact on plasma leptin.

Unanswered at present is the question of why women are more susceptible than men to the regulation of leptin by ambient glucose or insulin. The significance of this gender dichotomy in plasma leptin and its metabolic determinants are also unclear. The hypothesis that men and women differ with regard to plasma leptin responsiveness is a fairly new and unexplored area. Women may have higher absolute leptin levels than men, but it has recently been shown that they have relatively lower diurnal leptin amplitude than men, for a given fat mass.⁴⁰ The fact that hyperinsulinemia acutely increases plasma leptin only in women when euglycemia is maintained²⁹ is another point corroborating our findings, even though a recent study showed a responsiveness to insulin of cultured adipose tissue in obese men and women.⁴¹ A complete discussion on the observed dichotomy of plasma leptin is beyond the scope of this study. However, we suggest that in women adipose tissue may be constantly stimulated by metabolic or hormonal signals, of which plasma glucose and plasma insulin would appear to be pivotal. For example, female adipose tissue may be more sensitive to insulin than male adipose tissue, which could lead to a chronic upregulation of leptin production with a subsequent basal hyperleptinemia and a blunting of the diurnal rhythmicity of leptin. An increase in subcutaneous adipose tissue could also be in itself the reason that this regulation is different in women and men.^{20,41} We acknowledge that our lack of information with regard to body composition and percent body fat can somewhat limit the interpretation of our data, but still very few published articles have focused on the types of gender differences outlined herein. To our knowledge, only 2 groups showed that the

correlation between insulin and leptin was maintained only in women (as compared with men) when corrected for fat mass.^{42,43} The usefulness of such gender dimorphism for leptin is not well understood, but could be related to a putative role for leptin in reproduction.^{2,44,45}

Finally, a puzzling paradox arises from our data. If female patients with IGT are insulin-resistant and therefore have increased insulin concentrations, why are they not hyperleptinemic? We have found that insulin-resistant subjects have lower plasma leptin levels than normal individuals independently of the BMI, and that the more impaired the glucose tolerance of a woman, the lower her plasma leptin. These data become less contradictory in view of the apparent suppressive effect of plasma glucose on plasma leptin that we have observed in women only. Therefore, is leptin important in type 2 diabetes and IGT? From our data, it would appear that the answer to this question is "yes" and that such a role is predominantly important in women. We hypothesize that insulin resistance leads to a compensatory state of hyperinsulinemia that increases the production of leptin by adipose tissue, theoretically preventing a further weight gain and a further increase in the insulin resistance defect. With β -cell exhaustion (as in our subjects with diabetes), hyperglycemia arises and it is hypothesized to have a restraining effect on the production of leptin by adipose tissue. Our data suggest that postprandial hyperglycemia such as that observed in the early phase of type 2 diabetes (at a time when plasma insulin has returned to levels similar to the values of normal individuals) can impede the synthesis of leptin by adipocytes. Such a reduction in plasma leptin in patients with IGT or type 2 diabetes could therefore ultimately lead to an increase in appetite and to difficulty in achieving normal body weight.

In conclusion, this study has demonstrated that in addition to the BMI, plasma glucose and ambient hyperinsulinemia are strong, independent, and unique predictors of plasma leptin in women only. That these associations were not observed in men suggests that adipose tissue in women has the unique feature of being subject to close regulation by circulating glucose and insulin. Taking into account some important confounding variables, our study has shown that nonmorbidly obese women with IGT or newly diagnosed type 2 diabetes have lower plasma leptin than normal women. We hypothesize that postprandial and, albeit to a lesser extent, fasting hyperglycemia restrain the stimulatory effect of plasma insulin on the synthesis of leptin by adipose tissue. There are obviously many factors that can influence plasma leptin, but it should be remembered that our regression model, which controlled for the BMI, gender, glucose, and insulin, was able to explain 80% of the observed variability in fasting leptin. These results provide new insights into the potential mechanisms underlying the differences in plasma leptin between men and women. Further studies focusing on the mechanisms of leptin regulation by insulin and glucose in women will help to further clarify leptin physiology.

ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge the staff of the Clinical Research Center for help in conducting the study, as well as Peter Hughes for editorial assistance.

REFERENCES

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432, 1994 [published erratum appears in *Nature* 374:479, 1995]
2. Dagogo-Jack S: Regulation and possible significance of leptin in humans: Leptin in health and disease. *Diabetes Rev* 7:23-38, 1999
3. Flier JS: What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1407-1413, 1998
4. Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, et al: Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377:527-529, 1995
5. Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, et al: The ob gene and insulin: A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes* 44:1467-1470, 1995
6. Rentsch J, Chiesi M: Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett* 379:55-59, 1996
7. Malmström R, Taskinen M-R, Karonen SL, et al: Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia* 39:993-996, 1996
8. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, et al: Acute and chronic effect of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Diabetes* 45:699-701, 1996
9. Utraiainen T, Malmström R, Makimattila S, et al: Supraphysiological hyperinsulinemia increases plasma leptin concentrations after 4 h in normal subjects. *Diabetes* 45:1364-1366, 1996
10. Pratley RE, Nicolson M, Bogardus C, et al: Effects of acute hyperinsulinemia on plasma leptin concentrations in insulin-sensitive and insulin-resistant Pima Indians. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4418-4421, 1996
11. Patel BK, Koenig JJ, Kaplan LM, et al: Increase in plasma leptin and Lep mRNA concentrations by food intake is dependent on insulin. *Metabolism* 47:603-607, 1998
12. Sivitz WI, Walsh S, Morgan D, et al: Plasma leptin in diabetic and insulin-treated diabetic and normal rats. *Metabolism* 47:584-591, 1998
13. Mantzoros CS, Dunaif A, Flier JS: Leptin concentrations in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1687-1691, 1997
14. Rouru J, Anttila L, Koskinen P, et al: Serum leptin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1697-1700, 1997
15. Laughlin GA, Morales AJ, Yen SSC: Serum leptin levels in women with polycystic ovary syndrome: The role of insulin resistance/hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1692-1696, 1997
16. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334:292-295, 1996
17. Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, et al: Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol* 154:285-292, 1997
18. Elbers JM, Asscheman H, Seidell JC, et al: Reversal of the sex difference in serum leptin levels upon cross-sex hormone administration in transsexuals. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3267-3270, 1997
19. Lönnqvist F, Arner P, Nordfors L, et al: Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med* 1:950-953, 1995
20. Montague CT, Prins JB, Sanders L, et al: Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: Implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes* 46:342-347, 1997
21. Alberti KGMM, Zimmet PZ, for the WHO consultation: Definition, diagnosis, and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15:539-553, 1998
22. Castracane VD, Kraemer RR, Franken MA, et al: Serum leptin concentration in women: Effect of age, obesity, and estrogen administration. *Fertil Steril* 70:472-477, 1998
23. Sallis JF, Haskell WL, Wood PD, et al: Physical activity assessment methodology in the Five-City Project. *Am J Epidemiol* 121:91-106, 1985
24. Cohen J: *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (ed 2). Hillsdale, NJ, Erlbaum, 1988
25. Haffner SM, Stern MP, Miettinen H, et al: Leptin concentrations in diabetics and non diabetic Mexican-Americans. *Diabetes* 45:822-824, 1996
26. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, et al: Nocturnal rise of leptin in lean, obese and non-insulin dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* 97:1344-1347, 1996
27. Sumner AE, Falkner B, Kushner H, et al: Relationship of leptin concentration to gender, menopause, age, diabetes, and fat mass in African Americans. *Obes Res* 6:128-133, 1998
28. Widjaja A, Stratton IM, Horn R, et al: UKPDS 20: Plasma leptin, obesity, and plasma insulin in type 2 diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 82:654-657, 1997
29. Kennedy A, Gettys TW, Watson P, et al: The metabolic significance of leptin in humans: Gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity, and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1293-1300, 1997
30. Tasaka Y, Yanagisawa K, Iwamoto Y: Human plasma leptin in obese subjects and diabetics. *Endocr J* 44:671-676, 1997
31. Clément K, Lahlou N, Ruiz J, et al: Association of poorly controlled diabetes with low serum leptin in morbid obesity. *Int J Obes* 21:556-561, 1997
32. Moriya M, Okumura T, Takahashi N, et al: An inverse correlation between serum leptin levels and hemoglobin A_{1c} in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 43:187-191, 1999
33. Rencurel F, Girard J: Regulation of liver gene expression by glucose. *Proc Nutr Soc* 57:265-275, 1998
34. Segal KR, Landt M, Klein S: Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men. *Diabetes* 45:988-991, 1996
35. Leyva F, Godsland IF, Ghatel M, et al: Hyperleptinemia as a component of a metabolic syndrome of cardiovascular risk. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 18:928-933, 1998
36. Nyholm B, Fisker S, Lund S, et al: Increased circulating leptin concentrations in insulin-resistant first-degree relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: Relationship to body composition and insulin sensitivity but not to family history of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 136:173-179, 1997
37. Carantoni M, Abbasi F, Azhar S, et al: Plasma leptin concentrations do not appear to decrease insulin-mediated glucose disposal or glucose-stimulated insulin secretion in women with normal glucose tolerance. *Diabetes* 47:244-247, 1998
38. Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Panahloo A, et al: Relationships between plasma leptin and insulin concentrations, but not insulin resistance, in non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Diabet Med* 14:376-380, 1997
39. Kamoda T, Saitoh H, Nakahara S, et al: Serum leptin and insulin concentrations in prepubertal lean, obese and insulin-dependent diabetes mellitus children. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49:385-389, 1998
40. Saad MF, Riad-Gabriel MG, Khan A, et al: Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin: Effects of gender and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 83:453-459, 1998

41. Russell CD, Petersen RN, Rao SP, et al: Leptin expression in adipose tissue from obese humans: Depot-specific regulation by insulin and dexamethasone. *Am J Physiol* 275:E507-E515, 1998
42. Couillard C, Mauriège P, Prud'homme D, et al: Plasma leptin concentrations: Gender differences and associations with metabolic risk factors for cardiovascular disease. *Diabetologia* 40:1178-1184, 1997
43. Echwald SM, Clausen JO, Hansen T, et al: Analysis of the relationship between fasting serum leptin levels and estimates of beta-cell function and insulin sensitivity in a population sample of 380 healthy young Caucasians. *Eur J Endocrinol* 140:180-185, 1999
44. Macut DJ, Micic D, Pralong FP, et al: Is there a role for leptin in human reproduction? *Gynecol Endocrinol* 12:321-326, 1998
45. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, et al: Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137:3144-3147, 1996