

Université de Sherbrooke

Nouveaux indices de suppression de la lipolyse par l'insuline déterminés lors de l'hyperglycémie provoquée par voie orale : comparaisons avec le clamp euglycémique-hyperinsulinémique et les paramètres métaboliques chez les femmes

Par
Foued Naimi
Département de médecine, service d'endocrinologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès science (M.Sc.)
en physiologie (endocrinologie)

Sherbrooke, Québec, Canada

Septembre 2016

Pre. Isabelle Dionne, Ph.D, Doyenne de la Faculté des Sciences de l'activité Physique
Pr. Jean-Luc Ardilouze, M.D., Ph.D, Programme de Physiologie-Pharmacologie
Pr Jean-Patrice Baillargeon, M.D., M.Sc, directeur de recherche

SUMMARY

New indices of insulin-mediated suppression of lipolysis determined during an oral glucose challenge: comparisons to euglycemic-hyperinsulinemic clamp and metabolic parameters in women

By

Foued Naimi

Physiology-Biophysic Program

Thesis presented to the Faculty of medicine and health science for obtaining a Master ès sciences degree (M.Sc.), Faculty of medicine and health science, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada, J1H 5N4

It has been shown that a dysfunctional regulation of adipose-tissue lipolysis could conduct to non-adipose tissues overexposure to non esterified fatty acids (NEFA), leading to lipotoxicity. Lipotoxicity is considered as a key factor in the development of insulin resistance and type 2 diabetes. Insulin regulates glucose metabolism but also NEFA storage and release. To our knowledge, there is no gold standard for evaluating insulin sensitivity for lipolysis. The gold standard to measure insulin sensitivity for glucose is the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. This method is simple to interpret because it achieves static levels of metabolic parameters at the end of each step of the clamp. The major limit of the clamp is that it is time-consuming, expensive and cannot be used on large population. On the other hand, the oral glucose tolerance test (OGTT) consists in a dynamic test also used to estimate insulin mediated glucose disappearance after ingestion of 75 g of glucose. Since the OGTT is easier to use, less expensive and can be suggested in large cohort studies, its potential use has been suggested to estimate insulin sensitivity for lipolysis, as well. This work is the first to validate the use of simple indices derived from OGTT to estimate insulin sensitivity for lipolysis against the euglycemic clamp and adipose-tissue dysfunction in women. The results of this study clearly show in a group of 29 women (15 normal and 14 with polycystic ovary syndrome, who are used to increase the range of insulin resistance) that T_{50NEFA} (time to suppress 50% of NEFA baseline levels) during OGTT is the best index associated with glucose insulin clamp indices and clinical markers related to adipose tissue dysfunction and metabolic parameters. T_{50NEFA} (OGTT) was also better associated with central adiposity and metabolic parameters than clamp-derived indices. Since the OGTT is much easier to perform and is less expensive than the clamp technique, the use of OGTT to calculate T_{50NEFA} seems to be a valid method to assess antilipolytic action of insulin in large cohorts.

Keywords: Lipotoxicity, insulin resistance, insulin sensitivity, metabolism, adipose tissue.

RÉSUMÉ

Nouveaux indices de suppression de la lipolyse par l'insuline déterminés lors de l'hyperglycémie provoquée par voie orale : comparaisons avec le clamp euglycémique-hyperinsulinémique et les paramètres métaboliques chez les femmes

Par
Foued Naimi

Département de médecine, service d'endocrinologie
Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de maître ès science (M.Sc.) en physiologie (endocrinologie), Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Une dysrégulation de la lipolyse des tissus adipeux peut conduire à une surexposition des tissus non-adipeux aux acides gras non-estérifiés (AGNE), qui peut mener à un certain degré de lipotoxicité dans ces tissus. La lipotoxicité constitue, par ailleurs, l'une des causes majeures du développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2. En plus de ses fonctions glucorégulatrices, l'insuline a pour fonction d'inhiber la lipolyse et donc de diminuer les niveaux d'AGNE en circulation, prévenant ainsi la lipotoxicité. Il n'y a pas d'étalon d'or pour mesurer la sensibilité de la lipolyse à l'insuline. Le clamp euglycémique-hyperinsulinémique constitue la méthode étalon d'or pour évaluer la sensibilité du glucose à l'insuline mais il est aussi utilisé pour mesurer la suppression de la lipolyse par l'insuline. Par contre, cette méthode est coûteuse et laborieuse, et ne peut pas s'appliquer à de grandes populations. Il existe aussi des indices pour estimer la fonction antilipolytique de l'insuline dérivés de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO), un test moins dispendieux et plus simple à effectuer à grande échelle. Cette étude vise donc à : 1) Étudier la relation entre les indices de suppressibilité des AGNE par l'insuline dérivés du clamp et ceux dérivés de l'HGPO; et 2) Déterminer laquelle de ces mesures corrèle le mieux avec les facteurs connus comme étant reliés à la dysfonction adipeuse : paramètres anthropométriques et indices de dysfonction métabolique. Les résultats montrent que dans le groupe de sujets étudiés (n=29 femmes, 15 témoins saines et 14 femmes avec résistance à l'insuline car atteintes du syndrome des ovaires polykystiques), certains indices de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse dérivés de l'HGPO corrèlent bien avec ceux dérivés du clamp euglycémique-hyperinsulinémique. Parmi ces indices, celui qui corrèle le mieux avec les indices du clamp et les paramètres anthropométriques et de dysfonction adipeuse est le T50_{AGNE} (temps nécessaire pour diminuer de 50% le taux de base – à jeun – des AGNE). Nos résultats suggèrent donc que l'HGPO, facile à réaliser, peut être utilisée pour évaluer la sensibilité de la lipolyse à l'insuline. Nous pensons que la lipo-résistance à l'insuline peut être facilement quantifiée en clinique humaine.

Mots clés : Lipotoxicité, résistance à l'insuline, sensibilité à l'insuline, métabolisme, tissu adipeux.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	vii
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	9
I.1 L'OBÉSITÉ.....	12
I.1.1 Définition.....	12
I.1.2 Mesure d'obésité.....	12
I.2 PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DYSFONCTION DU TISSU ADIPEUX.....	134
I.2.1 Origine du gras.....	135
I.2.2 Mécanismes impliqués dans le développement de l'obésité.....	178
I.3 RELATION ENTRE LA DYSFONCTION DU TISSU ADIPEUX ET LA RÉSISTANCE À L'INSULINE.....	22
I.3.1 L'insuline.....	22
I.3.2 Biosynthèse d'insuline.....	21
I.3.3 Sécrétion d'insuline.....	22
I.3.4 Fonctions de l'insuline.....	23
I.3.5 Altération de la fonction antilipolytique de l'insuline.....	26
I.4 RÔLE DE LA RÉSISTANCE À L'ACTION ANTI-LIPOLYTIQUE DE L'INSULINE ET DE LA LIPOTOXICITÉ DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA RÉSISTANCE À L'INSULINE POUR LE GLUCOSE.....	27
I.5 MÉTHODES DE MESURE DE LA SENSIBILITÉ À L'INSULINE CHEZ L'HUMAIN.....	33
I.5.1 Méthodes de référence.....	33
I.6 IMPORTANCE DE MESURER LA SENSIBILITÉ À L'INSULINE POUR LA LIPOLYSE.....	45
I.7 MÉTHODES DE VALIDATION INTERNE D'UN TEST.....	47
I.8 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	51
CHAPITRE II : ARTICLE.....	50
CHAPITRE III : DISCUSSION.....	741
III. 1 ÉMERGENCE DU PROJET DE RECHERCHE.....	75
III. 2 DISCUSSION DES RÉSULTATS DE RECHERCHE.....	83

III. 2. 1 DESCRIPTION DES CALCULS D'INDICES DE SUPPRESSION DE LA LIPOLYSE PAR L'INSULINE.....	83
III. 2. 2 DISCUSSION DES CORRÉLATIONS ENTRE LES INDICES DE SUPPRESSION DE LA LIPOLYSE PAR L'INSULINE ET LES PARAMÈTRES ANTHROPOMÉTRIQUES DES SUJETS À L'ÉTUDE.....	89
III. 2. 3 DISCUSSION DES CORRÉLATIONS ENTRE LES INDICES DE SUPPRESSION DE LA LIPOLYSE PAR L'INSULINE ET LES PARAMÈTRES MÉTABOLIQUES DES SUJETS À L'ÉTUDE.....	92
III. 3 LIMITES DE L'ÉTUDE	93
III. 4 CONCLUSION.....	93
IV PERSPECTIVES.....	94
V REMERCIEMENTS.....	95
VI LISTE DES RÉFÉRENCES	9697

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.** Classification de l'obésité en fonction de l'IMC
- Tableau 2.** Principaux indices de sensibilité du glucose à l'insuline dérivés du clamp
- Tableau 3.** Ensembles d'indices dérivés du clamp dans notre étude.
- Tableau 4.** Indices des plus utilisés pour la mesure de la sensibilité du glucose à l'insuline, dérivés à partir d'HGPO.
- Tableau 5.** Formules HOMA et QUICKI.
- Tableau 6.** Ensemble des indices dérivés à partir de l'HGPO.
- Tableau 7.** Mesures anthropométriques et caractéristiques métaboliques des participantes
- Tableau 8.** Indices de suppression des AGNE par l'insuline dérivés du clamp euglycémique-hyperinsulinémique et de l'HGPO.
- Tableau 9.** Relation entre les indices de suppression des AGNE issus du clamp et ceux issus de l'HGPO.
- Tableau 10.** Relation entre les paramètres anthropométriques et les indices de suppression des AGNE par l'insuline issus du clamp et de l'HGPO.
- Tableau 11.** Relation entre les paramètres de dysfonction métabolique et les indices de suppression des AGNE par l'insuline issus du clamp et de l'HGPO.
- Tableau 12.** Tableau des critères d'inclusion et d'exclusion.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Obésité de type androïde et de type gynoïde.
- Figure 2.** Parcours du gras alimentaire dans le tube digestif.
- Figure 3.** Absorption, distribution et emmagasinage du gras alimentaire.
- Figure 4.** Régulation de la lipogénèse par l'insuline.
- Figure 5.** Plasticité du tissu adipeux.
- Figure 6.** Représentation graphique du Clamp Euglycémique-Hyperinsulinémique
- Figure 7.** Niveaux des AGNE (NEFA en anglais) chez les filles des femmes SOPK (PCOSr) lors de l'HGPO.
- Figure 8.** Effets de la surcharge aux des AGNE sur les organes producteurs d'androgènes.
- Figure 9.** Déroulement de l'étude SOPK-TZD.
- Figure 10.** Schéma descriptif du nombre de patients contactés, ceux ayant terminé l'étude et ceux ayant été retirés.
- Figure 11.** Schéma explicatifs des indices dérivés à partir de l'HGPO

LISTE DES ABRÉVIATIONS

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
IMC : Indice de Masse Corporelle
IRS : substrat du récepteur à l'insuline
TT : tour de taille
TH : tour de hanche
LPL : lipoprotéine lipase
FAS : *fatty acid synthase*
AGNE : acides gras non estérifiés
VLDL : *very low density lipoprotein*
HSL : *hormone sensitive lipase*
ROS : *reactive oxygen species*
DAG : diacyl-glycérol
PKC : protéine kinase C
SOPK : syndrome des ovaires polykystiques
TZD : thiazolidinédiones
ASC_{dAGNE} : aire sous la courbe décroissante
%suppAGNE : pourcentage de suppression d'AGNE
PenteLnAGNE : logarithme népérien de la pente d'AGNE
ΔAGNE : delta AGNE
FSiVGT : *frequently sampled intravenous glucose tolerance test*
DT2 : diabète de type 2
GLY : *glycerol*
EC50 : *estimated concentration at 50 %*
HGPO : hyperglycémie provoquée par voie orale
T50_{AGNE} : temps nécessaire pour supprimer 50 % des AGNE de base
PPAR γ : *peroxysome proliferator activated receptor γ*
MGT : masse grasse totale
IMG : index de masse grasse
FPG : *fasting plasma glucose*
FPI : *fasting plasma insulin*
WHR : *waist to hip ratio*

CHAPITRE I : INTRODUCTION

La prévalence de l'obésité et des maladies liées ne cesse d'augmenter. Elle représente l'une des causes sous-tendant la plupart des pathologies métaboliques (Renehan *et al.*, 2008). Les données présentées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), de 2008, indiquaient des chiffres alarmants d'atteinte de surplus de poids (Allison *et al.*, 2008). Ces données suggèrent que l'obésité adulte représente environ 1,4 milliards (1/5) de la population mondiale. Ainsi, l'OMS recense, chaque année, 2,8 millions de décès dans le monde due aux conséquences du surpoids et de l'obésité (Hill, 2006).

Les conséquences néfastes de l'obésité sont caractérisées par la conjonction, souvent modérée, de troubles d'origine glucidique (résistance à l'insuline), lipidiques (dysfonction du tissu adipeux) et vasculaires (athérosclérose) qui sont, la plupart du temps, associés à la surcharge pondérale (Hill, 2006, Virtue and Vidal-Puig, 2008). La résistance à l'insuline est définie comme étant une incapacité des tissus insulino-sensibles (foie, muscles et tissu adipeux principalement) à répondre efficacement à des concentrations physiologiques d'insuline (Cryer *et al.*, 2009). Tandis que la dysfonction du tissu adipeux est caractérisée par un ensemble d'anomalies comme : une différenciation adipocytaire anormale avec hypertrophie, une infiltration du tissu adipeux par des cellules inflammatoires telles que les macrophages, une accumulation plus importante du tissu adipeux viscéral, ainsi qu'une sécrétion accrue d'adipokines pro-inflammatoires et diabéto-gènes (Bluher, 2009). Toutefois, la résistance à l'insuline et la dysfonction du tissu adipeux ne sont pas des conditions *sine qua non* à l'obésité car il existe des gens d'apparence mince qui présentent les mêmes anomalies métaboliques (Despres, 2012). Il a été démontré que l'exposition des personnes en bonne santé générale à des niveaux supraphysiologiques de gras circulants, augmente la résistance à l'insuline à des niveaux comparables à ceux observés chez les diabétiques (Belfort *et al.*, 2005).

En effet, chez les patients atteints de diabète de type 2 ainsi que chez les non diabétiques mais insulino-résistants, les niveaux d'acides gras circulants sont élevés (Schalch and Kipnis, 1965). Il est également connu que le taux d'acides gras circulant est élevé en présence d'une

dysfonction du tissu adipeux (Petersen and Shulman, 2006). Ces auteurs, comme d'autres, suggèrent que les acides gras en excès, dans les tissus maigres, affectent négativement le mécanisme de transduction du signal insulinaire menant à la phosphorylation en sérine/thréonine des substrats de récepteurs à l'insuline (IRS) qui aura comme conséquence, un blocage de la transmission du signal intracellulaire de l'insuline. Il a été démontré que la réduction des niveaux de gras par l'acipimox (médicament régulateur des lipides du groupe de l'acide nicotinique agissant en inhibant la libération des lipides à partir du tissu adipeux), chez les patients atteints de diabète de type 2 (DT2), améliore la résistance à l'insuline (Bajaj *et al.*, 2005)

Ainsi, l'insuline est un régulateur de plusieurs aspects de la biologie adipocytaire qui représente l'une des cibles les plus sensibles à l'insuline. Étant une hormone anabolisante, l'insuline agit en stimulant le stockage des acides gras en triglycérides dans les adipocytes, mais également en empêchant leur clivage en acides gras via l'inhibition de la lipolyse. La diminution de l'action antilipolytique de l'insuline peut donc conduire à des niveaux élevés d'acides gras en circulation. Il a été montré que l'injection d'un agent suppresseur de la lipolyse, l'acide nicotinique, chez des rats à jeun, dans l'optique de diminuer la concentration plasmatique d'acides gras libres avant la perfusion du glucose, améliorerait la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose (Carpentier, 2013). De plus, il semblerait que l'exposition chronique des îlots de Langerhans aux acides gras induit une diminution de la sécrétion de l'insuline (Baillargeon *et al.*, 2004). Suite à ce traitement, les îlots sont remplis de triglycérides et 50% de mortalité cellulaire en résulte (Despres, 2012, Nellesmann *et al.*, 2012). Ainsi, la surcharge lipidique des tissus maigres peut être la conséquence soit d'une augmentation de l'apport en gras, une lipolyse mal inhibée et/ou une augmentation mal contrôlée de la lipogénèse (DeFronzo *et al.*, 1979, Nellesmann *et al.*, 2012).

Malgré le rôle important de l'homéostasie lipidique pour le développement du diabète de type 2 ainsi que les bénéfices reconnus de plusieurs traitements ciblant la résistance à l'insuline, il n'existe pas de paramètres ou d'indices spécifiques validés ou reconnus pour mesurer l'action anti-lipolytique de l'insuline, d'une manière efficace, rapide et peu coûteuse, à l'aide d'outils existants.

I.1 L'OBÉSITÉ

I.1.1 Définition

L'obésité est une condition métabolique durant laquelle l'accumulation de gras est responsable de troubles physiques, mentaux et sociaux (Hassan *et al.*, 2012). Il s'agit d'un problème de santé publique dont l'importance nous oblige, en tant que professionnels de la santé, à sensibiliser la population à sa prévention et sa prise en charge (Allison *et al.*, 2008, Haslam, 2007, Revelo *et al.*, 2014).

Le déséquilibre entre l'apport et la dépense énergétique serait responsable de l'expansion du tissu adipeux que l'on retrouve dans le cas de l'obésité ou de surplus de poids (Stein and Colditz, 2004). En réponse à ce déséquilibre, le tissu adipeux s'adapte en s'hyperplasiant (augmentation du nombre d'adipocytes) et/ou en s'hypertrophiant (augmentation de la taille d'adipocytes) (Sun *et al.*, 2011). Ces réponses au déséquilibre énergétique de l'individu varient selon des facteurs génétiques ou épigénétiques et peuvent être mal adaptées, entraînant d'importantes complications métaboliques.

I.1.2 Mesure de l'obésité

Afin de quantifier l'accumulation excessive du tissu adipeux et relier cette dernière au risque cardiovasculaire, l'OMS a établi des seuils basés sur le calcul du principal indicateur de l'obésité qui est l'indice de masse corporelle (IMC; kg/m^2) selon le tableau 1 (Katzmarzyk, 2002, Lau *et al.*, 2007) :

Tableau 1. Classification de l'obésité en fonction de l'IMC

IMC (Kg/m^2)	Statut
> 18,5	Individu en état de maigreur
De 18,5 à 24,9	Individu de poids proportionnel à sa taille
De 25 à 29,9	Individu en <i>surcharge pondérale</i>
De 30 à 34,9	Individu en <i>obésité modérée</i>
De 35 à 39,9	Individu en <i>obésité sévère</i>
Au-delà de 40	Individu en <i>obésité morbide</i>

L'IMC ne tient pas compte de la distribution de la masse grasse par contre. Or, il a été démontré que la mesure de la disposition androïde du gras (Figure 1), représentée par le tour de taille (TT), serait un meilleur prédicteur de la santé cardiométabolique (Despres and Lemieux, 2006, Janssen *et al.*, 2004). Le seuil de TT actuellement utilisé au Canada permettant de déterminer la présence d'obésité abdominale est de 102 cm pour les hommes et 88 cm pour les femmes (Lau *et al.*, 2007).

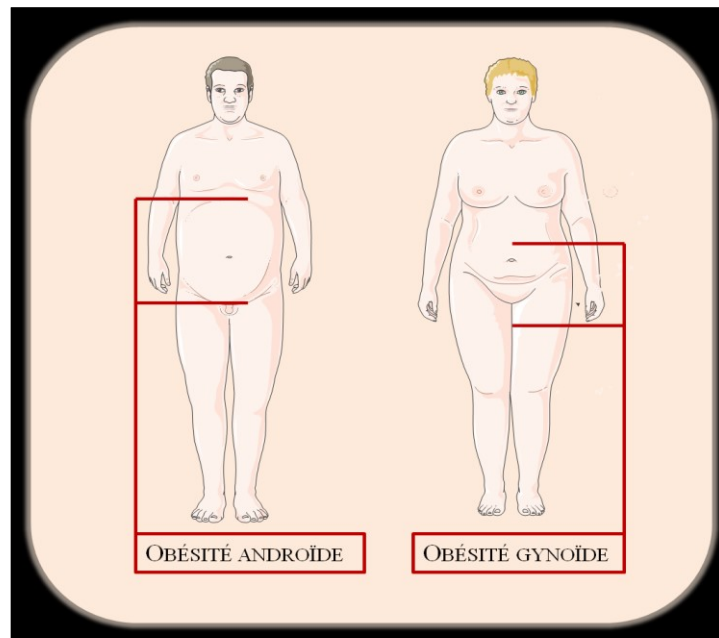


Figure 1. Obésité de type androïde et de type gynoïde.

Chacune d'elle mène à un IMC élevé. La différence est la distribution du gras qui est plus prononcée au niveau des hanches chez les femmes, en générale, et au niveau de l'abdomen, chez les hommes.

Plusieurs études ont démontré la relation entre la présence du risque cardiométabolique et la disposition androïde du gras corporel (Lapidus *et al.*, 1984, Marin *et al.*, 1992, Seidell *et al.*, 1990). Foo *et al.*, ont démontré que le TT serait un bon indicateur du risque cardiovasculaire élevé, comparativement à la mesure automatisée par le scanner DXA (Dual Energy X-ray absorptiometry), qui constitue l'étalon d'or pour la mesure de l'adiposité (Foo *et al.*, 2013). D'autres auteurs ont aussi démontré que la quantité et la qualité du gras viscéral, localisé dans la région abdominale, serait un paramètre important pour le développement de maladies métaboliques (Janssen *et al.*, 2004, Weyer *et al.*, 2000). Cela explique l'importance de la

mesure du TT, utilisé dans ce mémoire comme l'un des paramètres anthropométriques importants, plutôt qu'utiliser l'IMC seul, pour la prédiction de la dysfonction adipeuse.

En plus du TT, il a été démontré qu'une augmentation du rapport TT/TH (TH = tour de hanche) peut aussi être associée à la présence d'une résistance à l'insuline et serait témoin d'une mauvaise répartition de gras dans le corps (Sharma and Kushner, 2009). Par contre, étant donné l'hétérogénéité de l'obésité, plusieurs investigateurs préfèrent utiliser le TT comme étant un marqueur plus simple de l'obésité viscérale (Janssen *et al.*, 2004, Tchernof and Despres, 2013) et démontrent qu'il serait un des meilleurs prédicteurs pour le développement de la résistance à l'insuline liée à une mauvaise distribution de gras (Weyer *et al.*, 2000). Pr. Després montre également que la mesure du TT représente un indice simple et pratique pour la mesure du gras viscéral (Tremblay *et al.*, 2004).

Donc autant pour ses complications importantes sur la santé des personnes affectées, il est important de déterminer ce qui cause la dysfonction du tissu adipeux et ses conséquences lipotoxiques afin de pouvoir la prévenir et guérir.

I.2 PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DYSFONCTION DU TISSU ADIPEUX

L'homéostasie énergétique est un élément clé pour le fonctionnement du corps humain. Il s'agit d'un état d'équilibre respecté entre les entrées (apports) et les sorties (dépenses) de carburants (Martin-Gronert and Ozanne, 2013). Durant la prise alimentaire, nous pouvons ingérer des quantités variables de protéines, lipides ainsi que de glucides. Les tissus capturent ces substrats énergétiques et ensuite les emmagasinent ou bien les utilisent, en fonction du besoin (Scow *et al.*, 1980). Le gras emmagasiné peut être libéré en circulation suite au processus de lipolyse (Large *et al.*, 2004). Donc, le gras circulant peut avoir plusieurs provenances.

I.2.1 Origine du gras

I.2.1.1 Alimentaire

Le gras alimentaire est l'une des plus importantes sources d'énergie corporelle, soit plus de 9 kcal/g de gras, ce qui représente le double de la contribution des hydrocarbures et des protéines pour le même poids (4 kcal/g) (Hui *et al.*, 2008, Wang, 2007). Ces sources d'énergie alimentaires sont emmagasinées sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux (Hui *et al.*, 2008).

Le gras ingéré subit d'abord une première digestion par les enzymes stomacales où différents aliments sont mélangés ensemble (Figure 2). La résultante de cette digestion est une émulsion de lipides qui gagnera la lumière intestinale sous forme de fines gouttelettes pouvant être altérées par le jus pancréatique (lipases) (Ninomiya *et al.*, 2004). Les lipases (gastrique, pancréatique et celles de la bordure en brosse de l'intestin), les co-lipases, les estérases du cholestérol, les phospholipases A2 ainsi que les sels biliaires assurent une meilleure digestion (ou préparation à l'absorption) des lipides ingérés en permettant la formation de micelles (Figure 2). Ces dernières sont des gouttelettes lipidiques contenant des monoglycérides, du cholestérol, des acides gras libres et des vitamines liposolubles. Les micelles gagnent ainsi la lumière intestinale et aident à l'absorption du contenu lipidique (Ninomiya *et al.*, 2004). La surface phospholipidique des micelles leur confère la capacité de fusion membranaire à la face apicale des cellules intestinales et, ainsi, libérer leur contenu en gras (Poirier *et al.*, 1996). Cela représente un des mécanismes principaux d'ingestion de gras alimentaires. Il existe également d'autres mécanismes impliquant des protéines membranaires, telles que les FABP (*Fatty Acid Binding Protein*), permettant la capture des micelles et favorisant leur vidange dans la cellule intestinale (Poirier *et al.*, 1996) (Figure 2).

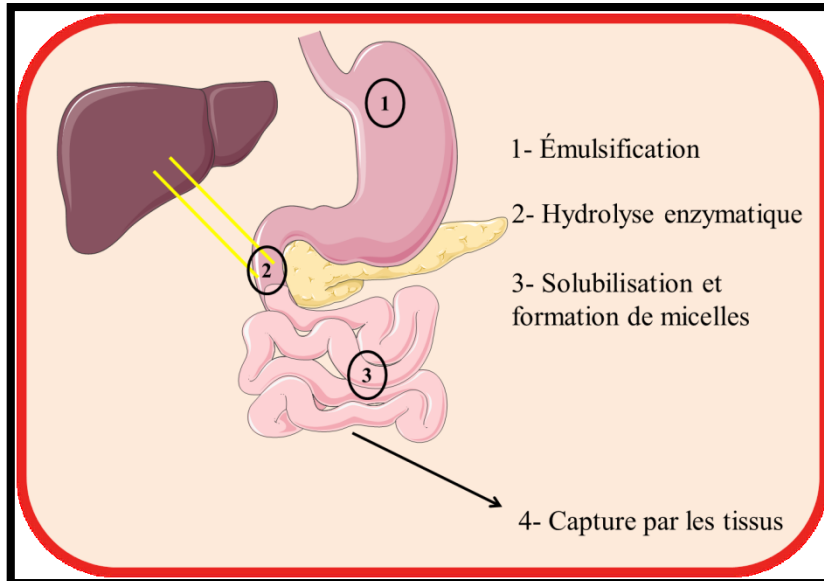


Figure 2. Parcours du gras alimentaire dans le tube digestif.

Dans la cellule intestinale, les acides gras seront ré-estérifiés en triglycérides (Frayn *et al.*, 2003) via l'action de la diacylglycérol acyltransférase localisée à la surface du réticulum endoplasmique. Les triglycérides ainsi formés seront intégrés dans les chylomicrons (Frayn *et al.*, 1994), composés à 60 % de triglycérides et 15 % de cholestérol, associés principalement à l'apolipoprotéine B48. Les chylomicrons formés empruntent la voie du canal lymphatique pour atteindre la circulation systémique. Il a été démontré que les niveaux sériques des chylomicrons sont augmentés après l'ingestion d'un repas et que ces niveaux sont reliés à la qualité riche en gras du repas ingéré (Frayn *et al.*, 2003).

Une fois distribué dans les tissus, le gras ingéré peut avoir un devenir variable selon le besoin de l'organisme et peut donc soit être estérifié (foie, muscles cœur principalement), redistribué (à partir du tissu adipeux) ou bien β -oxydé (Frayn *et al.*, 1994, Large *et al.*, 2004). Dans l'interstitium du tissu adipeux, les triglycérides contenus dans les chylomicrons seront d'abord hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) pour ensuite libérer leur contenu en acides gras qui seront emmagasinés, dans l'adipocyte, sous forme de triglycérides, grâce à l'action d'un complexe multi-enzymatique appelé triglycéride synthétase (Frayn *et al.*, 2003, Sadur and Eckel, 1982) (Figure 3). Toutefois, même si l'alimentation représente la plus grande source de gras, le tissu adipeux peut aussi en synthétiser.

I.2.1.2 Lipogenèse de *novo*

Il s'agit d'une voie de synthèse d'acides gras par l'organisme suite à un excès d'apport en substrats énergétiques autres que les gras (glucose et acides aminés) (Bjorntorp and Sjostrom, 1978, Schwarz *et al.*, 2003). Dans les conditions normales (i.e. sans état pathologique particulier), la lipogénèse *de novo* serait principalement hépatique et adipeuse (Figure 3). Il est connu qu'un excès d'apport en hydrates de carbone entraîne une augmentation des niveaux de triglycérides circulants (Bjorntorp and Sjostrom, 1978, Wang *et al.*, 2013).

La lipogénèse est un processus durant lequel le gras est synthétisé à partir de précurseurs métaboliques lorsque la balance énergétique est positive (Hellerstein *et al.*, 1991). Suite à la dégradation d'une molécule de glucose, le citrate du cycle tricarboxylique peut être transformé en acétyl-CoA via l'action de l'adénosine tri-phosphate-citrate lyase, qui sera par la suite carboxylé en malonyl-CoA sous l'action de l'acétyl-CoA carboxylase (Hellerstein *et al.*, 1996, Mao *et al.*, 2006). L'étape suivante implique l'intervention de la *fatty acid synthase* (FAS) et représente l'étape limitante de la série de conversions du malonyl-CoA en palmitate (Ginsburg, 1972). Le palmitate est un acide gras saturé à 16 carbones à partir duquel tous les autres acides gras non essentiels peuvent être synthétisés.

Les AGNE captés par le foie subissent une réaction d'estérification à l'aide d'une enzyme appelée la triglycéride-synthétase qui est fortement activée par l'insuline (Tessari *et al.*, 2009). Les triglycérides résultants seront intégrés dans des particules appelées les VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), qui sont des lipoprotéines riches en gras (Petta *et al.*, 2009) afin d'être acheminés aux tissus périphériques (Lafontan, 2008). Naturellement, la synthèse de lipides *de novo* se fait d'une manière continue et sera exacerbée après ingestion d'un repas (Figure 3).

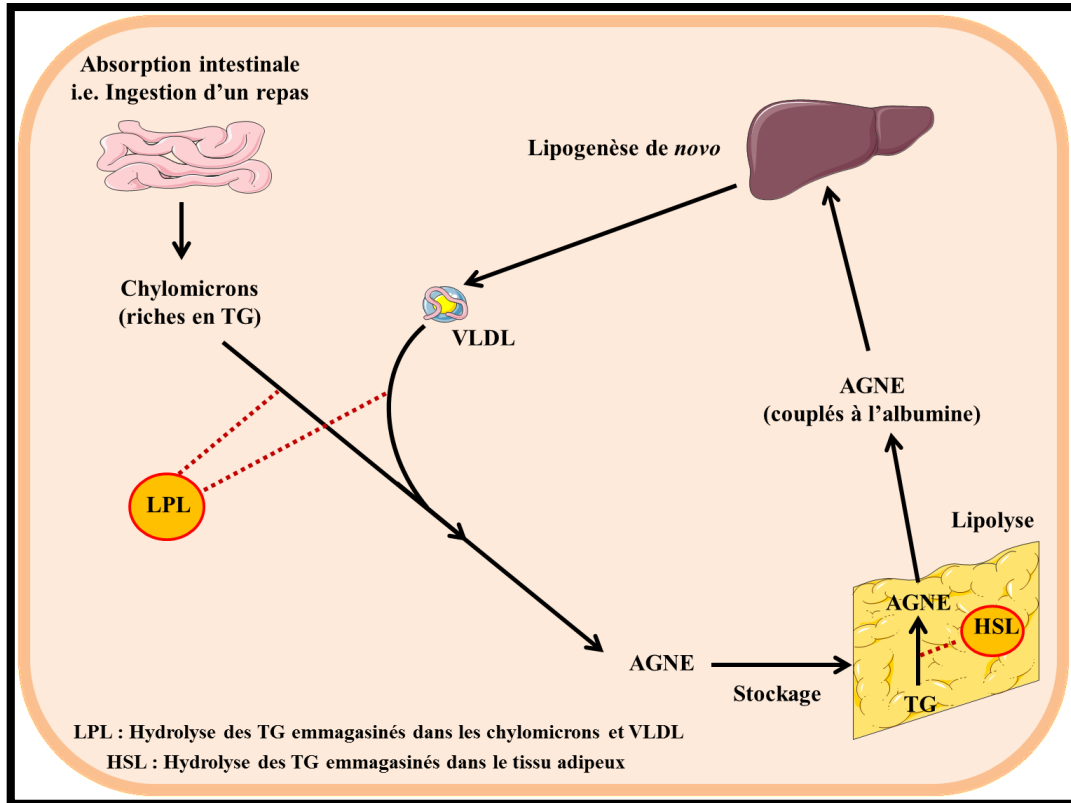


Figure 3. Absorption, distribution et emmagasinage du gras alimentaire (adapté de (Venkatesan *et al.*, 2013)).

Les VLDL synthétisés au niveau hépatique, sont riches en triglycérides pouvant atteindre le tissu adipeux. Les triglycérides véhiculés par les VLDL au tissu adipeux subissent l'action hydrolytique de la LPL endothéliale afin de libérer le contenu en AGNE, qui seront captés par les adipocytes. Par contre, en situation de jeûne, l'activité de la HSL (*Hormone Sensitive Lipase*) sera prédominante et favorisera la libération des AGNE à partir des triglycérides intra-adipocytaires et non leur stockage (Figure 3).

I.2.2 Mécanismes impliqués dans le développement de la dysfonction du tissu adipeux

I.2.2.1 Rôle de l'hypertrophie/hyperplasie du tissu adipeux

Le tissu adipeux a une capacité de remodelage structural permanent impliquant la maturation d'adipocytes ainsi que leur multiplication. La connaissance de la physiologie de ce remodelage a permis de mieux comprendre les désordres structuraux et fonctionnels retrouvés lors d'une dysfonction du tissu adipeux (Spalding *et al.*, 2008). Par exemple, suite à un apport énergétique excessif, le tissu adipeux répond d'une manière dynamique par l'intermédiaire d'une augmentation de la taille (hypertrophie) et/ou du nombre d'adipocytes (hyperplasie) (Sun *et al.*, 2011). La Figure 5 résume cette plasticité du tissu adipeux.

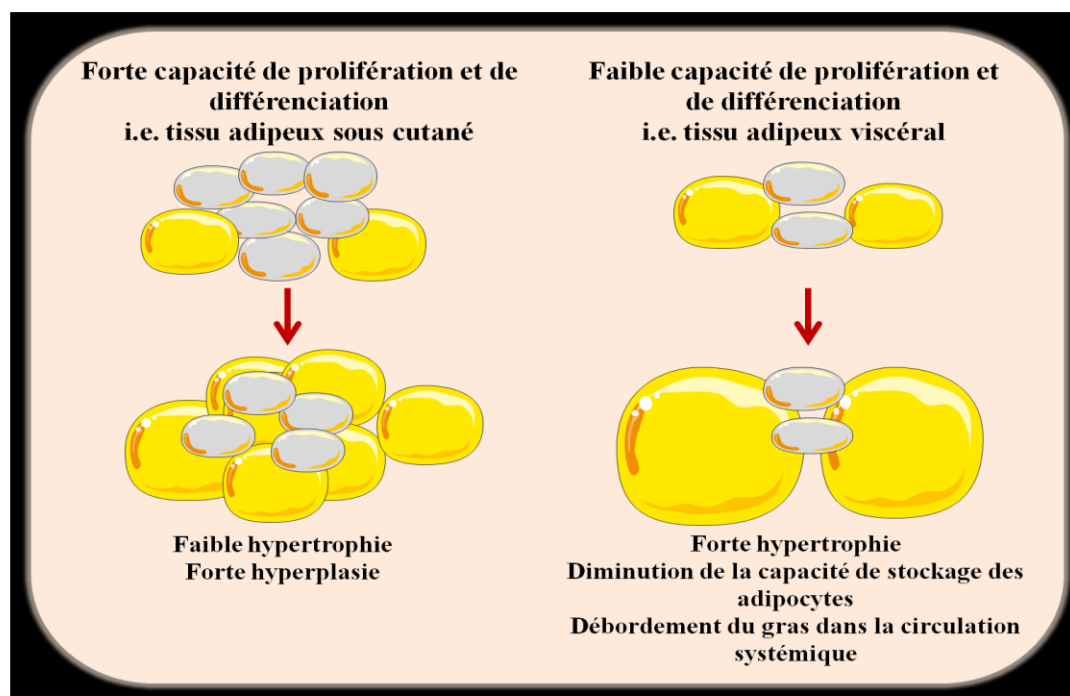


Figure 5. Plasticité du tissu adipeux.

Les adipocytes de plus grande taille ont une capacité de stockage plus élevée mais sont moins nombreux dans le tissu adipeux viscéral. Les adipocytes sous cutanés sont en majorité hyperplasiés avec une faible capacité de stockage en gras (adaptée de (Slawik and Vidal-Puig, 2006)).

En effet, il a été démontré qu'une fois que le nombre d'adipocytes augmente par hyperplasie, la régulation à la baisse semble être difficile à atteindre, durant l'âge adulte et ce, même après une réduction du poids corporel (Spalding *et al.*, 2008). D'autre part, et dans le processus hypertrophique du tissu adipeux, les adipocytes augmentent de volume et atteignent ainsi une capacité de stockage maximale en gras (i.e. saturation, expansion maximale) (Bluher, 2009). Leurs noyaux étant aplatis et le restant du cytoplasme étant comprimé, ces adipocytes n'ont

plus la capacité de se multiplier pour diminuer leur charge en gras, ce qui aura comme conséquence, une résistance à l'action antilipolytique de l'insuline (Tchernof, 2007).

Par conséquent, le gras circulant sera ainsi remis en circulation pour atteindre les tissus périphériques entraînant un flux excessif en gras dans ces tissus (Drolet *et al.*, 2008). La conséquence serait le développement de dommages tissulaires menant à la dysfonction de l'organe, soit la lipotoxicité (Carpentier, 2008, Tchernof and Despres, 2013).

Toutefois, ces limites de l'expansionabilité du tissu adipeux ne concernent pas uniquement les obèses car il existe des sujets obèses métaboliquement normaux ainsi que des sujets minces métaboliquement anormaux. Fabbrini. *et al.*, ont démontré que la suppression de la lipolyse médiée par l'insuline est significativement diminuée chez les sujets obèses insulino-résistants comparativement à celle des sujets non insulino-résistants du même IMC (Fabbrini *et al.*, 2009). Dans l'étude du Pr. Tchernoff, il a été démontré que certaines femmes minces avaient également une atteinte de la capacité de stockage du tissu adipeux, ce qui suggère que la dysfonction adipeuse et ses conséquences lipotoxiques peuvent également survenir chez les sujets non obèses (Tchernof and Despres, 2013). En effet, en plus du rôle clé de l'hyperplasie/hypertrophie des adipocytes dans le développement de la dysfonction adipeuse et ses conséquences lipotoxiques, il semblerait que la localisation du tissu adipeux joue un rôle important sur sa capacité fonctionnelle (Figure 5).

I.2.2.2 Influence de la localisation du TA sur ses fonctions de stockages

Un autre paramètre important à considérer pour le développement de la dysfonction adipeuse est la localisation (répartition) du gras dans le corps (Lee *et al.*, 2014). Il a été démontré que la plasticité du tissu adipeux peut varier en fonction de sa localisation (Lee *et al.*, 2014). En clinique, l'obésité androïde signifie une localisation intra-abdominale des graisses (Figure 1). La graisse abdominale (compartiments extra et intrapéritonéal; mésentérique et omental) (Abate *et al.*, 1995) serait un site important des perturbations métaboliques et semble être en lien avec l'augmentation du risque de la résistance à l'insuline et les complications cardiovasculaires; contrairement à la graisse sous-cutanée dont la fonction principale est le stockage

de l'énergie (Lee *et al.*, 2014, Tchernof and Despres, 2013). Le tissu adipeux abdominal est composé des tissus adipeux sous-cutanés et intra-abdominal. Ce dernier est composé de tissu viscéral et non-viscéral. Le tissu adipeux viscéral (1/5 du total corporel) représente les dépôts de gras thoracique, de la cavité pelvienne ainsi que celui de l'abdomen. Tandis que le tissu adipeux non-viscéral est plutôt intra- et périmusculaire (Abate *et al.*, 1995). Toutefois, une des différences les plus importantes à mentionner entre ces deux types de tissus adipeux est que le gras viscéral a une capacité de lipolyse élevée par rapport au gras cutané (Lee *et al.*, 2014, Tchernof and Despres, 2013).

En effet, selon la théorie de la veine porte (hypothèse portale) (Item and Konrad, 2012), les tissus adipeux mésentérique et omental étant drainés par la veine porte directement vers le foie vont participer de façon plus importante aux fonctions métaboliques de celui-ci, comparativement au tissu adipeux non-viscéral, qui a un drainage systémique (Item and Konrad, 2012, Lafontan, 2008). Ainsi, les niveaux élevés d'acides gras semblent être en association avec une production hépatique élevée en glucose et avec une augmentation de la synthèse hépatique de triglycérides (Item and Konrad, 2012). Toutefois, en cas de lipolyse diminuée (insulinémie basse ou bien une résistance à l'insuline pour la lipolyse), les niveaux d'acides gras libres sont élevés en circulation et seraient associés à la résistance à l'insuline (Roden *et al.*, 2000, Staehr *et al.*, 2003). D'autres études suggèrent que l'activité antilipolytique de l'insuline semble être réduite dans les tissus adipeux viscéraux par rapport à celle du tissu adipeux sous-cutané (Bergman *et al.*, 2001, Hellmer *et al.*, 1992, Tchernof *et al.*, 2006, Wahrenberg *et al.*, 1989). Cela favoriserait la lipolyse surtout à l'état de jeûne et aussi un défaut de suppression de lipolyse par l'insuline en situation postprandiale, ce qui amène à un débordement d'acides gras libres en circulation. Tout cela contribue à la surcharge en acides gras des tissus maigres, entraînant une augmentation de la production hépatique de glucose et une résistance à l'action inhibitrice de la gluconéogenèse par l'insuline, mais aussi dans les autres tissus exposés. De plus, des auteurs ont démontré une régulation négative de l'expression de la HSL chez les patients présentant une obésité abdominale (Despres, 2001, Jocken *et al.*, 2007). Ces données suggèrent que le tissu adipeux viscéral (celui qui présente le plus de résistance à l'action antilipolytique de l'insuline) serait un contributeur important de la résistance à l'insuline pour la lipolyse.

Du point de vue structural, le tissu adipeux sous-cutané semble avoir une architecture lobulaire bien définie, contrairement au tissu adipeux viscéral (Boivin *et al.*, 2007). Ainsi, Weyer *et al.* ont démontré que la présence d'adipocytes hypertrophiés pourrait prédire la survenue du diabète de type 2, sans nécessairement la présence d'un état d'obésité (Weyer *et al.*, 2000). De ce fait, il semble exister un lien entre la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse ainsi que le désordre métabolique du tissu adipeux.

I.3 RELATION ENTRE LA DYSFONCTION DU TISSU ADIPEUX ET LA RÉSISTANCE À L'INSULINE

Avec la dysfonction de la cellule β , la résistance à l'insuline pour le glucose caractérise le diabète de type 2 et de plus en plus d'études suggèrent qu'elle serait liée à la dysfonction du tissu adipeux (Garg, 2004, Item and Konrad, 2012) (Figure 6). Étant donné que l'insuline est l'hormone principale en cause, nous allons, en premier lieu, effectuer un survol de son origine et de ses différentes fonctions, ensuite nous entamerons le lien entre l'altération de la fonction antilipolytique de l'insuline (suppressive des acides gras) et la résistance à l'insuline (Figure 4).

I.3.1 L'insuline

En tant qu'hormone anabolisante, l'insuline a comme principaux tissus cibles le foie, le muscle et le tissu adipeux (De Meyts, 2004). Elle est composée de 51 acides aminés assemblés en deux chaînes polypeptidiques (chaîne A de 21 acides aminés; chaîne B de 30 acides aminés) qui sont reliées entre elles par deux ponts disulfures (De Meyts, 2004).

I.3.2 Biosynthèse de l'insuline

Dans la cellule β du pancréas, le principal précurseur de l'insuline est la préproinsuline. Cette dernière doit être transloquée au réticulum endoplasmique afin d'être clivée par les enzymes microsomales en proinsuline (De Meyts, 2004). Ensuite, la proinsuline sera emmagasinée dans les granules de sécrétion de l'appareil de Golgi pour sa maturation. Durant ce processus,

la proinsuline sera fixée à des protéines structurales appelées clathrines (Steiner *et al.*, 2009). La perte de ces dernières exposera la proinsuline aux enzymes de clivage protéolytique dont l'action résulte en la formation du peptide C et de l'insuline, en quantité équimolaire (De Meyts, 2004, Steiner *et al.*, 2009).

I.3.3 Sécrétion de l'insuline

En condition basale, avant les repas, la faible quantité de l'insuline circulante témoigne d'un état d'équilibre entre sa production et sa sécrétion et aussi d'une quantité de glucose circulante qui n'est pas assez élevée pour stimuler la sécrétion de l'insuline (Duman and Forte, 2003, Prentki and Nolan, 2006).

En effet, une glycémie élevée stimule une sécrétion biphasique de l'insuline. La phase précoce serait en réponse à l'augmentation brusque des niveaux de glucose dans le sang. Cela correspond à la vidange des granules de sécrétion qui emmagasinent l'insuline à l'intérieur de la cellule β du pancréas (Getty *et al.*, 1998).

La seconde phase est plutôt celle favorisant le maintien de la production et de la sécrétion de l'insuline (Getty *et al.*, 1998). Celle-ci est en réponse à une glycémie qui est encore maintenue élevée en circulation. Le glucose, le stimulant de l'insuline le plus efficace, est transporté à l'intérieur de la cellule β grâce à la présence de transporteurs membranaires toujours présents à la membrane. La molécule de glucose subit alors un catabolisme glycolytique afin de générer des molécules d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) augmentant ainsi le rapport ATP/ADP (i.e, Adénosine Di-Phosphate) (Getty *et al.*, 1998). L'augmentation des niveaux d'ATP favorise le maintien de la fermeture des canaux potassiques et ainsi la dépolarisation membranaire suite à l'augmentation de la concentration intracellulaire de potassium (Prentki and Nolan, 2006). La dépolarisation membranaire entraîne une ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et une entrée de calcium. En effet, le calcium est un second messenger intracellulaire entraînant l'activation de cascades de signalisation spécifiques permettant la mise en place de microfilaments matriciels. Ces

derniers seront responsables de la translocation des granules de sécrétion de l'insuline mature vers la membrane cellulaire pour une éventuelle sécrétion (Prentki and Nolan, 2006).

I.3.4 Fonctions de l'insuline

I.3.4.1 Fonction glucorégulatoire de l'insuline

Le glucose est le substrat énergétique par excellence du corps humain. Tous les tissus de notre corps utilisent le glucose pour satisfaire leurs besoins énergétiques et leurs fonctions spécifiques. Les organes nobles, particulièrement le cerveau, sont très sensibles aux variations de la glycémie. En effet, une hypoglycémie sévère peut entraîner des conséquences graves telles que des convulsions et provoquer de l'inconscience allant jusqu'à la mort de l'individu (Cryer *et al.*, 2009). Inversement, une augmentation aiguë de la glycémie peut être une cause de consultation en urgence et, si l'état d'hyperglycémie demeure chronique, cela causera des complications dites microvasculaires, comme la néphropathie, la rétinopathie et la neuropathie; ainsi que des complications macrovasculaires, telles que la maladie coronarienne, les accidents vasculaires cérébraux et autres (Pellerin, 2010).

Le contrôle strict de la glycémie est donc très important pour le bon fonctionnement de notre organisme (Pellerin, 2010). Il est connu que l'homéostasie glucidique repose sur un équilibre entre la capture du glucose par les tissus ainsi que sa production hépatique pour éviter les états extrêmes d'hypo- et d'hyperglycémie (Foretz *et al.*, 2005). Cependant, la régulation de la glycémie demeure un élément variable selon l'état de jeûne ou postprandial.

En état de jeûne, la seule réserve en sucres dans les tissus est le glycogène (Woerle *et al.*, 2003). Ce dernier doit être clivé en molécules de glucose pour être distribué aux tissus à travers la circulation systémique. En effet, la glycogénolyse est présente dans le foie et le muscle (Woerle *et al.*, 2003). Il est à noter que c'est majoritairement le foie qui relâche du glucose dans la circulation systémique en raison de l'absence de l'enzyme permettant la déphosphorylation du glucose-6-phosphate en glucose dans la plupart des autres tissus. De

ce fait, la mesure de la production hépatique de glucose est un élément important lors des études métaboliques en recherche clinique (Mandarino *et al.*, 1995).

À l'état postprandial, les niveaux élevés de glucose entraînent une augmentation de la sécrétion et de la production d'insuline (Bock *et al.*, 2006) Étant une hormone anabolisante, l'insuline stimule la glycogénogenèse hépatique à partir de molécules de glucose (Kelley *et al.*, 1988). Au niveau musculaire, l'insuline agit aussi en augmentant la capture de glucose qui sera converti en glucose-6-phosphate par l'hexokinase. Selon les besoins du muscle, le glucose-6-phosphate peut soit être dégradé pour produire de l'énergie, via la glycolyse, ou bien être polymérisé en glycogène pour une éventuelle utilisation (Kelley *et al.*, 1988). Il est important de noter que la glycogénogenèse est fortement régulée par l'insuline qui stimule la *glycogen synthase*, l'enzyme responsable de l'étape limitante de ce processus anabolique (Woerle *et al.*, 2003).

Au niveau du tissu adipeux, la capture du glucose est augmentée en situation postprandiale (Woerle *et al.*, 2003). Par contre, cette action semble être minoritaire par rapport à la capture musculaire et hépatique de glucose. En effet, en situation postprandiale, l'insuline agit surtout en inhibant la lipolyse intracellulaire afin de diminuer l'exposition des tissus aux AGNE, mais la présence du glucose dans le tissu adipeux permet la production du glycérol qui est nécessaire pour emmagasiner les AGNE sous forme de triglycérides (Dimitriadis *et al.*, 2011). Il a par ailleurs été montré que les AGNE semblent atténuer l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production hépatique de glucose (Dimitriadis *et al.*, 2011).

I.3.4.2 Fonction de régulation des lipides de l'insuline

Les AGNE peuvent être mobilisés depuis leur site de stockage, soit le tissu adipeux. Étant donné qu'ils sont emmagasinés sous la forme condensée de triglycérides, ces derniers doivent être hydrolysés afin de libérer leur contenu en AGNE (Figure 4). Deux hormones principales sont importantes pour la régulation du flux des AGNE dans le tissu adipeux, soit la HSL et la LPL. Ces deux hormones sont fortement régulées par l'insuline, dépendamment des besoins énergétiques (Frayn, 2002).

La HSL est une protéine cytoplasmique de 84 kDa qui a une activité hydrolase pour les triglycérides mais aussi pour les diacylglycérols (DAG). Cette hormone est inhibée par l'insuline et, de ce fait, est activée lors du jeûne car les niveaux d'insuline ne sont pas assez élevés pour inhiber complètement son activité. Donc, la HSL participe à la libération des AGNE depuis le tissu adipeux lors du jeûne, afin qu'ils puissent être utilisés en tant que substrats énergétiques par les tissus périphériques (Coppack *et al.*, 2001).

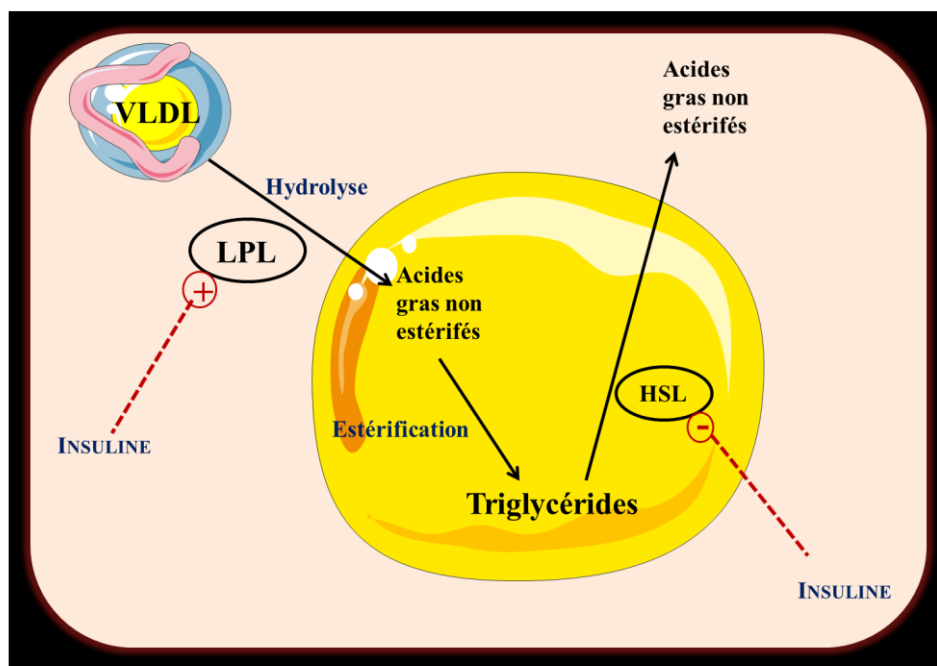


Figure 4. Régulation de la lipogénèse par l'insuline.

Dans un état de sensibilité à l'insuline normal, cette dernière active la LPL et inhibe la HSL favorisant ainsi le stockage du gras et son estérification en triglycérides (adaptée de (McQuaid et al., 2011)).

Les triglycérides sont véhiculés dans le sang via un transporteur lipoprotéinique (Coppack *et al.*, 2001) (Figures 3-4). Étant de grosses particules, les lipoprotéines ne peuvent entrer dans le tissu adipeux. Afin de libérer leur contenu en AGNE, une hydrolyse enzymatique de triglycérides contenus dans les lipoprotéines par la LPL est nécessaire (Wang, 2007). Il s'agit d'une enzyme synthétisée dans l'adipocyte et transloquée jusqu'à sa surface membranaire. La LPL est ainsi libérée dans l'endothélium capillaire du tissu adipeux où elle s'amarre sur des structures d'héparine sulfate. À cet endroit, les macromolécules lipidiques sont alors exposées à l'hydrolyse par la LPL, ce qui résulte en la libération des AGNEs et de glycérols

(Fielding and Frayn, 1998, Olivecrona and Olivecrona, 2010). Les AGNE peuvent entrer dans l'adipocyte à l'aide de protéines membranaires mais aussi par gradient de diffusion. Par contre, le glycérol se déposera dans le foie où il sera utilisé en tant que substrat glucoformateur durant le processus de néoglucogénèse (Stahl *et al.*, 2001). Étant donné qu'une molécule de triglycérides contient 3 acides gras et un glycérol, des auteurs ont utilisés le rythme d'apparition du glycérol en tant que marqueur de la lipolyse adipocytaire et intravasculaire (Albu *et al.*, 1999).

L'insuline régule la lipolyse du tissu adipeux en stimulant la synthèse de la LPL (Figure 4) et son exportation vers les capillaires du tissu adipeux afin de favoriser la capture du gras par le tissu adipeux (Peeva *et al.*, 1992). Cette action est surtout observée à l'état postprandial où les niveaux d'insuline sont augmentés suite à la stimulation glucose-dépendante de la cellule bêta du pancréas. En stimulant la lipogénèse, l'insuline contribue à la diminution des concentrations intra-adipocytaires des AGNE et favorise donc un gradient de concentration pour l'entrée des AGNE dans l'adipocyte (Baldo *et al.*, 1993). Donc, un problème de régulation de la lipolyse par l'insuline entraîne l'afflux des AGNE vers les tissus périphériques. Frayn *et al.*, ont démontré que l'efflux des AGNE à partir du tissu adipeux semble diminuer en cas d'hyperinsulinémie (Frayn *et al.*, 2003).

Les adipocytes sont des cellules actives et obéissent aux mêmes principes de différenciation que les autres cellules. L'insuline régule la biologie adipocytaire et constitue un des facteurs responsables de la différenciation des préadipocytes en adipocytes (Arner, 2005). Cette étape nécessite d'autres facteurs de transcription dont les PPAR gamma (*Peroxisome Proliferator Activated Receptot gamma*). Ainsi, une des familles de médicaments insulino-sensibilisateurs les plus importants est appelée les thiazolidinédiones (TZDs) : ceux-ci active les PPAR gamma et améliorent, *in vivo*, la capacité de stockage des gras dans le tissu adipeux et la sensibilité à l'insuline des tissus cibles (Lehmann *et al.*, 1995).

I.3.5 Altération de la fonction antilipolytique de l'insuline

Dans un état normal, le devenir des acides gras redistribués dans les tissus est variable. Certains seront estérifiés et ainsi stockés sous forme de triglycérides. D'autres seront utilisés comme substrats énergétiques. Par ailleurs, le glycérol (issu de l'hydrolyse des triglycérides) sera, quant à lui, utilisé comme un substrat pour la néoglucogenèse hépatique (Reynisdottir *et al.*, 1997).

Dans un état pathologique, l'insuline ne semble pas pouvoir inhiber la lipolyse d'une manière efficace (Bjorntorp, 1990). Des niveaux élevés d'acides gras libres en circulation peuvent être témoin de ce défaut antilipolytique de l'insuline (Duncan *et al.*, 2007). On parle donc, d'une diminution de la suppressibilité des acides gras par l'insuline ou bien de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse. De manière intéressante, l'altération de la fonction antilipolytique de l'insuline serait un excellent facteur contribuant au développement de la lipotoxicité.

Donc, si la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse est optimale, il ne devrait pas y avoir de relâche excessive de gras à l'extérieur du tissu adipeux lors du jeûne, et le risque de débordement après les repas serait moindre. Toutefois, un défaut de suppression de lipolyse par l'insuline peut aussi contribuer à l'altération de la fonction glucorégulatoire de l'insuline. De ce fait, la mesure de la sensibilité à l'insuline, pour le métabolisme du glucose et sa fonction suppressive de la lipolyse, semble donc très importante pour le dépistage des désordres métaboliques liés aux gras.

I.4 RÔLE DE LA RÉSISTANCE À L'ACTION ANTI-LIPOLYTIQUE DE L'INSULINE ET DE LA LIPOTOXICITÉ DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA RÉSISTANCE À L'INSULINE POUR LE GLUCOSE

Inversement à la sensibilité à l'insuline, la résistance à l'insuline est définie comme étant une diminution de la capacité d'une quantité donnée d'insuline, endogène ou exogène, à augmenter la capture du glucose par les tissus. L'action de l'insuline consiste en sa liaison à son récepteur suivie d'une série de réactions protéines-protéines spécifiques menant ainsi (en fonction du type du tissu) à la translocation du transporteur de glucose (GLUT4; transporteur

régulé par l'insuline mais il existe d'autres transporteurs dont l'expression est indépendante de l'insuline dont la discussion serait hors contexte pour ce mémoire) à la membrane permettant l'entrée du glucose dans la cellule. L'altération de ces réactions peut donc mener à un état de résistance à l'insuline (Muoio and Newgard, 2008).

À l'état de jeûne, étant donné que les niveaux d'insuline circulant sont faibles, le tissu adipeux libère des AGNE dans la circulation sanguine suite au manque d'inhibition de la lipolyse intracellulaire par l'insuline. Cependant, il est important de préciser que, dans un état physiologique normal, la faible quantité d'insuline circulante est suffisante pour augmenter la capture du glucose mais pas pour l'inhibition de la lipolyse. Ainsi, les AGNE libérés lors de l'état de jeûne peuvent être utilisés pour une production énergétique plus efficace par les tissus en l'absence d'apport exogène.

À l'état postprandial, la glycémie est élevée et les niveaux d'insuline augmentent en conséquence, ce qui diminue la libération des AGNE par le tissu adipeux suite à l'inhibition de la lipolyse par l'insuline. Dans ce cas, l'insuline participe également à l'estérification des AGNE dans le tissu adipeux, favorisant ainsi leur stockage sous forme de triglycérides.

En effet, la plupart des études ne discutent que de la fonction glucorégulatoire de l'insuline. Plusieurs auteurs affirment que la fonction antilipolytique est moins considérée malgré son importance majeure pour le développement de la résistance à l'insuline (Van Pelt *et al.*, 2013), (Frayn, 2002, Woerle *et al.*, 2003). Nous avons décrit auparavant l'importance de la suppression de la lipolyse par l'insuline dans le développement de la dysfonction du tissu adipeux. Une des conséquences majeures pour le développement de la résistance à l'insuline liée au défaut de suppression de la lipolyse est la lipotoxicité. Cette dernière est représentée par des dommages tissulaires causés par l'accumulation, dans les tissus maigres, de métabolites d'AGNE, de stress du réticulum endoplasmique, de dysfonction mitochondriale, d'une augmentation des espèces réactives à l'oxygène (ROS) et autres dommages cellulaires (Unger, 1995).

Rôle de la lipotoxicité :

À l'égard de l'importance de l'insuline dans la régulation du métabolisme des AGNE, que ce soit dans l'état de jeûne ou bien postprandial (Horowitz *et al.*, 1999, Jensen *et al.*, 1989), il ne serait pas surprenant qu'il existe une association entre l'altération de sa fonction glucorégulatrice, menant à la résistance à l'insuline, et celle antilipolytique, menant au développement de la lipotoxicité. Il a été démontré que le taux d'apparition des AGNE, corrigé par le pourcentage de la masse maigre, chez les sujets diabétiques obèses est plus élevé comparativement aux sujets minces (Miles *et al.*, 2003). Dans la même étude, les auteurs attribuent l'augmentation des AGNE nocturnes et postprandiaux, chez les patients diabétiques, au fait qu'il y a un défaut de suppression de la lipolyse par l'insuline. D'autres investigateurs ont démontré que suite à un traitement de quatre mois avec un insulinosensibilisateur, le rythme d'apparition des AGNE s'améliore (mesurés à l'aide d'un traceur radioactif et utilisant un clamp euglycémique hyperinsulinémique) (Riccio *et al.*, 1991).

Par ailleurs, plusieurs investigateurs ont réalisé des expériences sur l'effet de l'exposition aux AGNE sur différents sujets (Lam *et al.*, 2003, Lewis *et al.*, 2002). D'autres ont exploré les conséquences de cette exposition qui se traduit par le développement d'une dysfonction mitochondriale (Khalfallah *et al.*, 2000, Richardson *et al.*, 2005), l'induction du stress oxydatif (Itani *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2001), le développement de l'inflammation (Tripathy *et al.*, 2003) ainsi que l'accumulation de métabolites toxiques (Summers, 2006). De plus, il a été démontré qu'une infusion d'intralipide/héparine sur une période de 48h diminue la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (GSIS), mesurée par un clamp hyperglycémique (Carpentier *et al.*, 2000). Tous ces phénomènes sont les caractéristiques de la présence de la lipotoxicité tissulaire, à laquelle peut contribuer le défaut de suppression de la lipolyse par l'insuline (Carpentier, 2008).

En effet, les tissus maigres exposés à une grande quantité d'AGNE doivent les métaboliser en produits finaux tels que le diacylglycérol (DAG) et les céramides. Il a été démontré que

ces métabolites contribuent à l'activation d'une famille de protéines de phosphorylation appelée PKC (phosphokinase C). Le DAG est un activateur des PKC et les céramides sont issus de l'oxydation des AGNE saturés et contribuent à l'activation de la PKC, au dérèglement de la fonction mitochondriale ainsi que la stimulation de la synthèse du monoxyde d'azote (NO) impliquée dans le déclenchement de l'apoptose cellulaire (comme au niveau du pancréas).

La PKC phosphoryle en sérine plusieurs enzymes impliquées dans la cascade de signalisation de l'insuline entraînant ainsi la modification de leur action. D'ailleurs, plusieurs études ont démontré l'association entre les niveaux élevés d'AGNE et le défaut de phosphorylation en tyrosine de l'IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate-1*) (Dresner *et al.*, 1999, Kruszynska *et al.*, 2002). L'IRS-1 est l'un des substrats les plus importants dans la cascade de signalisation de l'insuline. Il possède des sites de phosphorylation en tyrosine ainsi que d'autres en sérine. Sa phosphorylation en tyrosine active la continuation de la cascade insulinaire. Tandis que la phosphorylation en sérine/thréonine régule négativement la phosphorylation en tyrosine entraînant la diminution de l'interaction de l'IRS-1 avec les effecteurs en aval (Tanti *et al.*, 1994). De manière intéressante, les métabolites des AGNE accumulés dans la cellule participent à cette phosphorylation en sérine/thréonine de l'IRS-1 (Unger, 2002).

En plus des métabolites des AGNE, des facteurs inflammatoires sont également impliqués dans la lipotoxicité. Il est connu que dans une situation de résistance à l'insuline associée à l'obésité androïde, le tissu adipeux viscéral produit une quantité importante de facteurs inflammatoires tels que le TNF α et l'IL-6 (Vettor *et al.*, 2005). Il a été démontré que des niveaux élevés de ces facteurs sont associés à la présence de la résistance à l'insuline (Saghizadeh *et al.*, 1996). Aussi, plusieurs études démontrent que les céramides sont impliqués dans la cascade de signalisation impliquant la désensibilisation à l'insuline via l'action du TNF α (Grigsby and Dobrowsky, 2001, Kanety *et al.*, 1996, Peraldi *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 1998). Cela suggère que la lipotoxicité est une pierre angulaire au développement de la résistance à l'insuline.

En effet, la résistance à l'insuline, représente un état pathologique complexe (Yang *et al.*, 2013). En cas de résistance à l'insuline pour la lipolyse dans le tissu adipeux, la suppression de la lipolyse se fait d'une manière moins efficace (Carpentier, 2008, Yang *et al.*, 2013). Les tissus maigres recevant un excès d'afflux d'AGNE, n'ont pas la même capacité de stockage des AGNE que le tissu adipeux. La saturation d'emmagasinage des AGNE sous forme de triglycérides survient donc plus rapidement. Cela conduit à la redirection des lipides de la voie anabolique vers la voie alternative non-oxydative menant ainsi à la production de métabolites lipidiques toxiques menant à la lipotoxicité (Carpentier, 2008). Comme la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse est importante pour le développement de la lipotoxicité et ses conséquences néfastes, il est important d'explorer d'abord les techniques de mesure de la sensibilité à l'insuline pour la fonction glucorégulatoire (voir section I.5), qui sont les plus explorées, pour ensuite décrire ce qui a été proposé pour la mesure de sa fonction anti-lipolytique (voir section I.6).

I.5 MÉTHODES DE MESURE DE LA SENSIBILITÉ À L'INSULINE CHEZ L'HUMAIN

I.5.1 Méthodes de référence

I.5.1.1 Clamp euglycémique-hyperinsulinémique

Il s'agit de la méthode de référence, souvent appelée étalon d'or, pour la mesure de la sensibilité du glucose à l'insuline. En effet, cette mesure se fait en calculant la quantité de glucose consommée lors d'un état d'équilibre entre l'apport (perfusion) et la consommation (dégradation et capture tissulaire) du glucose perfusé. On peut donc mesurer le taux de disparition (haute dose d'insuline) et d'apparition du glucose (à l'aide d'un traceur radioactif et avec une faible dose d'insuline), mais aussi la consommation en carburants (DeFronzo *et al.*, 1979). La détermination de la dose de l'insuline utilisée ainsi que son objectif durant le clamp sera expliquée dans les paragraphes suivants dans la même section.

En effet, le principe de base du clamp euglycémique-hyperinsulinémique consiste en une perfusion d'insuline exogène à débit constant en même temps qu'une perfusion de glucose à

débit variable en fonction de la glycémie (Figure 6). Cela a comme objectif de placer le candidat dans un état d'hyperinsulinémie en maintenant une glycémie stable. En général, les niveaux d'insuline utilisés varient en fonction de l'objectif visé. DeFronzo *et al.*, décrivent qu'une perfusion d'insuline à 40 mU/kg·min pendant 2h permet, théoriquement, la suppression de toute production endogène de glucose. Cela veut dire que la quantité de glucose perfusé représente le seul apport en glucose. De ce fait, en ajustant le débit de perfusion du glucose à toutes les 5 minutes, en fonction de la glycémie mesurée, il serait possible d'atteindre un état d'équilibre entre la quantité de glucose perfusée et celle qui est utilisée par le corps (DeFronzo *et al.*, 1979). Nous pouvons donc mesurer la sensibilité périphérique à l'insuline (Monzillo and Hamdy, 2003). Ainsi, dans l'état d'équilibre, la glycémie se dit 'clampée' à la valeur mesurée à jeun (intervalle de $\pm 10\%$ de la glycémie de départ).

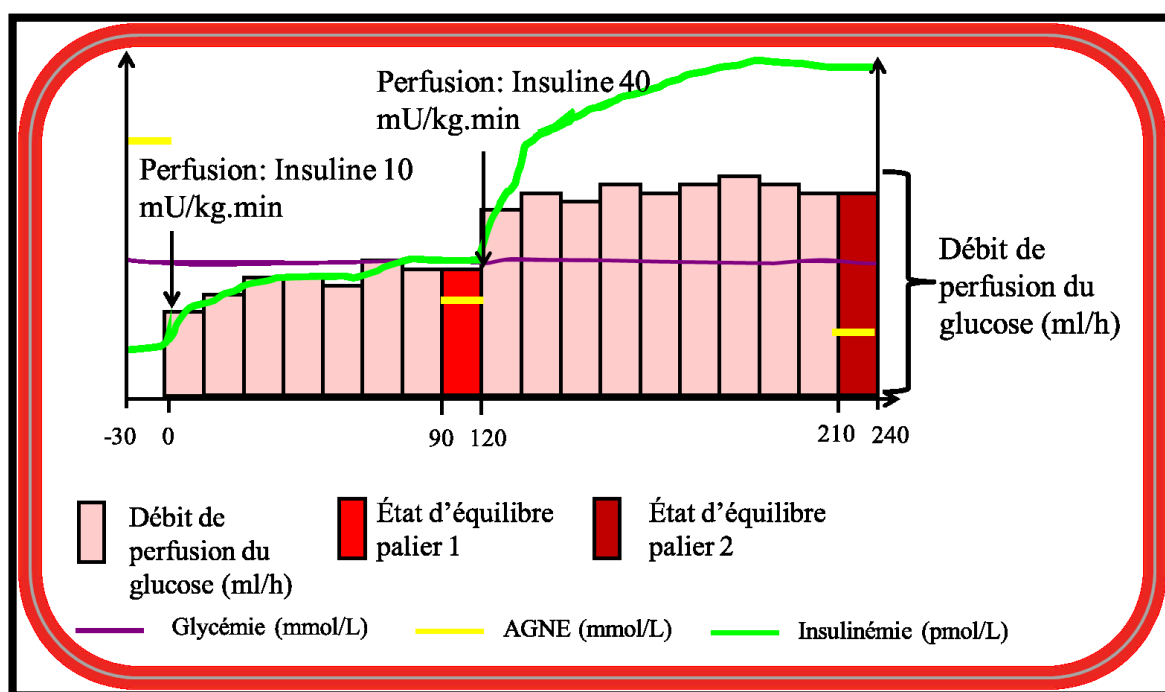


Figure.6. Représentation graphique du Clamp Euglycémique-Hyperinsulinémique

DeFronzo *et al.*, expliquent également que pour la mesure de la sensibilité hépatique au glucose, une quantité d'insuline perfusée à 10 mU/kg·min pendant 2h serait suffisante. L'état d'équilibre (Figure 6) peut être atteint dans les 20 dernières minutes du clamp. Nous pouvons

donc déterminer le taux de perfusion de glucose (GIR; Glucose Infusion Rate) qui correspond à la quantité de glucose nécessaire afin de maintenir la glycémie constante par rapport à sa valeur à jeun. Ainsi, plus le GIR est élevé, plus la sensibilité à l'insuline est élevée. Le GIR peut être rapporté au poids du sujet afin d'éviter l'effet du volume de distribution sur la vraie estimation de la sensibilité à l'insuline. Cette normalisation est appelée la « valeur M », qui constitue la mesure classique de sensibilité du glucose à l'insuline. À partir de ces calculs, nous pouvons également dériver un index de sensibilité à l'insuline, l'ISIclamp, représenté par le rapport de la valeur M sur l'insulinémie moyenne à l'état d'équilibre, afin de corriger pour des niveaux différents d'insuline qui seraient obtenus entre les sujets (voir tableau 2).

Tableau 2. Principaux indices de sensibilité du glucose à l'insuline dérivés du clamp

Indice de sensibilité à l'insuline	Formule
Valeur M	Débit de perfusion du glucose durant la période d'équilibre (20 dernières minutes) du palier à 40 mU/m ² ·min /poids (kg)
ISIclamp	Valeur M/insulinémie moyenne durant l'état d'équilibre

Dans notre étude, nous utilisons une perfusion à raison de 40 mU/kg·min, qui permet une mesure précise de la sensibilité du glucose à l'insuline représentée par la valeur *M* (DeFronzo *et al.*, 1979, Monzillo and Hamdy, 2003). On assume que le seul glucose qui se trouve en circulation est celui que l'on perfuse. Ainsi, un patient présentant un débit de perfusion de glucose élevé est donc plus sensible à l'insuline, et vice-versa (Bergman *et al.*, 1989). Étant donné que la quantité d'insuline suffisante pour la suppression de la lipolyse est faible, comparativement à celle utilisée pour la mesure de la sensibilité du glucose à l'insuline, nous avons utilisé un débit de perfusion d'insuline à raison de 10 mU/kg·min pour cette mesure. Dans notre étude, nous présentons le débit de perfusion d'insuline à 10 mU/kg·min comme étant un faible niveau comparativement à celui de 40 mU/kg·min (Figure 6). Par contre, Perret *et al.*, expliquent que la dose de 40 mU/kg·min perfusée lors du clamp pourrait ne pas être suffisante pour supprimer à 100% la production hépatique de glucose chez certains sujets plus résistants à l'insuline (Perret *et al.*, 2003). Étant donné que notre étude porte surtout sur la suppression de la lipolyse par l'insuline, nous pouvons assumer que les niveaux d'insuline utilisés sont suffisants pour le calcul de nos indices en lien avec la lipolyse.

Comme le clamp est une méthode étalon d'or pour la mesure de la sensibilité à l'insuline pour le glucose et comme il est réputé comme étant une méthode de référence, certains auteurs l'ont utilisé pour d'autres objectifs. Armstrong M.J. et al., ont utilisés un clamp à deux paliers d'insuline afin de comparer, entre autres, la suppression de la lipolyse par l'insuline chez des patients atteints de stéatose hépatique non alcoolique, comparativement aux contrôles (Armstrong *et al.*, 2014). Van Pelt et al., avaient utilisé l'aire sous la courbe du glycérol lors du clamp en tant qu'indice de suppression de lipolyse par l'insuline (Van Pelt et al., 2013). Ces études suggèrent que ces indices issus du clamp pourraient être de bons indices pour la mesure de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse, mais aucune donnée ne permet d'affirmer que le clamp est un étalon d'or pour cette mesure.

Dans notre étude, nous utilisons le %suppAGNE (Tableau 3) comme indice de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse. Donc, plus ce pourcentage est élevé, meilleure serait la sensibilité à l'insuline pour la suppression de la lipolyse. Nous avons également utilisé le delta AGNE (Tableau 3) pour la même mesure. Il s'agit d'un écart entre la moyenne des AGNE, lors de l'état d'équilibre du premier palier d'insuline (Figure 6), et la moyenne des valeurs d'AGNE à jeun. Cela nous permet de penser que la sensibilité à l'insuline pour la suppression de la lipolyse est meilleure avec un plus grand écart en AGNE entre ces deux valeurs. Tous les indices ont été calculés à faible débit de perfusion d'insuline. Par ailleurs, le clamp présente quelques avantages et inconvénients.

Tableau 3. Ensembles d'indices dérivés du clamp dans notre étude.

Variable	Intérêt	Calcul
ΔAGNE (palier faible dose insuline)	Sensibilité à l'insuline pour la lipolyse	$Moy_{AGNE} (base) - Moy_{AGNE} (palier)$
%suppAGNE (palier faible dose insuline)	Sensibilité à l'insuline pour la lipolyse	$Moy_{AGNE} (base \text{ moins palier}) / Moy_{AGNE} (base)$
Valeur M ($\mu\text{mol/kg}\cdot\text{min}$) (palier forte dose insuline)	Sensibilité du glucose à l'insuline	$DPG(\mu\text{mol}/\text{min})/\text{poids}(\text{kg})$ DPG = Débit de Perfusion du Glucose

Avantages du clamp

Le clamp euglycémique-hyperinsulinémique est une méthode souvent utilisée pour la mesure de la sensibilité du glucose à l'insuline. Cette méthode présente des avantages (Akinmoku *et al.*, 1992) :

- La mesure de la disposition du glucose médiée par l'insuline (directement, sans utiliser un traceur de glucose radiomarqué);
- La mesure de la sensibilité à l'insuline dans différents tissus comme le foie et le muscle squelettique (en utilisant différentes concentrations d'insuline, avec ou sans un traceur de glucose radiomarqué);
- La possibilité d'enregistrer de façon précise les changements de sensibilité tissulaire à l'insuline

De plus, le clamp peut être associé à l'utilisation d'autres techniques de mesure tel que la calorimétrie indirecte afin d'évaluer le métabolisme oxydatif de base ou suite à la stimulation par l'insuline (oxydation du glucose perfusé ou des lipides). La mesure de l'oxygène consommée par le sujet ainsi que la quantité de dioxyde de carbone expirée reflètent la phosphorylation oxydative des substrats énergétiques, et le quotient respiratoire (VCO_2/VO_2) renseigne sur la nature des substrats oxydés.

Il existe une variante du clamp avec suppression de la production d'insuline endogène. Il s'agit d'une mesure de sensibilité à l'insuline, le patient étant à jeun, en utilisant des agents supprimeurs de la production endogène de l'insuline, soit la somatostatine ou l'octréotide (Gonzalez-Ortiz *et al.*, 1999). L'octréotide est un analogue synthétique de la somatostatine utilisé afin de supprimer la production endogène d'insuline. Ainsi, dans cette technique les perfusions d'insuline et de glucose se font à raison de 25 mU/m².min et 240 mg/m².min respectivement sur une durée de trois heures (Gonzalez-Ortiz *et al.*, 1999). L'objectif

principal de la suppression de la production de l'insuline endogène est d'éviter son interférence dans l'interprétation des résultats. Selon Tura *et al.*, cette méthode permet de mieux évaluer l'action directe de l'insuline sur le glucose (capture périphérique du glucose) (Tura *et al.*, 2010). Les mêmes auteurs démontrent qu'il existe une bonne corrélation entre la mesure de la sensibilité à l'insuline durant le test de suppression d'insuline et le clamp euglycémique-hyperinsulinémique (Tura *et al.*, 2010).

Inconvénients du clamp

Il est connu que le clamp est une méthode laborieuse, coûteuse et nécessite du personnel qualifié pour sa réalisation. De plus, l'hyperinsulinémie maintenue lors du clamp ne permet pas de reproduire un état physiologique normal, i.e. celui de l'hyperinsulinémie postprandiale, et mesure donc la sensibilité à l'insuline dans des conditions non physiologiques (Krentz, 1996). En effet, le clamp euglycémique-hyperinsulinémique est une méthode statique qui isole l'effet de l'insuline sur le métabolisme du glucose, mais qui ne permet pas d'évaluer les effets intégrés de toutes les hormones et cytokines qui agissent dans la régulation du métabolisme glucidique lors d'un repas (Krentz, 1996, Radziuk, 2000). De plus, d'un point de vue pratique, l'état d'équilibre peut être difficilement atteint à la deuxième heure (lors des 20 dernières minutes), dans certains cas. À la fin de l'expérience, s'y rajoute le sevrage du dextrose que l'on doit pratiquer suite à l'arrêt de la perfusion de l'insuline, et le retour à une glycémie normale d'une manière autonome peut être plus longue que prévue (i.e. surtout pour les patients résistants à l'insuline dont la glycémie demeure élevée). Une surveillance de la glycémie du sujet est donc nécessaire après la fin du test.

La variante du clamp avec suppression de la production d'insuline endogène présente certains inconvénients également (Gonzalez-Ortiz *et al.*, 1999). Lors de ce test, il est assumé que la perfusion d'insuline entraîne une suppression totale de la production hépatique de glucose, permettant ainsi d'évaluer la sensibilité périphérique d'insuline. Par ailleurs, la quantité d'insuline et de glucose perfusées en parallèle, sont standardisées sur tous les patients sans tenir compte de la variabilité interindividuelle en termes de métabolisme de l'insuline. La

complexité de ces techniques (clamp avec ou sans suppression de l'insuline) diminue la possibilité d'applicabilité sur la population générale (Muniyappa *et al.*, 2008).

I.5.1.2 Test de tolérance au glucose par voie intraveineuse avec prélèvements fréquents (*Frequently Sampled Intravenous Glucose Tolerance Test (FSIVGTT)*)

Il s'agit d'une méthode durant laquelle une injection intraveineuse d'un bolus de glucose provoquera une décharge d'insuline endogène. Cette technique consiste à injecter 0,3 g de glucose par kilogramme de masse corporelle et ainsi recueillir fréquemment des échantillons sanguins à des temps précis (à chaque minute jusqu'à 10 min, ensuite aux 2 minutes jusqu'à 30 min et aux 10 minutes jusqu'à la fin de l'expérience), surtout au début du test pour bien mesurer la sécrétion d'insuline. Une injection d'insuline à la 20^e minute du test (0,03 U/kg) permet de diminuer la durée totale du test qui se fait sur 3h (Yang *et al.*, 1987). Comme les réponses du glucose et de l'insuline sont dynamiques, et non statiques comme pour le clamp, l'utilisation d'une modélisation mathématique est nécessaire afin de calculer la sensibilité à l'insuline en fonction de la courbe de disparition de glucose en relation avec les niveaux d'insuline (Bergman *et al.*, 1979). Le FSIVGTT permet donc de mesurer à la fois la sensibilité à l'insuline et sa sécrétion.

Calculs et indices dérivés du FsIVGTT

Contrairement au clamp euglycémique-hyperinsulinémique, le FsIVGTT mesure la sensibilité à l'insuline pour le corps en entier incluant le foie. Le modèle minimal développé par le Dr. Richard Bergman en 1979 (Bergman *et al.*, 1979) permet de fournir deux indices principaux. En premier lieu, le SI qui représente la sensibilité tissulaire à l'action de l'insuline sur le glucose et donc l'augmentation nette de la fraction de clairance de glucose par unité d'insuline (Bergman, 1989). En deuxième lieu, le Sg qui représente l'effet du glucose perfusé sur sa propre disparition et donc l'augmentation de la fraction nette de la clairance du glucose due à l'augmentation en glucose suite à son introduction, indépendamment de la quantité d'insuline par-dessus sa valeur de base (i.e. d'une manière incrémentale) (Steil *et al.*, 1994).

Le modèle permet également de calculer le AIRg qui représente la mesure de la réponse aiguë de la cellule β du pancréas en réponse à la charge en glucose, calculée à l'aide d'une aire sous la courbe incrémentale de l'insuline (Ferrari *et al.*, 1991, Pacini and Bergman, 1986).

Critiques de la technique

Selon le mode d'application décrit ci-haut, cette méthode ne requiert pas un état d'équilibre ni d'ajustement du taux de perfusion du glucose, tel qu'au cours du clamp. Dépendamment de la population à l'étude, il a été démontré que chez les sujets sains, il existe une forte corrélation ($r = 0.84$; $P < 0,002$) entre le SI du FSIVGTT et la valeur M calculée à partir du clamp (Muniyappa *et al.*, 2008). Par contre, pour les sujets insulino-résistants, de plus faibles corrélations ont été rapportées ($r = 0,58$; $P < 0,008$) (Muniyappa *et al.*, 2008). De plus, la reproductibilité de ce test et son applicabilité sur de grandes populations semble être limitée par la fréquence des prélèvements (deux voies veineuses pour prévenir la perte de l'autre), de la durée du test (3h), du coût en personnel (2 personnes sont souvent nécessaires lors des prélèvements fréquents) et de la difficulté mathématique de l'analyse (Muniyappa *et al.*, 2008).

I.5.1.3 Test d'hyperglycémie provoquée par voie orale

L'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) est un test de tolérance au glucose utilisé en routine clinique (Hanson *et al.*, 2000). Il consiste à mesurer des niveaux de glucose, et parfois ceux de l'insuline, après une charge orale en glucose et ce, durant une période allant de 0 à 180 min (selon les objectifs de l'étude). Ainsi, l'évaluation de la tolérance au glucose se fait en mesurant la valeur de la glycémie qui, chez les sujets sains, se rétablit à sa valeur à jeun après 120 min (Matsuda and DeFronzo, 1999). De ce fait, la tolérance au glucose consiste en l'efficacité de l'organisme entier à rétablir la glycémie après la charge en glucose. Bien que ce test ait été standardisé pour la mesure de la tolérance au glucose, plusieurs auteurs ont développé des indices permettant d'estimer de façon dynamique la sensibilité à l'insuline durant ce test. De plus, ce test a comme particularité d'être une technique simple et facile à

réaliser, moins coûteuse que le clamp et la FSIVGTT, ne nécessitant pas de personnel spécifiquement formé, ainsi que d'être pratique pour une utilisation sur de grandes cohortes surtout pour les études épidémiologiques (Hanson *et al.*, 2000).

Indices calculés à partir de l'HGPO

En fonction des résultats de glycémie et d'insulinémie, nous pouvons dériver plusieurs indices de sensibilité ou résistance à l'insuline, à partir de valeurs à jeun ou de calculs utilisant des mesures intégratives tels que les aires sous la courbe (Hollenbeck *et al.*, 1984). Voici un tableau résumé de quelques indices, les plus utilisés, rapportés dans la littérature (Monzillo and Hamdy, 2003) :

Tableau 4. Indices de la sensibilité du glucose à l'insuline, dérivés à partir d'HGPO.

Indices de sensibilité à l'insuline	Principes
ISI Matsuda	Utilise l'inverse des moyennes, en racine carrée, d'ensemble des mesures de glycémie et d'insulinémie ainsi que les valeurs à jeun $10\,000/\sqrt{(G_0 \cdot I_0 \cdot \text{Moy}G \cdot \text{Moy}I)}$
ISI Stumvoll	Utilise la glycémie au temps 90 min, l'insulinémie au temps 120 min ainsi que l'IMC (kg/m^2)
ISI Avignon	Utilise la glycémie et l'insulinémie au temps 0 et 120 min, ainsi qu'une valeur estimée de distribution de glucose (VD) Où VD = volume de distribution apparent du glucose
ISI Belfiore	Utilise les aires sous la courbe de glycémie et d'insulinémie tout au long d'HGPO
ISI Cederholm	Utilise les moyennes des glycémies et d'insulinémies durant l'HGPO en plus du poids des sujets
ISI Gutt	Utilise la valeur de glycémie et d'insulinémie au temps 120 min en plus du poids des sujets
ISI Mari	Utilise plusieurs formules en plus de constantes variant selon la durée d'HGPO (2-3 heures) ainsi que l'unité utilisée pour la glycémie (mg/dl ou mmol/l)

L'HGPO consiste donc en un test qui mime la dynamique du glucose et de l'insuline lors d'un repas, d'une manière plus proche de la physiologie que la FSIVGTT et le clamp. Mais, la quantité du glucose ingéré pouvant se retrouver en circulation dépend de l'absorption intestinale et de son intégrité. De plus, la quantité d'insuline sécrétée dépend de la capacité

du pancréas à en produire d'avantage. Les indices dérivés à partir de l'HGPO dépendent également de la valeur à jeun, que ce soit pour l'insuline et/ou le glucose, pour la mesure de la sensibilité du glucose à l'insuline. Cependant, à cause de sa facilité de réalisation et son applicabilité sur l'ensemble de la population, l'HGPO pourrait être une technique alternative pour la mesure de la sensibilité à l'insuline pour la suppression de la lipolyse. Les indices calculés à partir de cette technique seront détaillés dans notre démonstration des objectifs de l'étude dans la section I.6 sur l'importance de mesure de la sensibilité à l'insuline sur la lipolyse.

I.5.2.2 Indices dérivés des mesures à jeun

Nous pouvons calculer plusieurs indices à partir des valeurs à jeun d'insuline et de glucose. L'avantage principal de ces indices est qu'ils sont faciles à calculer et ne nécessitent pas de manœuvres expérimentales particulières.

En effet, suite à un simple prélèvement chez un patient à jeun, nous pouvons obtenir des valeurs brutes de glycémie mais aussi d'insulinémie, qui permettront de calculer des indices de sensibilité à l'insuline à jeun. Ces indices seront surtout utiles pour estimer la sensibilité à l'insuline dans de larges populations.

Ratios : 1/insuline et glucose/insuline à jeun

Ils permettent la mesure de la sensibilité à l'insuline chez les sujets normaux. Les niveaux d'insuline peuvent être anormalement élevés chez un patient résistant à l'insuline mais dans le cas d'une dysfonction de sécrétion d'insuline, la mesure de la sensibilité à l'insuline à l'aide de ces indices ne sera pas appropriée (Ntyintyane *et al.*, 2010). Par exemple, en cas de défaut de sécrétion d'insuline, le rapport 1/insuline ou glucose/insuline à jeun sera élevé. Cela voudrait dire que le patient est très sensible à l'insuline. Or, on sait que dans le diabète de type 2, l'hyperinsulinémie compensatoire à une résistance à l'insuline franche peut être suivie d'une baisse de production de l'insuline suite à un mécanisme intra-pancréatique.

L'utilisation de ce paramètre n'est donc adéquat que chez les sujets sans anomalie de tolérance au glucose, ni de dysfonction de la sécrétion de l'insuline (Legro *et al.*, 1998).

HOMA et QUICKI

Le HOMA (Tableau 5) représente un calcul permettant de démontrer l'interaction dynamique entre l'insuline et le glucose, mais uniquement à l'état de jeûne (Matthews *et al.*, 1985). En effet, à jeun les concentrations circulantes de glucose ne sont pas influencées par l'absorption de glucose, et ne dépendent donc que de la production hépatique et de la disparition du glucose, qui sont régulées par l'insuline. Le HOMA permet donc de quantifier la sensibilité à l'insuline lors de cet état statique basal (Hanson *et al.*, 2000). Il est à noter par contre que comme les niveaux d'insuline sont faibles à jeun, l'insuline a peu d'effet sur la disparition du glucose, mais plutôt sur la suppression de la production hépatique de glucose. L'HOMA est donc davantage une mesure de la sensibilité hépatique de l'insuline pour le glucose, plutôt que de sensibilité à l'insuline périphérique ou générale (Tripathy *et al.*, 2004). Bien que les sensibilités hépatique et périphérique à l'insuline soient souvent fortement corrélées, ce n'est pas le cas chez certains sujets ou dans certaines populations (Tripathy *et al.*, 2004).

Le QUICKI (Tableau 5) est une transformation mathématique dérivée à partir des valeurs d'insuline et de glucose à jeun afin de déterminer d'une manière empirique la sensibilité à l'insuline d'un sujet (Ntyintyane *et al.*, 2010). Cet indice peut être utilisé sur de grandes cohortes épidémiologiques afin de suivre l'évolution de la sensibilité à l'insuline suite à une intervention ou bien durant les études dont l'évaluation de la sensibilité à l'insuline n'est pas l'objectif primaire de l'étude (Ntyintyane *et al.*, 2010).

Par ailleurs, le QUICKI ainsi que les indices calculés à partir de valeurs brutes d'insuline et de glucose sont sensibles à la variabilité de la mesure. Il a été suggéré d'utiliser ces paramètres seulement quand la réalisation de technique tel que le clamp n'est pas faisable (Ntyintyane *et al.*, 2010).

Tableau 5. Formules HOMA et QUICKI.

Variable	Calcul
HOMA	Insuline à jeun U/ml × glucose à jeun mmol/l / 22.5
QUICKI	1/(log [insuline à jeun U/ml] × log [glucose à jeun mg/dl])

I.6 IMPORTANCE DE MESURER LA SENSIBILITÉ À L'INSULINE POUR LA LIPOLYSE

Tous les indices et méthodes cités ci-haut ne portent pas sur la mesure de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse. Par contre, ce paramètre a une importance majeure dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 (Van Pelt *et al.*, 2013). En effet, la fonction antilipolytique de l'insuline apparaît de plus en plus dans les études en lien avec le tissu adipeux et sa contribution au développement de la résistance à l'insuline (Roden *et al.*, 1996). D'après Van Pelt *et al.*, la majorité de ces études utilise le clamp euglycémique-hyperinsulinémique pour cette mesure, malgré sa complexité et son coût (Van Pelt *et al.*, 2013).

Il a été démontré qu'il existe une relation étroite entre l'action antilipolytique et glucorégulatoire de l'insuline (Abdul-Ghani *et al.*, 2009). Philip Randle et ses collaborateurs ont décrit, à partir d'expériences *ex vivo* l'existence de cycle glucose-acides gras (Roden *et al.*, 1996). Dans leurs travaux, Randle *et al.*, démontrent qu'une augmentation de l'oxydation des AGNE entraîne une diminution de l'oxydation du glucose suite à une altération du potentiel d'oxydo-réduction de la cellule, mais aussi d'une inhibition des enzymes de la glycolyse (Roden *et al.*, 1996).

Le cycle glucose-acides gras stipule qu'une augmentation de l'oxydation des AGNE par les cellules cardiaques entraîne une augmentation de l'apport en ATP et en acétyl-CoA, ce qui inhibe l'enzyme pyruvate déshydrogénase (Dresner *et al.*, 1999). Aussi, au niveau de la mitochondrie l'afflux d'acétyl-CoA entraîne une augmentation du citrate intracellulaire, lequel inhibe la phosphofructokinase entraînant une augmentation de fructose-6-phosphate et glucose-6-phosphate, des produits de la glycolyse qui inhibent son enzyme clé qui est

l'hexokinase musculaire. En effet, ces processus entraineront une accumulation intracellulaire de glucose (Dresner *et al.*, 1999).

Suite aux travaux de Randle, d'autres investigateurs ont démontré à l'aide d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique, que l'augmentation des niveaux plasmatiques d'AGNE entraîne une diminution de la capture du glucose dans les muscles squelettiques (Dresner *et al.*, 1999). Les résultats de Randle et de Shulman (2004) démontrent qu'une exposition aux AGNE induit une résistance périphérique à l'insuline entraînant les effets délétères cités plus haut (Shulman, 2004).

Tel que cité précédemment, la majorité des AGNE en circulation lors du jeûne proviennent de l'hydrolyse des triglycérides du tissu adipeux et donc de la lipolyse adipocytaire, qui est fortement régulée par l'insuline (Arner, 1995). Les niveaux d'AGNE sont très bas à l'état postprandial alors que les niveaux de triglycérides sont quant à eux beaucoup plus élevés. Selon les études présentés ci-haut, le développement de la lipotoxicité serait lié, entre autres, au défaut de suppression de la lipolyse adipocytaire par l'insuline, à jeun et en postprandial, en plus du débordement des AGNE qui ne peuvent être stockés dans le tissu adipeux et de la captation des AGNE à partir des triglycérides en circulation, à l'état postprandial.

Afin de mesurer la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse, Baldeweg *et al.*, avait utilisé le %suppAGNE comme indice de suppression d'AGNE durant un clamp (Baldeweg *et al.*, 2000). Le calcul de ce pourcentage avait été fait en prenant la moyenne des AGNE à l'état d'équilibre rapporté à la moyenne des AGNE à l'état de base (à jeun). Les auteurs ont trouvé les relations entre la suppression des AGNE et les niveaux de triglycérides suivantes : %suppAGNE ($\beta = -0,2570$, $P < 0,0001$), niveaux d'AGNE à l'état d'équilibre du clamp ($\beta = -0,2105$, $P < 0,0001$). Le même article présente des relations significatives entre les mesures de suppression de lipolyse et les paramètres anthropométriques ou métaboliques comme suit : %suppAGNE (WHR; $\beta = -0,3492$, $P < 0,0001$, FPI; $\beta = -0,2271$, $P < 0,0001$, FPG; $\beta = -0,0848$, $P < 0,0001$ et HOMA%S; $\beta = -0,2299$, $P < 0,0001$), AGNE à l'état d'équilibre (NEFAss dans l'article) (WHR; $\beta = +0,1658$, $P < 0,05$, FPI; $\beta = +0,1583$, $P < 0,005$, FPG; $\beta = +0,0943$, $P < 0,05$ et HOMA%S; $\beta = +0,1076$, $P < 0,05$). Fabbrini *et al.*, avaient utilisé

un autre paramètre appelé le rythme d'apparition du palmitate reflétant le débordement de gras à partir du tissu adipeux mesuré lors d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique (Fabbrini et al., 2009). Par contre, le calcul de ce paramètre nécessite l'utilisation d'un traceur radioactif compliquant ainsi la méthodologie.

Une des études des plus intéressantes en termes de mesure de la suppression de la lipolyse par l'insuline est celle de Van Pelt *et al.* Durant cette étude, la concentration d'insuline nécessaire pour la suppression de 50 % du glycérol de base (i.e. GLY EC50 dans cet article), était prise comme référence à partir du clamp, pour la mesure de la suppressibilité des AGNE (Van Pelt *et al.*, 2013).

Toutefois, les études utilisant le clamp portent sur de faibles cohortes. Ces études, en général, manquent de puissance statistique et ne permettent pas de généraliser les conclusions sur l'ensemble de la population. De plus, le clamp ne mime pas les perturbations dynamiques de glucose, d'insuline et du gras après l'ingestion d'une charge de glucose.

Donc, tel que résumé dans la section I.5 pour les techniques de mesure de sensibilité à l'insuline, l'HGPO est une technique simple et applicable sur de grandes cohortes en plus d'être moins coûteuse. Plusieurs auteurs ont utilisé l'HGPO pour mesurer la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse à l'aide de différents indices. Par exemple, Funicane *et al.*, avaient utilisé le pourcentage de suppression des AGNE entre le temps 30 et 60 min ainsi que l'aire sous la courbe d'AGNE, chez les patients atteints de la maladie hépatique non alcoolique (Finucane et al., 2013). Abdul Gani *et al.* en 2008, avaient considéré le produit des AGNE à jeun et l'insuline à jeun comme étant un indice valide de sensibilité adipeuse à l'insuline (Abdul-Ghani et al., 2008). Bien qu'intéressant, l'HGPO n'est pas plus un étalon d'or pour la mesure de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse adipocytaire. D'ailleurs, aucune technique métabolique n'est reconnue comme étalon d'or pour cette mesure.

Ce que nous avons remarqué en faisant notre revue de littérature concernant la mesure de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse, est que les formules des indices calculés sont très variables et sont utilisées sans aucune standardisation ou référence à un indice valide. Contrairement, pour la mesure de la sensibilité du glucose à l'insuline il existe le clamp

euglycémique-hyperinsulinémique qui est une méthode étalon d'or durant laquelle nous pouvons calculer la valeur M durant l'état d'équilibre. Cette mesure représente une référence à laquelle les chercheurs étudient la corrélation de leurs nouveaux indices calculés afin de pouvoir les rendre mieux interprétables. Par contre, au niveau de la fonction antilipolytique, il n'est pas connu que le clamp est la méthode étalon d'or et même pas les autres techniques métaboliques utilisées à ce jour.

Implication des femmes atteintes du SOPK dans l'étude

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) est un désordre endocrinien et métabolique touchant 6-10 % des femmes en âge de procréer (Trottier *et al.*, 2012). Selon le rapport de l'*Androgen Excess-PCOS Society*, le SOPK est caractérisé par un hyperandrogénisme (clinique et/ou biochimique) associé à une dysfonction ovarienne (oligo-anovulation chronique) (Trottier *et al.*, 2012). L'hyperandrogénisme clinique se concrétise surtout en l'hirsutisme (pilosité anormalement disposée chez la femme, exemple : tronc, cou) et acné. Tandis que le biochimique serait une augmentation des niveaux d'androgènes dans le sang. La dysfonction ovarienne se présente sous forme d'oligo-anovulation chronique (inférieur à 8 menstruations/ovulations par année).

Le SOPK est associé à l'obésité et la résistance à l'insuline ce qui augmente le risque du diabète de type 2 et les complications cardio-vasculaires. Selon Aziz *et al.*, 42 % des femmes SOPK sont obèses (Aziz *et al.*, 2004). De plus, 70 % des femmes SOPK présentent une résistance à l'insuline accompagnée d'une hyperinsulinémie compensatoire qui semble promouvoir l'hyperandrogénie (Goodarzi and Korenman, 2003, Nestler *et al.*, 1998). Dunaif *et al.*, ont démontré que les femmes SOPK, minces et obèses, sont plus résistantes à l'insuline que les femmes non-SOPK appariées pour l'âge et l'IMC (Dunaif *et al.*, 1989). Ainsi, ces femmes présentent un risque considérable pour le développement du diabète de type 2.

Le laboratoire du Dr. Baillargeon s'intéresse au rôle potentiel des AGNE pour induire une augmentation de la production d'androgènes en réponse à l'insuline et aux stimuli de l'androgénèse (Bellanger *et al.*, 2012). Ainsi les AGNE et leurs conséquences lipotoxiques

pourraient expliquer à la fois l'hyperandrogénisme et la résistance à l'insuline qui caractérisent les femmes avec SOPK. Une étude importante sur le sujet est celle de Mai et al., durant laquelle une infusion d'intralipid/héparine chez des femmes normales n'ayant pas de SOPK, sur une période de 4 heures, a entraîné une augmentation des niveaux d'androgènes comparativement au groupe témoin (qui a reçu une solution de saline/héparine) (Mai *et al.*, 2008). Cela suggère que les acides gras libres et l'insuline semblent jouer un rôle important pour le développement du SOPK.

La relation positive entre les niveaux d'androgènes chez les femmes SOPK et la résistance à l'insuline a été bien documentée. Rincon J et al, ont démontré que les androgènes réduisent la résistance à l'insuline musculaire (Rincon *et al.*, 1996). Corbould A et al., ont démontré que les niveaux élevés en testostérone induisent une résistance adipocytaire à l'insuline chez les femmes SOPK (Corbould, 2007). Or, la résistance à l'insuline avec l'hyperinsulinémie compensatoire est associée à l'hyperproduction androgénique chez les femmes SOPK (Qu *et al.*, 2009). Ces études démontrent donc que le SOPK est un désordre métabolique complexe impliquant la résistance à l'insuline, les niveaux d'androgènes ainsi que ceux des AGNE dans la circulation.

Notre équipe a effectué une étude comportant des indices de suppression de lipolyse par l'insuline (Trottier *et al.*, 2012). Dans cette étude, les filles ou sœurs de femmes atteintes du SOPK, âgées de 8 à 14 ans, avaient été étudiées avec des filles témoins appariées pour l'âge. Étant donné que les femmes SOPK sont plus résistantes à l'insuline, indépendamment de leur IMC, par rapport aux femmes témoins, Trottier *et al.* ont voulu déterminer si ces défauts étaient présents précocement chez les filles à risque de SOPK. En effet, lors de l'HGPO les AGNE sont moins bien supprimés chez les filles des femmes SOPK (PCOSr dans l'article) par rapport aux contrôles (Figure 7).

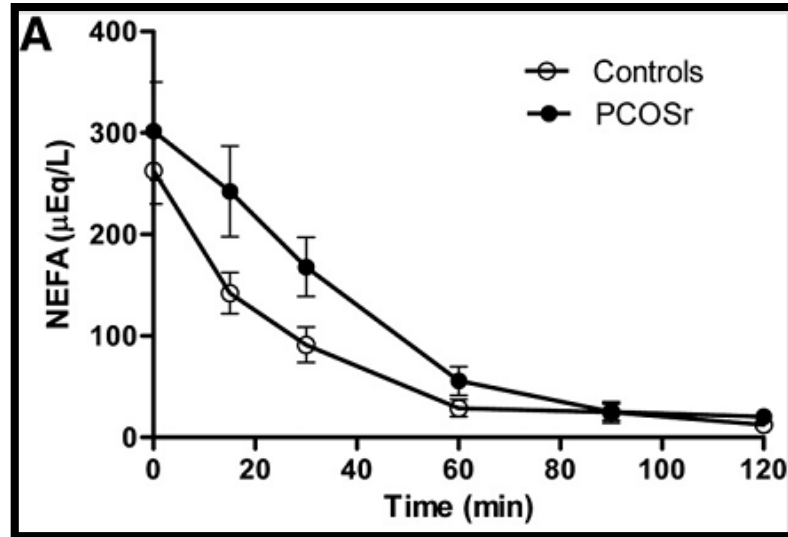


Figure 7. Niveaux des AGNE (NEFA en anglais) chez les filles des femmes SOPK (PCOSr) lors de l’HGPO.

NB : Notez que les niveaux à jeun sont plus élevés chez les PCOSr. Le degré de suppression de ces niveaux est également moins efficace chez les PCOSr avec un déplacement de la courbe de suppression des AGNE vers la droite.

À la suite de ces résultats, nous avons donc développé d’autres indices de suppression d’AGNE par l’insuline. Les paramètres calculés à partir de l’HGPO sont :

Tableau 6. Ensemble des indices de sensibilité ou résistance à l’insuline pour la lipolyse adipocytaire dérivés à partir de l’HGPO.

Variable	Utilité	Calcul
PentelnAGNE	Sensibilité à l’insuline pour la lipolyse	Pente de la portion log-linéaire de la courbe d’AGNE en fonction du temps
ASCd_{AGNE} (d ≡ décroissante)	Sensibilité à l’insuline pour la lipolyse	Aire sous la courbe de suppression des AGNE, i.e. aire sous la courbe des niveaux de base moins celle des niveaux d’AGNE
T50_{AGNE}	Résistance à l’insuline pour la lipolyse	Temps nécessaire pour que les niveaux d’AGNE de base soient réduits de 50%

%suppAGNE	Sensibilité à l'insuline pour la lipolyse	$(\text{MoyBaseAGNE} - \text{NadirAGNE}) / \text{MoyBaseAGNE}$
-----------	---	--

I.7 MÉTHODES DE VALIDATION INTERNE D'UN TEST

La validité est un intervalle d'inférences issues d'interprétations d'une mesure, un score ou bien un résultat à un test donné. La validité n'est pas une valeur absolue mais bien relative et est fonction du domaine dans lequel elle est utilisée (Kaplan *et al.*, 1976).

Il existe différents types de validité que l'on peut évaluer pour un test diagnostic ou une méthode de mesure utilisée en recherche, comme pour notre étude. La *validité apparente* qualifie un test où les items se limitent au domaine d'intérêt et mesurent sa qualité apparente : est-ce que la méthode de mesure semble mesurer ce qu'elle doit mesurer ? Dans le cas de notre étude, les indices de suppression de la lipolyse sont calculés à partir de résultats pertinents à la mesure que l'on veut estimer. Les indices sont apparemment valides considérant la méthode ayant servi à leurs calculs. Comme nous nous sommes fiés à la littérature en bonne partie, on peut prétendre que nos indices ont dès le départ un certain degré de validité apparente. Nous ne mesurerons pas davantage cette validité apparente.

La *validité de contenu* évalue si la méthode englobe tous les aspects du phénomène observé. Il ne sera pas possible dans mon mémoire de déterminer spécifiquement si nos indices mesurent bien les phénomènes précis qui sous-tendent la suppression de la lipolyse par l'insuline. Nous n'avons pas fait les expériences physiologiques nécessaires.

La *validité de critère* fait appel à un critère de référence extérieur, soit de source experte (validité empirique) ou via un instrument déjà reconnu et validé qui peut servir de référence ou étalon d'or (*validité concourante* ou concomitante). Pour la suppression de la lipolyse par l'insuline, il n'existe pas d'étalon d'or reconnu et donc il ne serait pas suffisant de valider nos indices dérivés de l'HGPO avec ceux dérivés du clamp, par exemple. Un certain degré de concordance entre les indices des 2 tests peut quand même suggérer que les indices mesurent le même phénomène.

En l'absence d'un critère externe pour appuyer la validité de nos indices, on peut tenter d'établir la *validité de construit* (ou conceptuelle) de notre méthode, où l'on recherche la correspondance avec des théories concernant le phénomène étudié. En particulier, on peut évaluer la *validité convergente* qui teste si les concepts censés être liés le sont effectivement. Comme il y a plusieurs études ayant suggéré un lien causal entre un défaut de suppression de la lipolyse par l'insuline et la dysfonction du tissu adipeux, d'une part, et des conséquences métaboliques, d'autres part, il est attendu que nos indices de suppression de la lipolyse par l'insuline soient corrélés avec ces phénomènes. C'est surtout ce critère de validité qui sera utilisé dans notre étude pour tenter de valider nos indices.

I.8 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Ainsi, selon la revue de littérature présentée en introduction de ce mémoire, il n'existe pas de méthode étalon d'or ni d'indice spécifique et simple pour la mesure de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse. Notre équipe propose donc une étude évaluant des indices simples pouvant être dérivés de l'HGPO, une méthode facile à exécuter, moins coûteuse et applicable sur de larges cohortes. L'hypothèse de cette étude est que les indices de suppression de la lipolyse par l'insuline dérivés de l'HGPO seront possiblement corrélés jusqu'à un certain point avec ceux du clamp, mais plus important, ils seront corrélés avec les paramètres anthropométriques et métaboliques qui devraient être associés à la suppressibilité des AGNE selon la revue de la littérature présentée dans ce mémoire. Comme il n'existe pas d'étalon d'or, les indices de l'HGPO ne peuvent pas être validés en les corrélant avec l'étalon d'or (validité concourante) : la corrélation entre les indices de l'HGPO et du clamp ne sont présentés qu'à titre indicatif dans ce projet. Cette étude propose ainsi de comparer des indices issus de l'HGPO à ceux issus d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique, et surtout de tester la validité de construit, convergente, de ces indices en les corrélant avec des paramètres anthropométriques et métaboliques qui devraient être associés à une réduction de la suppressibilité des AGNE par l'insuline.

Nous avons choisi pour cette étude d'inclure une population de 29 femmes ayant un large spectre de sensibilité à l'insuline, i.e. 14 femmes atteintes du SOPK (connues comme étant

plus résistantes à l'insuline) et 15 femmes témoins (n'ayant aucun trouble endocrinien) (Vettor *et al.*, 2005). Pour toutes ces femmes, nous avons calculé des indices de suppression des AGNE induite par l'insuline issus du clamp (tableau 3) ainsi que d'autres issus de l'HGPO (tableau 6). Étant donné qu'elles sont plus résistantes à l'insuline que les femmes témoins, et que la lipotoxicité et un défaut de suppression des AGNE a été suggéré chez les femmes SOPK, les femmes SOPK devraient moins bien supprimer les AGNE de la circulation durant les tests proposés. Toutefois, les objectifs de cette étude ne visent pas la comparaison entre les deux groupes, mais plutôt d'avoir un plus large spectre de sensibilité à l'insuline et ainsi avoir une meilleure évaluation d'une future approche de mesure de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse. Par contre, afin de s'assurer que les résultats ne sont pas expliqués par un seul des deux groupes, et donc qu'ils s'appliquent à une population plus large, nous avons vérifié s'il y avait une interaction avec le statut SOPK pour toutes les analyses.

Objectifs

Objectif 1 : validation concourante des indices

Évaluer la relation entre les indices calculés à partir du clamp et ceux calculés de l'HGPO. Cela nous permettra de voir si les indices calculés à partir de l'HGPO et ceux dérivés du clamp donnent des résultats semblables, ce qui pourrait suggérer une certaine validité concourante de nos indices. Par contre, comme le clamp n'est pas considéré comme un étalon d'or, cette corrélation ne permettra pas de conclure de façon définitive sur la validité concourante des indices issus de l'HGPO. C'est pourquoi il faut valider ces indices plutôt de façon convergente pour des paramètres connus comme étant associés avec la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse.

Objectif 2 : validation de construit par convergence des indices

Objectifs 2a : validité convergente pour les paramètres anthropométriques

Il est connu que des paramètres anthropométriques (ratio T/H, %gras, MGT, IMG et IMC) sont reliés à la dysfonction adipeuse et devraient donc être associés à la suppression la lipolyse induite par l'insuline. Notre étude vise donc à déterminer la relation entre nos indices de suppression des AGNE par l'insuline dérivés des 2 techniques et ces paramètres

anthropométriques, particulièrement ceux d'adiposité centrale. Donc, nous voulons identifier lequel de ces indices, orrèle le mieux avec ces paramètres anthropométriques pour ce type de population.

Objectifs 2b : validité convergente pour les paramètres métaboliques

De plus, des paramètres métaboliques, tels que la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie compensatoire, la tolérance au glucose et la fonction de la cellule bêta, sont causés par la lipotoxicité et donc reliés à la suppression de la lipolyse par l'insuline. Notre étude vise donc à déterminer la relation entre nos indices de suppression des AGNE par l'insuline et ces paramètres métaboliques et ainsi identifier celui ou ceux qui présentent les meilleures corrélations.

CHAPITRE II : ARTICLE

Indices of antilipolytic insulin sensitivity measured during an oral glucose challenge and their association with insulin-glucose clamp indices and central adiposity in women

Auteurs de l'article : Naimi F, BSc¹; Battista MC, PhD¹; Carpentier AC, MD^{1,2}; Baillargeon JP, MD, MSc^{1,2}

Statut de l'article : Soumis le 16 mars 2014; Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Refusé par ce journal. Actuellement en révision.

Avant-propos :

J'ai été responsable des expériences réalisées pour cet article. J'étais responsable du recrutement des patientes, des suivis, des rencontres et explications des formulaires de consentement, de l'organisation et la préparation des expériences (depuis la commande du

matériel jusqu'à la fin de l'expérience), de la collecte et la gestion des échantillons ainsi que du suivi avec le comité d'éthique de recherche sur les humains.

Du point de vue rédaction de l'article, j'ai rédigé la première version qui a été redirigée vers mon directeur, le Pr. Jean-Patrice Baillargeon ainsi que vers les co-auteurs pour révision. Par la suite, le tout m'avait été retourné afin que je puisse intégrer les suggestions pour produire une version finale que nous avons soumise.

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE :

Contexte : L'exposition prolongée des tissus maigres aux acides gras non estérifiés (AGNE) est un élément clé du développement des conditions métaboliques. Le défaut de suppression de lipolyse par l'insuline serait un mécanisme important de la surexposition des tissus aux AGNE et par conséquent, le développement de la lipotoxicité.

Objectifs : Déterminer des indices de suppression des AGNE par l'insuline issus de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) qui sont les mieux associés aux indices issus du clamp, les paramètres d'adiposité centrale et ceux de la dysfonction métabolique.

Participants : 29 femmes non atteintes du diabète de type 2 incluant 15 saines et 14 atteintes du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK).

Principales mesures : Les indices calculés à partir des résultats de l'HGPO sont : aire sous la courbe décroissante des AGNE, pente négative log-linéaire des AGNE, pourcentage de suppression des AGNE et le temps nécessaire pour supprimer 50 % des niveaux d'AGNE. Les indices calculés à partir du clamp glucose-insuline sont le delta AGNE et le pourcentage de suppression des AGNE par rapport aux valeurs à jeun.

Résultats : En comparant les indices issus des deux techniques, clamp et HGPO, ceux qui corréleront le mieux sont le $T_{50AGNE}[HGPO]$ avec $\%supp_{AGNE}[clamp]$ ($r = -0.58$). De plus, le $T_{50AGNE}[HGPO]$ corréle significativement, pour les 2 groupes de femmes, avec toutes les mesures anthropométriques ($r = 0.44$ à 0.64), la tolérance au glucose ($r = 0.39$ à 0.43), l'insulinémie ($r = 0.41$ à 0.53), ainsi que ceux de la sensibilité du glucose à l'insuline ($r = -0.42$ à -0.51). Pour les indices issus du clamp euglycémique, le $\%supp_{AGNE}[clamp]$ corréle significativement chez toutes les femmes avec tous les paramètres anthropométriques ($r = -0.45$ à -0.57), l'insulinémie ($r = -0.39$ à -0.55) et ceux de la sensibilité du glucose à l'insuline ($r = 0.51$ à 0.66).

Conclusions : Parmi les indices issus de l'HGPO, le T_{50AGNE} semble être l'indice qui corréle le mieux avec ceux issus du clamp et il est associé aux paramètres anthropométriques et métaboliques aussi bien qu'avec le meilleur indice issu du clamp. Chez les femmes, l'HGPO peut donc être suggérée comme méthode simple et moins coûteuse afin d'estimer la sensibilité à l'insuline pour la suppression de la lipolyse simplement en calculant le T_{50AGNE} . Toutefois, d'autres études de validation pourraient être nécessaires en utilisant une population plus large.

ABSTRACT:

Context: Tissue overexposure to non-esterified fatty acids (NEFA) is a key feature in the development of metabolic conditions, with insulin-suppression of lipolysis being an important mechanism in limiting this overexposure.

Objective: To determine NEFA insulin-suppression indices derived from the oral glucose tolerance test (OGTT) that are best associated with indices derived from insulin-glucose clamp, and indices associated with central adiposity and glucoregulatory parameters.

Design and Setting: Cross-sectional study conducted at an academic center.

Participants: Twenty-nine women without diabetes; 15 healthy and 14 with polycystic ovary syndrome.

Main Outcome Measures: OGTT indices of NEFA insulin-suppression were: decremental NEFA AUC, negative log-linear NEFA slope, percentage of NEFA suppression (%NEFA_{supp}) and time to suppress 50% NEFA levels (T50_{NEFA}). Indices derived from the two-step euglycemic-hyperinsulinemic clamp (low-dose insulin) were: delta NEFA and %NEFA_{supp}[clamp].

Results: The OGTT and clamp indices that were best correlated together for both groups were T50_{NEFA}[OGTT] with %NEFA_{supp}[clamp] ($r=-0.58$). Additionally, T50_{NEFA} correlated significantly in all women with all anthropometric measurements ($r=0.44-0.64$), glucose tolerance ($r=0.39-0.43$), insulinemia ($r=0.41-0.53$), and glucose insulin-sensitivity ($r=-0.42-0.51$). Similarly, %NEFA_{supp}[clamp] correlated significantly in all women with all anthropometric measurements ($r=-0.45-0.57$), insulinemia ($r=-0.39-0.55$), and glucose insulin-sensitivity indices ($r=0.51-0.66$). No other correlation was significant for all women.

Conclusions: T50_{NEFA} was the OGTT-derived NEFA insulin-suppression index best correlated with a clamp index, namely %NEFA_{supp}, and these indices were the ones best correlated with both anthropometric and glucoregulatory parameters. Thus, in women, the use of an OGTT to calculate T50_{NEFA} appears as a valid method to assess antilipolytic insulin action that is simple to perform.

INTRODUCTION

Insulin resistance (IR) is a metabolic condition that may lead to the development of type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular complications (Lewis *et al.*, 2002). One of the key mechanisms involved in the establishment of IR and beta-cell failure is lipotoxicity, which is defined as cellular dysfunction resulting from high exposure to non-esterified fatty acids (NEFA) (Carpentier, 2008). After a meal, the rise in insulin levels suppresses circulating NEFA levels (Frayn *et al.*, 1994) by enhancing adipose tissue NEFA uptake, but mostly by inhibiting adipose tissue lipolysis (Carpentier *et al.*, 2005). During fasting, circulating NEFA levels increase because insulin no longer inhibits lipolysis (Jansson *et al.*, 1992, Ruge *et al.*, 2009). Accordingly, antilipolytic insulin-resistance contributes to maintaining high circulating levels of NEFA, both during fasting and postprandially, and thus plays an important role in the development of lipotoxicity (Campbell *et al.*, 1994). Consequently, insulin-mediated suppression of NEFA levels is an important parameter for assessing the risk for an individual to develop non-adipose tissue lipotoxicity, which could lead to cardiometabolic complications such as T2D (Nellemann *et al.*, 2012).

Up to now, studies have focused on the evaluation of the glucoregulatory action of insulin with less interest on its antilipolytic action (Van Pelt *et al.*, 2013). The gold standard method for assessing insulin-mediated glucose regulation is the euglycemic-hyperinsulinemic clamp, which measures the glucose disposal rate at high insulin dose ($40 \text{ mU/m}^2 \cdot \text{min}$) (DeFronzo *et al.*, 1979). This technique is simple to interpret because it achieves static levels of metabolic parameters at the end of each step of the clamp. Accordingly, some investigators have measured the antilipolytic action of insulin using the euglycemic-hyperinsulinemic clamp with a low-dose insulin step ($10 \text{ mU/m}^2 \cdot \text{min}$), i.e. an insulin dose that does not completely suppress NEFA levels (Groop *et al.*, 1992, Stumvoll *et al.*, 2001). However, this technique is time-consuming, expensive and cannot be used on large cohorts.

On the other hand, the oral glucose tolerance test (OGTT) is a simple method commonly used to determine individual glucose tolerance following a 75-g glucose load. This dynamic technique has also been used to estimate insulin-mediated glucose disappearance by

calculating different integrative indices (Abdul-Ghani *et al.*, 2009, Henderson *et al.*, 2012). Although these indices do not directly measure glucose insulin sensitivity, they have been shown to correlate well with the gold-standard clamp technique (Cheng *et al.*, 2004). Since the OGTT is easier to conduct and can be used on large cohorts (Matsuda and DeFronzo, 1999), its use has recently been proposed to estimate the antilipolytic action of insulin as well (Axelsen *et al.*, 2000, Holt *et al.*, 2006, Van Pelt *et al.*, 2013).

Because of the growing evidence linking the development of cardiometabolic conditions to lipotoxicity and the key contribution of antilipolytic insulin sensitivity to non-adipose tissue NEFA exposure, there is an important need for investigators to measure insulin-mediated NEFA suppression in large cohorts of subjects using a simple technique. Accordingly, this cross-sectional study aimed at determining the OGTT-derived NEFA insulin-suppression index that is best associated with glucose-insulin clamp indices and/or clinical markers of antilipolytic insulin resistance. Since the OGTT is a dynamic test, the first objective of the study was to determine whether NEFA insulin-suppression indices derived from the OGTT were correlated with indices obtained with the static euglycemic-hyperinsulinemic clamp technique. However, since there is no recognized gold-standard technique for measuring antilipolytic insulin action, the second objective of the study was to determine the association of all these indices with other clinical markers of antilipolytic insulin resistance, namely: a) measurements of adiposity or central obesity, which lead to adipose tissue overload and/or dysfunction (Despres, 2012), and b) parameters of glucoregulatory dysfunction, which have been linked to lipotoxicity (Carpentier, 2013).

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Subjects

In order to assess the performance of insulin-mediated NEFA suppression indices in a population with significant metabolic variability, a group of women with PCOS was recruited, since they are known to be more insulin-resistant than non-PCOS women with the same level of obesity (Baillargeon *et al.*, 2004). A convenient sample of healthy and PCOS women was recruited between January 2007 and September 2011 at the Clinical Research Center of *Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke* (CHUS). Healthy volunteers were

recruited through advertizing or contacts while PCOS women were recruited through the CHUS Reproductive Endocrinology Clinic directed by Dr Baillargeon. All women aged 18 to 40 years were eligible to participate in the study if they had a BMI between 18-40 kg/m² and were not taking any medication known to affect glucose or NEFA metabolism, including oral contraceptives, during the 3 months prior to the screening visit. Women with diabetes, based on the OGTT (fasting glucose \geq 126 mg/dL or 2-h glucose \geq 200 mg/dL), or pregnant were excluded (American Diabetes, 2014). Women were diagnosed with PCOS based on the Androgen Excess & PCOS diagnostic criteria (Azziz *et al.*, 2009), although most women did not have a transvaginal ovarian ultrasound. Anthropometric measurements were performed with body fat percentage determined by standing electrical bioimpedance (Tanita weight scale model TBF-300A, Arlington Heights, IL). This study was approved by the CHUS Human Research Ethics Committee and written informed consent was obtained from all participants, in accordance with the Declaration of Helsinki.

Tableau 7. Participants' anthropometric measures and metabolic characteristics.

	All	Non-PCOS women	PCOS women
N	29	15	14
Age (years)	29.5 \pm 5.5	28.5 \pm 5.9	30.6 \pm 5.0
Weight (Kg)	70.4 \pm 13.0	62.4 \pm 6.2	78.9 \pm 13.1*
BMI (Kg/m ²)	25.9 \pm 5.6	22.7 \pm 2.3	29.3 \pm 6.3*
Waist circumference (cm)	83 \pm 12	75 \pm 7	90 \pm 12*
WHR	0.80 \pm 0.08	0.78 \pm 0.07	0.82 \pm 0.08
Fat % (%)	33.2 \pm 8.0	28.2 \pm 5.0	38.6 \pm 7.0*
FMI (Kg/m ²)	9.01 \pm 4.15	6.51 \pm 1.73	11.68 \pm 4.36*
FM/LM (ratio)	0.52 \pm 0.19	0.40 \pm 0.10	0.65 \pm 0.19*
HOMA-IR	5.46 (3.05-10.45)	5.05 (2.93-6.19)	6.43 (4.52-14.8)
Fasting glucose (mg/dL)	78.8 \pm 6.8	78.8 \pm 6.1	78.8 \pm 7.7
Fasting insulin (μ U/mL)	4.00 (2.15-8.21)	3.45 (2.07-4.72)	5.12 (3.36-11.46)
Fasting NEFA (mmol/L)	0.46 \pm 0.18	0.37 \pm 0.13	0.56 \pm 0.19*
OGTT-derived metabolic parameters			
Glucose at 120 min (mg/dL)	120.0 \pm 25.1	113.0 \pm 19.6	127.5 \pm 28.7
Insulin at 120 min (μ U/mL)	43.5 (25.2-69.9)	35.3 (24.5-22.2)	59.2 (38.2-104.5)*
AUC glucose (mmol·min/L)	859 \pm 166	803 \pm 111	919 \pm 197
AUC insulin (mU·min/L)	5.32 (3.68-7.62)	3.86 (3.13-5.32)	6.49 (5.31-11.26)*
ISI Matsuda	8.38 \pm 4.13	10.66 \pm 3.35	5.92 \pm 3.49*
AUC NEFA (mmol·min/L)	16.3 (11.6-23.0)	13.0 (9.4-16.7)	22.4 (15.0-28.6)*
Clamp-derived metabolic parameters			
M value (μ mol/kg·min)	48.1 \pm 20.6	57.3 \pm 16.1	38.2 \pm 20.9*

Results are reported as mean \pm SD, except for variables not normally distributed that are reported as median with (25th-75th percentiles).

AUC = area under the curve; BMI = body mass index; FM/LM = ratio of total fat mass to total non-fat mass (approximate lean mass); FMI = fat mass index ((Weight (Kg) \times Fat %)/Height² (m)); HOMA-IR = homeostasis model assessment of insulin resistance (Fasting insulin \times Fasting glucose/22.5); M value = measure of insulin-mediated glucose utilization (insulin sensitivity); NEFA = non-esterified fatty acids; OGTT = oral glucose tolerance test and WHR = waist to hip circumferences ratio.

* *P* value \leq 0.05 for difference between groups.

Oral glucose tolerance test and euglycemic-hyperinsulinemic clamp

Participants were instructed to fast for 12 hours and not to engage in any heavy exercise, drink alcohol or smoke more than 5 cigarettes per day during the 48 hours before each of the following experimental visits. All women were studied in the early follicular phase of their menstrual cycle, i.e. between the 2nd and 5th day after their cycle. For the OGTTs, blood samples were collected at 10-min intervals from -20 to 0 minutes, for baseline, and from 0 to 120 minutes after a 75-g glucose load. For the two-step euglycemic-hyperinsulinemic clamp technique, plasma NEFA and insulin concentrations were measured at -30, -20, -10 and 0 min for baseline. At time 0, a prime-continuous infusion of human regular insulin (Novolin; Novo Nordisk Pharmaceuticals, Princeton, NJ) was initiated at the low dose of 10 mU \cdot min⁻¹ \cdot m⁻² body surface area and continued for 120 min, in order to measure insulin-mediated NEFA suppression indices. At time 120 min, insulin infusion rate was increased at 40 mU \cdot min⁻¹ \cdot m⁻² and continued for another two hours in order to measure insulin-mediated glucose disappearance (*M*-value). Arterialized blood samples were collected every 5 min during the entire duration of the clamp for assessment of plasma glucose levels using the glucose oxidase method (Beckman Coulter Glucose Analyzer II, Mississauga, Ontario, Canada). Plasma glucose was maintained stable at 90 \pm 9 mg/dL by adjusting the perfusion rate of a 20% Dextrose infusion.

Biochemical assays

Samples were rapidly centrifuged and frozen at -80°C for subsequent analyses. Plasma glucose concentrations were assayed by the glucose hexokinase technique (Raichem). Human insulin was measured by radioimmunoassay (RIA Kit; Millipore Human Insulin

assay). NEFA levels were assayed by colorimetric assay (Wako Chemicals), the only available validated method, which has a minimum level of detection of 0.0014 mmol/L.

Calculations

Areas under the curves (AUC) were calculated using the trapezoidal method. OGTT-derived glucose insulin sensitivity was estimated by calculating the Matsuda insulin sensitivity index (ISI Matsuda= $10,000/[\text{square root}(\text{fasting glucose (mg/dL)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{mean glucose (mg/dL)} \times \text{mean insulin } (\mu\text{U/mL}))]$) (Matsuda and DeFronzo, 1999). In order to estimate the sensitivity to insulin-mediated NEFA suppression during OGTT, the following indices were calculated: decremental NEFA AUC ($\text{dAUC}_{\text{NEFA}} = (\text{basal NEFA} \times 120 \text{ min}) - \text{total NEFA AUC}$), SlopeLnNEFA (the negative \log_n -linear slope of the decrease in NEFA levels during the entire course of the OGTT), percentage of NEFA suppression ($\% \text{NEFA}_{\text{supp}} = [(\text{Mean baseline levels} - \text{Nadir levels}) \div \text{Mean baseline levels}]$) and T50_{NEFA} (time required to suppress 50% of baseline NEFA levels). Higher anti-lipolytic insulin sensitivity will result in more pronounced NEFA suppression and thus, higher values for $\text{dAUC}_{\text{NEFA}}$, SlopeLnNEFA (steeper slope) and $\% \text{NEFA}_{\text{supp}}$; but a shorter T50_{NEFA}.

Insulin-mediated glucose utilization during the clamp (*M*-value) was calculated as the mean glucose infusion rate ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) during the last 20 min of the high dose insulin clamp (steady-state) corrected for the participants' weight ($\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Indices of insulin-induced NEFA suppression calculated from the low-insulin step of the clamp were: delta NEFA ($\Delta \text{NEFA} = (\text{Mean NEFA levels; from 100-120 min}) - (\text{Mean NEFA levels; from baseline})$) and percentage of NEFA suppression ($\% \text{NEFA}_{\text{supp}} = (\Delta \text{NEFA} \div \text{Mean baseline NEFA})$).

Statistical analyses

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD), except for variables that are not normally distributed, which are presented as median with their interquartile range (25th-75th percentile). For all statistical analyses, variables with non-normal distribution were

mathematically transformed in order to render them normally distributed. Pearson correlation coefficients were performed to test any significant correlations between the NEFA insulin-suppression indices, and between these indices and other parameters of interest. For each correlation, multivariate linear regressions were performed to assess interactions between PCOS status and NEFA insulin-suppression indices. Statistical significance was established at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Anthropometric and metabolic parameters

Twenty-nine non-Hispanic Caucasian women were recruited for the present study, 15 non-PCOS and 14 PCOS women. None of the participants had impaired fasting glucose, but two non-PCOS (13%) and three PCOS (21%) women had impaired glucose tolerance (17% of all women). Characteristics of the participants are presented in Table 7. Women were of similar age, but all anthropometric measurements were significantly higher in PCOS vs. non-PCOS women (all $P < 0.001$), except for waist-to-hip ratio. Women with PCOS were included in this study in order to expand the range of metabolic states of the participants (Table 7). Accordingly, as compared to non-PCOS women, PCOS women had significantly higher NEFA fasting levels ($P = 0.004$) and AUC ($P = 0.03$), increased insulin 2-h levels ($P = 0.01$) and AUC ($P = 0.002$), and reduced glucose insulin sensitivity (by 44% for ISI Matsuda, $P < 0.001$; and by 33% for M -value, $P = 0.01$).

With regards to antilipolytic insulin sensitivity indices, $dAUC_{NEFA}$ (OGTT) and $\Delta NEFA$ (clamp) were significantly higher in PCOS as compared to non-PCOS women, which would suggest higher insulin-mediated NEFA suppression. However, $SlopeLnNEFA$ and $\%NEFA_{supp}$ (OGTT and clamp) were slightly lower in PCOS women, while $T50_{NEFA}$ was prolonged by 18%, suggesting reduced insulin-mediated NEFA suppression. Of note, absolute differences in NEFA AUC during the OGTT or NEFA levels during the clamp yielded inverse results compared to the other indices, likely because higher fasting NEFA levels is the main determinant of the absolute subsequent decrease in NEFA levels induced

by insulin (correlation: $r=0.61-0.88$, both $P<0.001$). These indices thus mainly reflect increased fasting lipolysis rather than insulin-mediated suppression of lipolysis, which is the objective of the present study. They were nevertheless included in subsequent analyses in order to provide evidence of their inadequacy.

Tableau 8. Indices of insulin-mediated NEFA suppression derived from the OGTT or the euglycemic-hyperinsulinemic clamp.

	All (n=29)	Non-PCOS women (n=15)	PCOS women (n=14)
OGTT-derived indices of insulin-mediated NEFA suppression			
<i>Indices of sensitivity to antilipolytic insulin action</i>			
dAUC _{NEFA} (mmol·min/L)	36.3 ± 14.8	29.5 ± 8.9	43.7 ± 16.6*
SlopeLnNEFA (mmol _(Ln) /L·min)	0.034 ± 0.011	0.035 ± 0.013	0.034 ± 0.009
%NEFA _{supp} (%)	95.6 (93.5-98.0)	96.4 (91.9-98.4)	95.5 (93.9-97.7)
<i>Indices of resistance to antilipolytic insulin action</i>			
T50 _{NEFA} (min)	34.8 ± 14.4	32.0 ± 13.3	37.8 ± 15.4
Clamp-derived indices of insulin-mediated NEFA suppression			
<i>Indices of sensitivity to anti-lipolytic insulin action</i>			
ΔNEFA (mmol/L)	450 ± 181	402 ± 176	500 ± 177
%NEFA _{supp} (%)	91.2 (82.1-94.7)	91.8 (90.7-94.6)	85.4 (73.8-95.0)

Results are reported as mean ± SD, except for variables not normally distributed that are reported as median with (25th-75th percentiles).

%NEFA_{supp} = delta NEFA from basal to Nadir corrected by baseline; ΔNEFA = difference between mean steady-state NEFA levels and baseline from clamp; dAUC_{NEFA} = decremental area under the NEFA curve; NEFA = non-esterified fatty acids; OGTT = oral glucose tolerance test; SlopeLnNEFA = negative slope of the log-linear of NEFA curve; and T50_{NEFA} = time required to suppress 50 % of NEFA from baseline.

* P value ≤0.05 for difference between groups.

Correlations between OGTT- and clamp-derived indices of NEFA suppression

As shown in Table 9, certain indices correlated with each other but not always in the proper direction: these correlation coefficients are in parentheses. dAUC_{NEFA} (OGTT) correlated significantly with ΔNEFA (clamp) in all women, which resulted from a stronger correlation in PCOS women (P for interaction=0.03), but did not correlate at all with %NEFA_{supp} (clamp). SlopeLnNEFA (OGTT) did not correlate with ΔNEFA (clamp), but displayed a significant correlation with %NEFA_{supp} (clamp) only in PCOS women (P for interaction=0.03). %NEFA_{supp} (OGTT) did not correlate with any of the indices derived from the clamp. Finally, T50_{NEFA} (OGTT) correlated significantly with %NEFA_{supp} (clamp) in all

women, without interaction, but not with Δ NEFA (clamp). Of note, there was a significant correlation between OGTT- and clamp-derived indices of glucose insulin sensitivity (ISI Matsuda vs. M -value, $r=0.66$, $P<0.001$, data not shown).

Tableau 9. Relationships between indices of insulin-mediated NEFA suppression calculated from the OGTT and those from the euglycemic-hyperinsulinemic clamp

		Euglycemic hyperinsulinemic clamp			
		<i>Insulin sensitivity indices</i>			
		Δ NEFA	<i>P value</i>	%NEFA _{supp}	<i>P value</i>
OGTT					
<i>Insulin sensitivity indices</i>					
dAUC _{NEFA}	All women (n=29):	0.49*	0.007	0.11	0.58
	Non-PCOS w (n=15):	0.08	0.78	0.13	0.65
	PCOS w (n=14):	0.65	0.01	0.31	0.27
SlopeLnNEFA	All women (n=29):	(-0.34)	0.07	0.17*	0.39
	Non-PCOS w (n=15):	(-0.47)	0.08	(-0.13)	0.63
	PCOS w (n=14):	(-0.16)	0.58	0.56	0.04
%NEFA _{supp}	All women (n=29):	(-0.27)*	0.16	(-0.06)	0.75
	Non-PCOS w (n=15):	(-0.58)	0.02	(-0.27)	0.33
	PCOS w (n=14):	0.14	0.64	0.11	0.71
<i>Insulin resistance index</i>					
T50 _{NEFA}	All women (n=29):	(0.27)	0.15	-0.58	0.0009
	Non-PCOS w (n=15):	(0.27)	0.34	-0.56	0.03
	PCOS w (n=14):	(0.20)	0.49	-0.57	0.03

Results are Pearson's correlation coefficients. Parentheses mean that the correlation is in the wrong direction. In order to normalize their distributions for correlations, %NEFA_{supp} (OGTT and Clamp) were transformed using $\log_n(1 - \%NEFA_{supp})$.

%NEFA_{supp} = delta NEFA from basal to Nadir corrected by baseline; Δ NEFA = difference between mean steady-state NEFA levels and baseline from clamp; dAUC_{NEFA} = decremental area under the NEFA curve; NEFA = non-esterified fatty acids; OGTT = oral glucose tolerance test; SlopeLnNEFA = negative slope of the log-linear of NEFA curve; T50_{NEFA} = time required to suppress 50 % of NEFA from baseline; and w = women.

* P value ≤ 0.05 for interaction with women's groups, which means correlations are significantly different between groups and thus correlations should be considered for each women's group separately.

Correlations between indices of NEFA suppression and anthropometric measurements

Again in Table 10, correlation coefficients in the wrong direction are presented in parentheses. As shown, dAUC_{NEFA} (OGTT) and Δ NEFA (clamp) did not correlate in the proper direction with any of the anthropometric parameters. Both SlopeLnNEFA and %NEFA_{supp} (OGTT) showed no correlation with anthropometric measurements in all women, but they were significantly correlated with most anthropometric parameters in PCOS

women (P for interaction ≤ 0.03). $T50_{NEFA}$ correlated significantly with all anthropometric measurements in all women. These correlations were similar between groups, without significant interaction, except for a significantly better correlation in PCOS women for FMI (P for interaction = 0.05). Furthermore, $\%NEFA_{supp}$ (clamp) also correlated significantly with all anthropometric measurements in all women. Although there was no significant interaction, correlations seemed stronger in PCOS women, except for W/H.

Tableau 10. Relationship between anthropometric measures and all indices of insulin-mediated NEFA suppression, calculated from the oral glucose tolerance test or the euglycemic-hyperinsulinemic clamp.

NEFA levels & calculated indices		Anthropometric measures					
		BMI	WC	W/H	Fat %	FMI	FM/LM
Indices of sensitivity to antilipolytic insulin action							
dAUC _{NEFA}	All women:	(0.03)	(0.24)	(0.35)	(0.18)	(0.09)	(0.16)
	Non-PCOS w:	-0.19	(0.09)	(0.34)	(0.02)	-0.06	(0.01)
	PCOS w:	-0.39	-0.14	(0.25)	-0.33	-0.39	-0.32
SlopeLnNEFA	All women:	-0.29*	-0.34*	-0.28	-0.14*	-0.25*	-0.20*
	Non-PCOS w:	-0.02	-0.06	-0.11	(0.20)	(0.07)	(0.14)
	PCOS w:	-0.64[†]	-0.75[†]	-0.52	-0.60[†]	-0.64[†]	-0.62[†]
$\%NEFA_{supp}$	All women:	-0.26*	-0.33*	-0.34	-0.15*	-0.25*	-0.20*
	Non-PCOS w:	(0.08)	-0.03	-0.17	(0.23)	(0.12)	(0.17)
	PCOS w:	-0.52	-0.65[†]	-0.51	-0.51	-0.56[†]	-0.53[†]
Index of resistance to antilipolytic insulin action							
T50 _{NEFA}	All women:	0.64[†]	0.64[†]	0.44[†]	0.60[†]	0.63*[†]	0.62[†]
	Non-PCOS w:	0.70[†]	0.70[†]	0.54[†]	0.46	0.60[†]	0.50
	PCOS w:	0.70[†]	0.70[†]	0.30	0.75[†]	0.74[†]	0.77[†]
Euglycemic clamp							
Indices of sensitivity to antilipolytic insulin action							
$\Delta NEFA$	All women:	(0.03)	(0.32)	(0.50[†])	(0.01)	(0.03)	(0.05)
	Non-PCOS w:	-0.14	(0.17)	(0.47)	-0.31	-0.23	-0.27
	PCOS w:	-0.21	(0.09)	(0.44)	-0.20	-0.20	-0.16
$\%NEFA_{supp}$	All women:	-0.56[†]	-0.57[†]	-0.45[†]	-0.54[†]	-0.56[†]	-0.55[†]
	Non-PCOS w:	-0.34	-0.40	-0.46	-0.24	-0.28	-0.24
	PCOS w:	-0.63[†]	-0.64[†]	-0.39	-0.70[†]	-0.67[†]	-0.70[†]

Results are Pearson's correlation coefficients. Parentheses mean that the correlation is in the wrong direction. In order to normalize their distributions for correlations, $\%NEFA_{supp}$ (OGTT and Clamp) were transformed using $\log_n(1 - \%NEFA_{supp})$.

$\%NEFA_{supp}$ = delta NEFA from basal to nadir corrected by baseline; $\Delta NEFA$ = difference between mean steady-state NEFA levels and baseline from clamp; BMI = body mass index; dAUC_{NEFA} = decremental area under the NEFA curve; Fat % = percentage of fat measured by foot to foot bioimpedance; FM/LM = ratio of total fat mass to total non-fat mass (approximate lean mass); FMI = fat mass index ((Weight (Kg) × Fat %)/Height² (m)); NEFA = non-esterified fatty acids; OGTT = oral glucose tolerance test; SlopeLnNEFA = negative slope of the log-linear of NEFA curve; T50_{NEFA} = time required to suppress 50 % of NEFA from baseline; w = women; WC = waist circumference; and WHR = waist to hip ratio.

* *P value* ≤ 0.05 for interaction with women's groups, which means correlations are significantly different between groups and thus correlations should be considered for each women's group separately.

† *P value* ≤ 0.05 for correlation.

Correlations between indices of NEFA suppression and metabolic parameters

As shown in Table 11, dAUCNEFA, SlopeLnNEFA %NEFA_{supp} (OGTT) and Δ NEFA (clamp) did not correlate with any of the metabolic parameters assessed in this study for all women. In contrast, T50_{NEFA} was correlated significantly with glucose tolerance (2h-glucose and glucose AUC), insulinemia (fasting insulin and 2h-insulin) and glucose insulin sensitivity measured during the OGTT (ISI Matsuda) and the clamp (*M*-value). Similarly, %NEFA_{supp} (clamp) was significantly and negatively associated with measurements of insulinemia, and positively with OGTT- and clamp-derived measurements of glucose insulin sensitivity. Interestingly, these correlations were essentially due to significant correlations only in the sub-group of PCOS women, with significant interactions with T50_{NEFA} for 2h-insulin levels ($P=0.005$), insulin AUC ($P=0.005$) and ISI Matsuda ($P=0.02$). However, %NEFA_{supp} (clamp) was significantly correlated with *M*-value in all women and within all sub-groups.

Tableau 11. Relationship between metabolic parameters and all indices of insulin-mediated NEFA suppression, calculated from the oral glucose tolerance test of the euglycemic-hyperinsulinemic clamp.

Calculated indices	Adverse metabolic parameters						Glucose insulin sensitivity		
	Fast Gluc	Gluc 2h	AUC Gluc	Fast Ins	Ins 2h	AUC Ins	ISI Matsuda	M value	
<i>Indices of sensitivity to antilipolytic insulin action</i>									
dAUC _{NEFA}	All women:	-0.14	(0.60)	(0.47 [†])	-0.06	(0.23)	(0.16)	(-0.11)	(-0.12)
	Non-PCOS w:	-0.07	(0.37)	(0.44)	-0.03	(0.06)	0.01	0.03	0.24
	PCOS w:	-0.21	(0.62 [†])	(0.34)	-0.38	(0.02)	0.19	0.38	0.10
SlopeLnNEFA	All women:	-0.30	-0.17	-0.32	-0.30	(0.05)	(0.06)	0.10	0.27
	Non-PCOS w:	-0.48	(0.01)	-0.25	-0.13	(0.45)	(0.37)	(-0.17)	0.19
	PCOS w:	-0.09	-0.40	-0.49	-0.57[†]	-0.24	-0.21	0.50	0.45
%NEFA _{supp}	All women:	-0.33	-0.04	-0.20	-0.18	(0.17)	(0.11)	0.01	0.10
	Non-PCOS w:	-0.45	-0.02	-0.20	0.05)	(0.57)	(0.39)	(-0.27)	(-0.06)
	PCOS w:	-0.22	-0.02	-0.22	-0.41	0.00	(0.03)	0.27	0.25
<i>Index of resistance to antilipolytic insulin action</i>									
T50 _{NEFA}	All women:	0.14	0.43[†]	0.38[†]	0.53[†]	0.41^{*†}	0.22*	-0.42^{*†}	-0.51[†]
	Non-PCOS w:	0.34	0.44	0.37	0.17	(-0.24)	(-0.50)	(0.08)	-0.38
	PCOS w:	(-0.01)	0.38	0.33	0.73[†]	0.69[†]	0.55[†]	-0.80[†]	-0.55[†]
Euglycemic clamp									
<i>Indices of sensitivity to antilipolytic insulin action</i>									
ΔNEFA	All women:	-0.09	(0.54^{*†})	(0.37)	-0.06	0.00	-0.10	0.08	(-0.15)
	Non-PCOS w:	(0.07)	(0.17)	(0.27)	-0.24	-0.48	-0.47	0.47	(-0.26)
	PCOS w:	-0.24	(0.77[†])	(0.35)	-0.12	(0.04)	-0.19	0.14	0.16
%NEFA _{supp}	All women:	(0.22)	-0.29	-0.29	-0.55[†]	-0.47[†]	-0.39[†]	0.51[†]	0.66[†]
	Non-PCOS w:	(0.16)	-0.21	-0.13	-0.20	-0.11	-0.13	0.10	0.61[†]
	PCOS w:	(0.27)	-0.26	-0.28	-0.71[†]	-0.56[†]	-0.58[†]	0.78[†]	0.67[†]

Results are Pearson's correlation coefficients. Parentheses mean that the correlation is in the wrong direction. In order to normalize their distributions for correlations, %NEFA_{supp} (OGTT and Clamp) were transformed using $\log_n(1 - \%NEFA_{supp})$; and Fast Ins, Ins 2h and AUC Ins were directly \log_n -transformed.

%NEFA_{supp} = delta NEFA from basal to Nadir corrected by baseline; ΔNEFA = difference between mean steady-state NEFA levels and baseline from clamp. Fast Ins, Ins 2h and AUC Ins were \log -transformed for data analysis. AUC Gluc = Area under the glucose curve during OGTT; AUCIns = Area under the insulin curve during OGTT; dAUC_{NEFA} = decremental area under the NEFA curve; Fast Gluc = Fasting glucose; Fast Ins = Fasting insulin; Gluc 2h = Glucose level at 120 min during OGTT; Ins 2h = Insulin level at 120 min during OGTT; ISI Matsuda = insulin sensitivity index; M value = Glucose infusion rate during clamp steady state corrected for weight; NEFA = non-esterified fatty acids; OGTT = oral glucose tolerance test; SlopeLnNEFA = negative slope of the log-linear NEFA curve; and T50_{NEFA} = time required to suppress 50 % of NEFA from baseline.

* *P* value ≤0.05 for interaction with women's groups, which means correlations are significantly different between groups and thus correlations should be considered for each women's group separately. † *P* value <0.05 for correlation.

DISCUSSION

In this sample of twenty nine women presenting a large range of obesity and glucose insulin sensitivity (Table 7), $T50_{NEFA}$ was the only OGTT-derived index of insulin-mediated NEFA suppression that was significantly associated for all women with such an index derived from the clamp, namely $\%NEFA_{supp}$ (Table 3). This correlation was also very consistent in both sub-groups of women. Moreover, $T50_{NEFA}$ and $\%NEFA_{supp}$ (clamp) were the only indices significantly associated with all anthropometric measurements and most parameters of glucose metabolism assessed in this study. Of note, most associations with glucoregulatory parameters were essentially driven by strong significant correlations in PCOS women rather than in non-PCOS women.

It has been shown that obesity, especially of abdominal distribution (clinically measured by WC or W/H ratio), is a risk factor for the development of T2D and cardiovascular diseases (Despres, 2012). This relationship was suggested to be in large part explained by lipotoxicity (Carpentier, 2008). Lipotoxicity is defined by a tissue or cellular dysfunction in response to a high prolonged exposure to NEFA (Carpentier, 2008). Adipose tissue is known to have a primary role for NEFA storage and release depending on the required energy demand, and this is regulated mainly by insulin (Frayn, 2002). Indeed, during the postprandial state, when insulin increases in response to the rise in glucose levels, insulin stimulates the activity of lipoprotein lipase in order to store triglycerides that circulate in triglyceride-rich lipoprotein (Albu *et al.*, 2010, Borel *et al.*, 2013). During this period, insulin also inhibits adipose tissue hormone-sensitive lipase in order to reduce lipolysis (Unger, 1995). Thus, a resistance of adipocytes to the antilipolytic action of insulin contributes to the excessive release of NEFA into the circulation (Unger, 1995) and subsequent overexposure of peripheral tissues to NEFA leading to lipotoxicity (Carpentier, 2013). It is therefore important to measure antilipolytic insulin sensitivity *in vivo* using easy to use indices that demonstrate appropriate validity, which is the purpose of this study.

Although the euglycemic-hyperinsulinemic clamp is the gold standard for evaluating glucose insulin sensitivity (DeFronzo *et al.*, 1979), few studies have also used the clamp for the

assessment of the antilipolytic action of insulin (Jocken *et al.*, 2013, Stumvoll *et al.*, 2001, Trikudanathan *et al.*, 2013, Van Pelt *et al.*, 2013), usually by using a low dose of insulin (10 mU/m²·min) as in our study. Some of these studies have also proposed %NEFA_{supp} as a measure of insulin sensitivity for lipolysis (Kelsey *et al.*, 2013, Lomonaco *et al.*, 2012, McLaughlin *et al.*, 2011), since higher sensitivity for the antilipolytic action of insulin will result in a higher percentage of NEFA suppression from baseline. Another way to assess the reduction in NEFA levels induced by insulin during the clamp is to calculate Δ NEFA, i.e. the difference between NEFA levels at baseline and during the low-dose plateau. However, in our study this index was mainly related to fasting NEFA levels and thus reflected increased fasting lipolysis rather than insulin-mediated suppression of lipolysis (data not shown). Furthermore, Δ NEFA (clamp) did not correlate at all with anthropometric or glucose metabolic measures, except for significant positive correlations with W/H and 2h-glucose, which were thus in the wrong direction. Accordingly, our results suggest that Δ NEFA during the clamp (low-dose insulin step) should not be used to assess antilipolytic insulin sensitivity.

T50_{NEFA} is an index of insulin resistance defined by the time needed to suppress 50% of NEFA levels from baseline during an OGTT, which occurs due to the rise in glucose-stimulated insulin levels. This parameter reflects antilipolytic insulin resistance because prolonged T50_{NEFA} means that NEFA are less susceptible to suppression by insulin. Only few studies described the use of OGTT to assess insulin-mediated suppression of lipolysis (Abdul-Ghani *et al.*, 2008, Stumvoll *et al.*, 2001, Van Pelt *et al.*, 2013), which is predominantly measured using the euglycemic-hyperinsulinemic clamp technique in the literature (Groop *et al.*, 1992, Jensen *et al.*, 1989, Trikudanathan *et al.*, 2013). Accordingly and to our knowledge, no previous study has compared indices of antilipolytic insulin sensitivity derived from the OGTT with those obtained from the clamp. The current study is the first evidence that an index derived from the OGTT, namely T50_{NEFA}, is significantly associated with clamp results ($r=-0.58$), thus supporting its use in clinical studies. This correlation was almost as high as the correlation between the OGTT-derived index of glucose insulin sensitivity, ISI Matsuda, and the measure obtained from the clamp, *M*-value: $r=0.66$ in this study and 0.73 in the original study of Matsuda *et al.* (Matsuda and DeFronzo, 1999). To our knowledge, this index has not been previously described in the literature, with the

exception of only one study published by our group in peripubertal girls at risk of PCOS (Trottier *et al.*, 2012). In this study, $T50_{NEFA}$ was found to be significantly doubled in girls at risk as compared to controls, which was corroborated with significantly prolonged $T50_{NEFA}$ and steeper slope of suppression of NEFA during an FSivGTT in these girls.

Obesity is characterized by an increased proportion of hypertrophic adipocytes, and even more so in the visceral fat (Tchernof and Despres, 2013). This fat compartment is known to be more resistant to the antilipolytic action of insulin (Tchernof and Despres, 2013). Accordingly, our study found a strong relationship between $T50_{NEFA}$ (OGTT) and $\%NEFA_{supp}$ (clamp) with anthropometric measurements in all studied women. This validates clinically the use of these indices as measures of adiposity-related antilipolytic insulin sensitivity in women. $SlopeLnNEFA$ and $\%NEFA_{supp}$ (OGTT) correlated with anthropometric parameters only in PCOS women and no significant correlation in the proper direction was found for the other indices. Furthermore, several studies have demonstrated that prolonged *in vivo* elevation of circulating NEFAs reduces muscle and hepatic insulin sensitivity, as well as beta-cell function, in normal subjects (Carpentier *et al.*, 2000, Carpentier *et al.*, 1999). This is likely one mechanism by which lipotoxicity can lead to global metabolic insulin resistance and impaired glucose tolerance or T2D (Boden, 1997). By contributing to the development of lipotoxicity, resistance to the antilipolytic action of insulin should thus be associated with abnormal glucose metabolism. Accordingly, $T50_{NEFA}$ (OGTT) and $\%NEFA_{supp}$ (clamp) were significantly associated with insulin sensitivity and insulinemia in all women, and $T50_{NEFA}$ (OGTT) was also associated with glucose tolerance. None of the other indices correlated with these parameters, in the appropriate direction, except for $SlopeLnNEFA$ that correlated with fasting insulin only in PCOS women. Since $T50_{NEFA}$ (OGTT) and $\%NEFA_{supp}$ (clamp) were associated with glucoregulatory consequences of lipotoxicity, these results further validate that they appropriately measure antilipolytic insulin sensitivity in women.

When matched for BMI, PCOS women are known to be more obese (Yildiz *et al.*, 2008), and to have increased visceral adiposity (Yildiz *et al.*, 2008) and glucoregulatory insulin resistance, as compared to healthy women. PCOS women were thus included in this study in

order to expand the spectrum of BMI and insulin sensitivity of our women population, which was the case as shown in Table 1. PCOS women also tended to have prolonged $T50_{NEFA}$ and decreased $\%NEFA_{supp}$ compared to non-PCOS women (Table 2). Although these differences were not statistically significant, it is unknown if they are of clinical significance. It was however interesting to observe that $T50_{NEFA}$ and $\%NEFA_{supp}$ were consistently more associated with measures of glucose insulin sensitivity and insulinemia in PCOS women as compared to non-PCOS women. This finding suggests that PCOS women may be more susceptible to the consequences of antilipolytic insulin resistance or lipotoxicity on glucose insulin resistance; or to the concomitant development of both types of insulin resistance.

Although our conclusions are supported by rigorous analyses and very significant and consistent results, some limitations need to be addressed. First, it could be argued that many correlations were performed such that significant associations could be found just by chance, due to multiple testing. Indeed, isolated significant findings should be considered with caution. However, this study provided consistent findings for $T50_{NEFA}$ (OGTT) and $\%NEFA_{supp}$ (clamp), which significantly correlated with multiple parameters and for all women in general. Second, the sample size of each sub-group was relatively small, such that conclusions relative to sub-group analyses are only preliminary. Moreover, an absence of statistical significance for sub-group differences or interactions may be due to lack of power and should thus be considered with caution. Third, measures of the antilipolytic action of insulin derived from more complex three-step clamp techniques or NEFA/glycerol tracers could perform better than the indices reported herein. The purpose of this study was however to identify appropriate and valid indices that could be easily used in research studies, especially those derived from the commonly used OGTT. Finally, since only women were included in this study, these results cannot be generalized to men.

In conclusion, this study found that in women, $T50_{NEFA}$, an index of insulin-stimulated NEFA suppression derived from the OGTT, was strongly and consistently associated with $\%NEFA_{supp}$ derived from the clamp. Both these indices were also significantly and consistently associated with anthropometric measurements and parameters of glucose metabolism. This study thus suggests that both $T50_{NEFA}$ (OGTT) and $\%NEFA_{supp}$ (clamp)

are valid indices of antilipolytic insulin sensitivity in women. Since OGTT is easier to performed and less expensive than the glucose-insulin clamp technique, these findings support the use of the OGTT-derived $T50_{NEFA}$ to estimate antilipolytic insulin resistance in women, especially in large cohorts that cannot easily be tested with the clamp technique.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the research nurses Diane Lessard and Carroll-Lynn Thibodeau of the *Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke* for the realization of research visits and techniques with participants.

REFERENCES

- Abdul-Ghani, M. A., Lyssenko, V., Tuomi, T., DeFronzo, R. A. & Groop, L.** (2009). Fasting versus postload plasma glucose concentration and the risk for future type 2 diabetes: results from the Botnia Study. *Diabetes Care* **32**, 281-6.
- Abdul-Ghani, M. A., Molina-Carrion, M., Jani, R., Jenkinson, C. & DeFronzo, R. A.** (2008). Adipocytes in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance are resistant to the anti-lipolytic effect of insulin. *Acta Diabetol* **45**, 147-50.
- Albu, J. B., Heilbronn, L. K., Kelley, D. E., Smith, S. R., Azuma, K., Berk, E. S., Pi-Sunyer, F. X., Ravussin, E. & Look, A. A. R. G.** (2010). Metabolic changes following a 1-year diet and exercise intervention in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **59**, 627-33.
- American Diabetes, A.** (2014). Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care* **37 Suppl 1**, S14-80.
- Axelsen, M., Lonroth, P., Lenner, R. A., Taskinen, M. R. & Smith, U.** (2000). Suppression of nocturnal fatty acid concentrations by bedtime carbohydrate supplement in type 2 diabetes: effects on insulin sensitivity, lipids, and glycemic control. *Am J Clin Nutr* **71**, 1108-14.
- Azziz, R., Carmina, E., Dewailly, D., Diamanti-Kandarakis, E., Escobar-Morreale, H. F., Futterweit, W., Janssen, O. E., Legro, R. S., Norman, R. J., Taylor, A. E., Witchel, S. F., Task Force on the Phenotype of the Polycystic Ovary Syndrome of The Androgen, E. & Society, P.** (2009). The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril* **91**, 456-88.
- Baillargeon, J. P., Jakubowicz, D. J., Luorno, M. J., Jakubowicz, S. & Nestler, J. E.** (2004). Effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, in nonobese women with polycystic ovary syndrome and normal indices of insulin sensitivity. *Fertil Steril* **82**, 893-902.
- Boden, G.** (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* **46**, 3-10.
- Borel, A. L., Boulet, G., Nazare, J. A., Smith, J., Almeras, N., Tremblay, A., Bergeron, J., Poirier, P., Carpentier, A. C. & Despres, J. P.** (2013). Improved plasma FFA/insulin homeostasis is independently associated with improved glucose tolerance after a 1-year lifestyle intervention in viscerally obese men. *Diabetes Care* **36**, 3254-61.
- Campbell, P. J., Carlson, M. G. & Nurjhan, N.** (1994). Fat metabolism in human obesity. *Am J Physiol* **266**, E600-5.
- Carpentier, A., Mittelman, S. D., Bergman, R. N., Giacca, A. & Lewis, G. F.** (2000). Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic beta-cell function in obese nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* **49**, 399-408.
- Carpentier, A., Mittelman, S. D., Lamarche, B., Bergman, R. N., Giacca, A. & Lewis, G. F.** (1999). Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. *Am J Physiol* **276**, E1055-66.
- Carpentier, A. C.** (2008). Postprandial fatty acid metabolism in the development of lipotoxicity and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* **34**, 97-107.
- Carpentier, A. C.** (2013). The 2012 CDA-CIHR INMD Young Investigator Award Lecture: Dysfunction of Adipose Tissues and the Mechanisms of Ectopic Fat Deposition in Type 2 Diabetes. *Can J Diabetes* **37**, 109-14.
- Carpentier, A. C., Frisch, F., Cyr, D., Genereux, P., Patterson, B. W., Giguere, R. & Baillargeon, J. P.** (2005). On the suppression of plasma nonesterified fatty acids by insulin during enhanced intravascular lipolysis in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**, E849-56.

Cheng, C., Campbell, K. L., Kushner, H. & Falkner, B. E. (2004). Correlation of oral glucose tolerance test-derived estimates of insulin sensitivity with insulin clamp measurements in an African-American cohort. *Metabolism* **53**, 1107-12.

DeFronzo, R. A., Tobin, J. D. & Andres, R. (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* **237**, E214-23.

Despres, J. P. (2012). Abdominal obesity and cardiovascular disease: is inflammation the missing link? *Can J Cardiol* **28**, 642-52.

Frayn, K. N. (2002). Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* **45**, 1201-10.

Frayn, K. N., Shadid, S., Hamrani, R., Humphreys, S. M., Clark, M. L., Fielding, B. A., Boland, O. & Coppack, S. W. (1994). Regulation of fatty acid movement in human adipose tissue in the postabsorptive-to-postprandial transition. *Am J Physiol* **266**, E308-17.

Groop, L. C., Bonadonna, R. C., Simonson, D. C., Petrides, A. S., Shank, M. & DeFronzo, R. A. (1992). Effect of insulin on oxidative and nonoxidative pathways of free fatty acid metabolism in human obesity. *Am J Physiol* **263**, E79-84.

Henderson, M., Baillargeon, J. P., Rabasa-Lhoret, R., Chiasson, J. L., Hanley, J. & Lambert, M. (2012). Estimating insulin secretion in youth using simple indices derived from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Metab* **38**, 309-15.

Holt, H. B., Wild, S. H., Wood, P. J., Zhang, J., Darekar, A. A., Dewbury, K., Poole, R. B., Holt, R. I., Phillips, D. I. & Byrne, C. D. (2006). Non-esterified fatty acid concentrations are independently associated with hepatic steatosis in obese subjects. *Diabetologia* **49**, 141-8.

Jansson, P. A., Larsson, A., Smith, U. & Lonroth, P. (1992). Glycerol production in subcutaneous adipose tissue in lean and obese humans. *J Clin Invest* **89**, 1610-7.

Jensen, M. D., Caruso, M., Heiling, V. & Miles, J. M. (1989). Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes* **38**, 1595-601.

Jocken, J. W., Goossens, G. H., Boon, H., Mason, R. R., Essers, Y., Havekes, B., Watt, M. J., van Loon, L. J. & Blaak, E. E. (2013). Insulin-mediated suppression of lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle of obese type 2 diabetic men and men with normal glucose tolerance. *Diabetologia* **56**, 2255-65.

Kelsey, M. M., Forster, J. E., Van Pelt, R. E., Reusch, J. E. & Nadeau, K. J. (2013). Adipose tissue insulin resistance in adolescents with and without type 2 diabetes. *Pediatr Obes*.

Lewis, G. F., Carpentier, A., Adeli, K. & Giacca, A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* **23**, 201-29.

Lomonaco, R., Ortiz-Lopez, C., Orsak, B., Webb, A., Hardies, J., Darland, C., Finch, J., Gastaldelli, A., Harrison, S., Tio, F. & Cusi, K. (2012). Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **55**, 1389-97.

Matsuda, M. & DeFronzo, R. A. (1999). Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* **22**, 1462-70.

McLaughlin, T., Yee, G., Glassford, A., Lamendola, C. & Reaven, G. (2011). Use of a two-stage insulin infusion study to assess the relationship between insulin suppression of lipolysis and insulin-mediated glucose uptake in overweight/obese, nondiabetic women. *Metabolism* **60**, 1741-7.

Nellemann, B., Gormsen, L. C., Sorensen, L. P., Christiansen, J. S. & Nielsen, S. (2012). Impaired insulin-mediated antilipolysis and lactate release in adipose tissue of upper-body obese women. *Obesity (Silver Spring)* **20**, 57-64.

Ruge, T., Hodson, L., Cheeseman, J., Dennis, A. L., Fielding, B. A., Humphreys, S. M., Frayn, K. N. & Karpe, F. (2009). Fasted to fed trafficking of Fatty acids in human adipose tissue reveals a novel regulatory step for enhanced fat storage. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 1781-8.

- Stumvoll, M., Wahl, H. G., Loblein, K., Becker, R., Volk, A., Renn, W., Jacob, S. & Haring, H.** (2001). A novel use of the hyperinsulinemic-euglycemic clamp technique to estimate insulin sensitivity of systemic lipolysis. *Horm Metab Res* **33**, 89-95.
- Tchernof, A. & Despres, J. P.** (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev* **93**, 359-404.
- Trikudanathan, S., Raji, A., Chamathi, B., Seely, E. W. & Simonson, D. C.** (2013). Comparison of insulin sensitivity measures in South Asians. *Metabolism* **62**, 1448-54.
- Trottier, A., Battista, M. C., Geller, D. H., Moreau, B., Carpentier, A. C., Simoneau-Roy, J. & Baillargeon, J. P.** (2012). Adipose tissue insulin resistance in peripubertal girls with first-degree family history of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **98**, 1627-34.
- Unger, R. H.** (1995). Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* **44**, 863-70.
- Van Pelt, R. E., Gozansky, W. S. & Kohrt, W. M.** (2013). A novel index of whole body antilipolytic insulin action. *Obesity (Silver Spring)* **21**, E162-5.
- Yildiz, B. O., Knochenhauer, E. S. & Azziz, R.** (2008). Impact of obesity on the risk for polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 162-8.

CHAPITRE III : DISCUSSION

III.1. ÉMERGENCE DU PROJET DE RECHERCHE

Initialement, mon domaine de recherche pour cette maîtrise était le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). Le SOPK est un désordre métabolique et endocrinien affectant fréquemment les femmes en âge de procréer. Le diagnostic du SOPK (consensus de Rotterdam) (Azziz, 2006) est établi devant la présence d'une hyperandrogénie (augmentation des niveaux d'androgènes circulants) et/ou d'un état d'hyperandrogénisme (acné et/ou hirsutisme), en plus d'une dysfonction ovarienne (oligo-anovulation chronique, infertilité ou bien aspects d'ovaires polykystiques à l'échographie) (Azziz, 2006).

Le projet principal (SOPK-TZD) visait à comparer l'effet sur l'hyperandrogénie des femmes SOPK des traitements suivants : un médicament insulino-sensibilisateur ciblant la lipotoxicité (classe des TZD, i.e. thiazolidinédiones) qui est la pioglitazone et des médicaments diminuant les niveaux d'insuline, à court terme (diazoxide), et à long terme (acarbose).

Le diazoxide agit sur les canaux potassiques de la cellule β du pancréas en les gardant ouverts afin de réduire la sécrétion d'insuline (Ashcroft and Gribble, 2000). Tandis que l'acarbose est un inhibiteur de la alphaglucosidase intestinale responsable du clivage des hydrocarbures complexes en unités absorbables par les cellules intestinales (Penna *et al.*, 2005). Le fait d'absorber moins de glucose diminue la sécrétion d'insuline et donc les deux traitements visent à diminuer les niveaux d'insuline de manière directe ou bien indirecte.

L'hypothèse générale de notre laboratoire est que, chez la femme, la surcharge aux AGNE des organes producteurs d'androgènes (ovaires et surrénales) qui fait suite au débordement des AGNE depuis le tissu adipeux, a un effet lipotoxique sur ces organes qui entraîne une hyper-réponse androgénique aux stimuli tel que l'insuline (Figure 8).

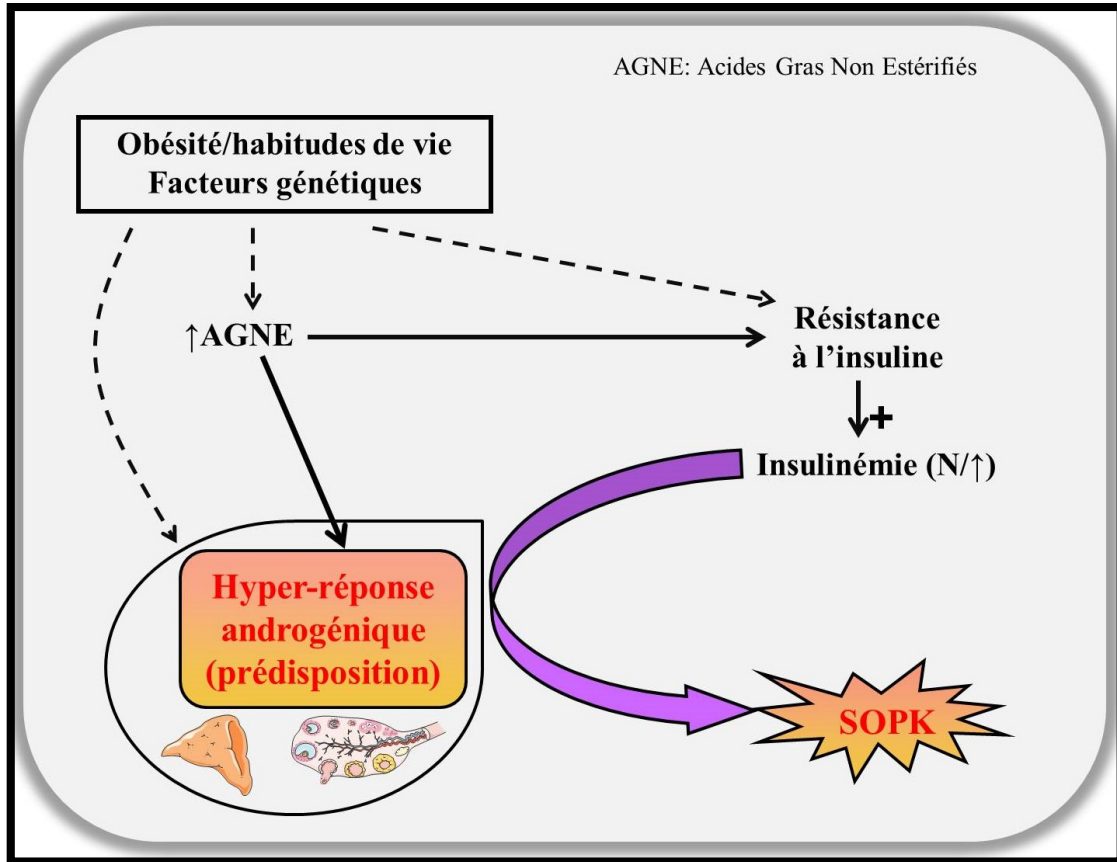


Figure 8. Effets de la surcharge aux des AGNE sur les organes producteurs d'androgènes.

L'hypothèse spécifique du projet SOPK-TZD, était que l'amélioration du métabolisme des AGNE et la moindre exposition des tissus aux AGNE sera plus efficace pour diminuer l'hyperandrogénie caractéristique du SOPK que la baisse des niveaux circulants d'insuline.

Le projet SOPK-TZD est une étude randomisée contrôlée, en double aveugle, dont le protocole était le suivant :

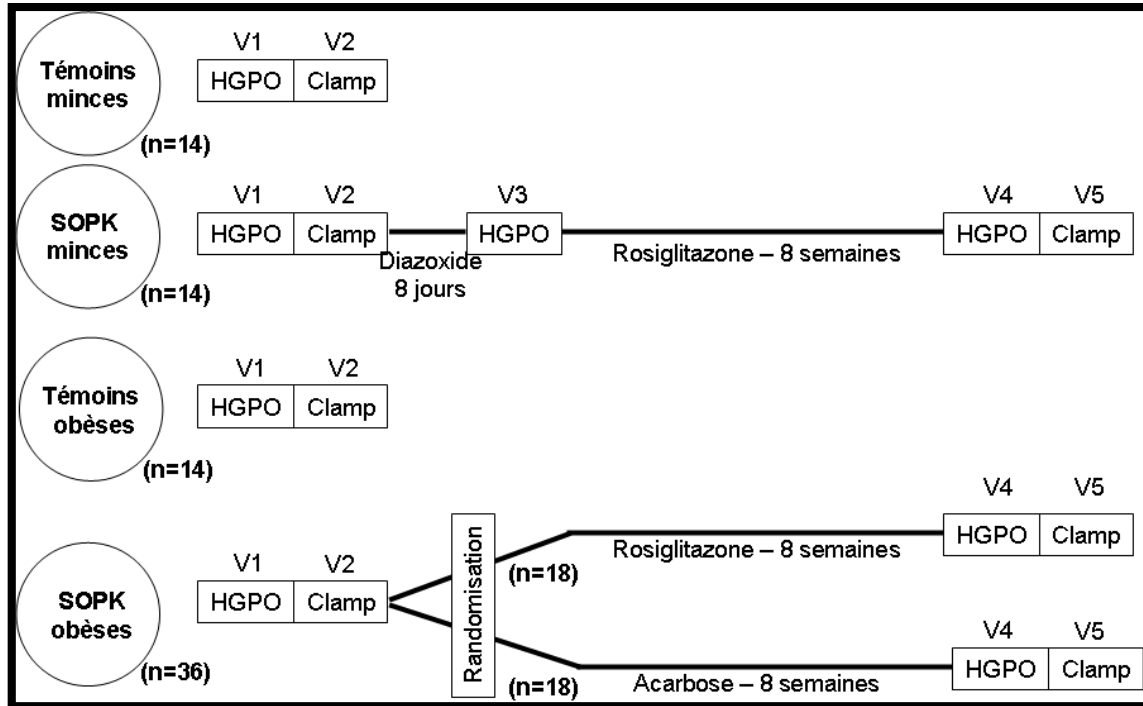


Figure 9. Déroulement de l'étude SOPK-TZD.

Toutes les participantes devaient se présenter à jeun (12 heures) le matin de chacune des visites expérimentales au Centre de Recherche Clinique Étienne LeBel du CHU Fleurimont. Dès leur arrivée, les sujets subissaient un test de grossesse (urinaire) suivi des mesures anthropométriques (poids, taille, TT, TH) ainsi que la mesure du pourcentage de masse grasse par bio-impédance (Hydra ICF/ECF, Xitron Technologies, San Diego, CA, USA) (Figure 9).

Concernant les visites 1, 3 et 4, qui consistaient en une HGPO à 75 g de glucose, une perfusion constante d'un traceur de palmitate ($[1-^{13}\text{C}]$ palmitate, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) devait être effectuée pour mesurer le rythme d'apparition des AGNE. La perfusion du traceur de palmitate devait débiter 60 minutes avant l'ingestion du glucose afin d'assurer la distribution du traceur dans tout le corps. Le traceur devait être préparé et complexé à de l'albumine 25 %, produit distribué par Héma Québec. La préparation du traceur devait se faire avant chaque étude très tôt le matin. De plus, étant donné que les HGPO comportaient des prélèvements à toutes les 10 min, et afin d'éviter la

dégradation des protéines, des tubes de prélèvements contenant de l'aprotinine devaient être préparés et identifiés à l'avance.

Concernant les visites 2 et 5, un clamp euglycémique-hyperinsulinémique avait été effectué au moins deux jours suivant la visite 1 et 4. Le déroulement du clamp s'est fait de la même manière qui a été présentée dans la Figure 7 en introduction. Le traceur de palmitate a également été utilisé durant le clamp en plus d'un traceur de dextrose (D-[3-3H]-glucose, PerkinElmer, Waltham, Ma, USA). Ces perfusions devaient débuter 120 minutes avant le début de chaque clamp pour assurer une distribution des traceurs.

Les femmes SOPK obèses étaient randomisées en double aveugle au traitement (pioglitazone vs acarbose) sur une période de 2 mois. Suite à ce traitement, les visites 4 et 5 étaient pratiquées, ce qui incluait les mêmes procédures que les visites 1 et 2.

Les femmes témoins n'étaient pas traitées et terminaient l'étude à la visite 2. Ces femmes devaient être étudiées en phase mi-folliculaire, entre le 2^e et le 5^e jour du cycle menstruel, afin de mimer l'activité inerte des ovaires de celles des femmes SOPK. Par contre, toutes les femmes SOPK devaient débuter les visites au moins 35 jours après la date des dernières menstruations.

Les femmes SOPK minces recevaient un traitement de 8 jours au diazoxide suite auquel se déroulait la visite 3 au 8^e jour du même traitement. Le dernier comprimé de diazoxide devait être pris juste avant l'ingestion du 75 g de glucose. Cela avait pour objectif d'évaluer la baisse des niveaux d'androgènes induite par la baisse des niveaux d'insuline engendrée par le traitement au diazoxide. Suite à cela, une période de repos de 15 jours était suivie du traitement à la pioglitazone, un agoniste PPAR γ de la famille des TZD sur une période de 2 mois suivie des visites 4 et 5. L'objectif de cela était de voir l'effet d'un agent insulino-sensibilisateur agissant sur la mauvaise gestion des gras dans les tissus, sur l'hyperandrogénie caractéristique du SOPK, tout en corrigeant pour les effets de la simple baisse des niveaux d'insuline.

Malgré les efforts fournis pour le recrutement des patientes SOPK, nous n'avons pas pu atteindre l'objectif du projet qui visait au total 78 patientes, tous groupes confondus. Les patientes SOPK provenaient principalement des listes d'attente de la clinique d'endocrinologie du Dr Baillargeon. Par contre, nous avons établi un plan publicitaire comprenant des affiches (distribuées au CHUS, Université de Sherbrooke, pharmacies, épiceries, cafétérias), des pamphlets et la publicité dans les journaux locaux. Toutes les participantes recevant un traitement étaient suivies aux 15 jours afin de noter les effets indésirables des traitements, assurer l'observance ainsi que de noter tout changement en lien avec les symptômes du SOPK. Les participantes pouvaient se retirer de l'étude à tout moment et même sans préavis. La pharmacie du centre de recherche levait l'aveugle en cas d'incident. Toutefois, les patientes qui se sont retirées l'on fait après avoir effectué la visite 1 et 2 et reçu le traitement. Sur les 12 femmes SOPK considérées être éligibles pour ce projet, seulement 7 ont pu compléter le projet de recherche. De ces femmes, 4 se sont plainte de ballonnement abdominal, de nausées, sensation de prise de poids et d'inconfort diminuant ainsi leur qualité de vie (Figure 10). D'autres femmes se sont directement retirées en voyant la quantité des médicaments préparée par la pharmacie du CRC pour la période des 3 mois suivant la visite 2.

Par ailleurs, puisqu'il est soupçonné que le SOPK a une composante génétique, le Dr. Baillargeon avait effectué une sous-étude du projet SOPK-TZD impliquant des jeunes filles de femmes SOPK. Ce projet a montré que les filles de femmes SOPK présentaient les mêmes anomalies métaboliques (défaut de suppression de lipolyse par l'insuline) que les femmes SOPK (Trottier *et al.*, 2012).

De cette étude, une autre hypothèse est née et stipulait que les femmes SOPK qui avaient réussi à résoudre les symptômes du SOPK, suite à une perte de poids de 5 % ou plus (appelées Ex-SOPK) pouvaient être plus susceptibles que les femmes saines (n'ayant jamais eu de SOPK ni d'anomalie métabolique) pour le développement de l'hyperandrogénémie (caractéristique du SOPK), suite à une perfusion d'une solution d'Intralipide/Héparine. Cette perfusion mimait l'augmentation des AGNE en circulation et ainsi voir l'effet directe ou indirecte sur la production d'androgènes et la sensibilité à l'insuline et ce, comparativement

aux femmes témoins (n'ayant aucun historique de SOPK ou bien de troubles métaboliques connus).

Encore une fois, malgré les efforts fournis pour le recrutement des femmes de ce projet (Ex-SOPK), nous n'avons pas pu atteindre les objectifs prévus pour les Ex-SOPK et avons uniquement pu recruter 18 témoins (n'ayant pas toutes complété l'étude) et 3 femmes Ex-SOPK. La Figure 10 illustre le recrutement déroulé pour les deux projets.

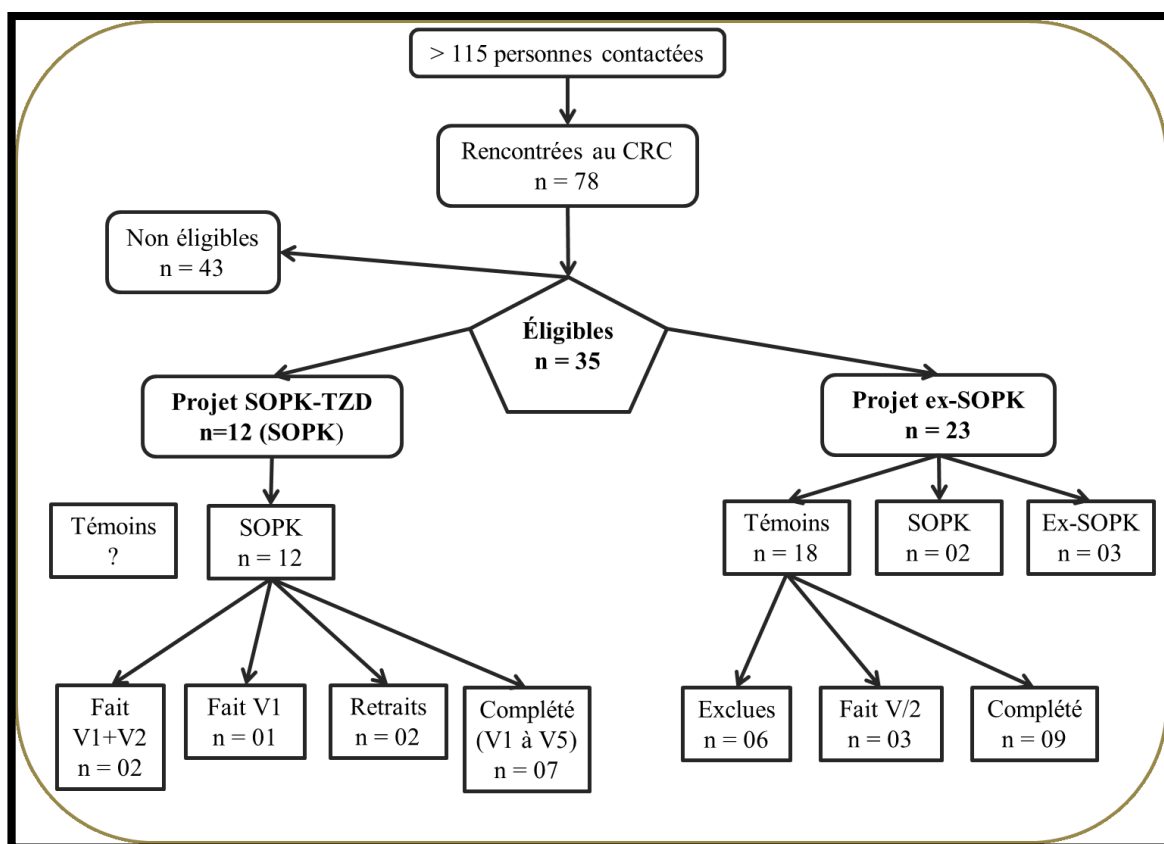


Figure 10. Schéma descriptif du nombre de patients contactés, ceux ayant terminé l'étude et ceux ayant été retirés.

Comme les deux projets, Ex-SOPK et SOPK-TZD, évaluaient la sensibilité à l'insuline et les désordres métaboliques liés aux débordements des AGNE chez les femmes SOPK et les femmes témoins en utilisant des données du clamp euglycémique-hyperinsulinémique et de

l'HGPO, nous avons fait une revue de littérature sur les indices de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse. Cette revue a mené à plusieurs conclusions :

- 1) les techniques utilisées pour mesurer spécifiquement la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse sont souvent coûteuses et compliquées, surtout en ce qui a trait à l'utilisation d'un clamp hyperinsulinémique à plusieurs paliers (≥ 3) et/ou de traceurs radioactifs.
- 2) il n'existe pas d'indice spécifique qui ont été bien validés à partir des techniques plus simples de clamp glucose-insuline sans traceur et d'HGPO.

Nous avons donc pensé utiliser les données existantes issues des projets SOPK-TZD et Ex-SOPK, en terme d'insuline et AGNE, et de recruter d'autres patientes afin de dériver et de valider des indices simples à calculer et pouvant se rapporter à une population variée de sujet avec un large éventail de sensibilité à l'insuline. L'inclusion des femmes SOPK a été expliquée dans l'introduction et est justifiée pour s'assurer que nos résultats peuvent s'appliquer à des populations avec divers degrés d'atteinte métabolique (au moins 2 dans ce cas-ci).

L'hypothèse, du projet présenté dans ce mémoire, était que l'utilisation de l'HGPO en tant que technique bien connue, simple et moins coûteuse, permet de dériver des indices de sensibilité à l'insuline pour la suppression de la lipolyse, qui corrèlent avec les indices du clamp euglycémique-hyperinsulinémique et qui sont aussi corrélés avec les paramètres anthropométriques et métaboliques et ce, au moins tout aussi bien que les indices du clamp.

Nous avons donc effectué des analyses sur des données représentant 29 femmes dont 14 témoins et 15 atteintes du SOPK. Les critères d'inclusion et d'exclusion utilisés pour le présent projet sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 12. Tableau des critères d'inclusion et d'exclusion.

Critères de sélection généraux	
Inclusion	Exclusion
Âge 18 – 40 ans	Diabète
IMC 18-40 kg/m ²	Alcoolisme ou abus de drogue
Niveaux de TSH et de prolactine normaux	Utilisation de Contraceptifs Oraux Ou de Sensibilisateurs à l'insuline
Bon état de santé général	Maladie grave ou allergique
Formulaire de consentement signé	Grossesse
Capacité d'adhérence au protocole	
Critères de sélection spécifiques	
Ex-SOPK	* SOPK antérieur * Perte de poids > 5% * Cycles spontanés régulier * Testostérone libre normale (< 25 pmol/L)
SOPK	* Oligoménorrhée ou anovulation confirmée * Hyperandrogénémie (testostérone libre ≥ 25 pmol/L ou androstènedione ≥ 10,9 mmol/L)
Témoins	* Pas SOPK antérieur * Cycles menstruels spontanés réguliers ≤ 35 jours * Testostérone libre normale

III.2. DISCUSSION DES RÉSULTATS DE RECHERCHE

III.2.1. Description des calculs d'indices de suppression de la lipolyse par l'insuline

Afin d'atteindre les objectifs dans ce mémoire, nous avons calculé des indices de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse, à partir des deux techniques, étudier la corrélation existante (forte ou pas) entre ces indices, pour ensuite déterminer lequel de ces indices présentant le plus de corrélations possibles (peu importe la force) avec l'ensemble des paramètres anthropométriques et les indices de dysfonction adipeuse. Cela nous permet d'avoir une idée si l'utilisation de l'indice en question pourrait nous encourager à continuer des études plus approfondies afin de déterminer un étalon d'or pour la mesure de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse.

%suppAGNE (Clamp) et Δ AGNE (Clamp) : Indices de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse

À partir du clamp euglycémique-hyperinsulinémique, nous avons calculé le Δ AGNE et le pourcentage de suppression des AGNE (%suppAGNE). En effet, ces indices ont déjà été utilisés comme étant des indicateurs de mesure de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse durant le clamp. Une étude récente a utilisé le %suppAGNE durant les 30 premières minutes d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique afin de comparer la sensibilité à l'insuline entre deux groupes ethniques (Da Silva *et al.*, 2014). D'autres auteurs ont étudié la possibilité d'utiliser le clamp à trois paliers d'insuline pour la mesure de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse ($EC_{50}^{INSULINE}$) (Van Pelt *et al.*, 2013). Ces mêmes auteurs stipulent que le clamp pourrait être une bonne technique afin de mesurer l'action antilypolytique de l'insuline en utilisant le rythme d'apparition du glycérol en tant que marqueur de la lipolyse intracellulaire. Van Pelt *et al.*, ont aussi utilisé le glycérol radiomarqué pour la même raison (Van Pelt *et al.*, 2013). Le glycérol est utilisé comme marqueur de la lipolyse étant donné qu'une molécule de triglycérides contient un glycérol et trois acides gras. Dans notre étude, nous n'utilisons pas de clamp à trois paliers d'insuline à cause de la complexité de réalisation. De plus, la clamp que nous avons utilisé dans cette étude n'est pas nécessairement l'étalon d'or pour la mesure de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse, d'où cette étude exploratoire.

Étant donné la difficulté de réalisation et le coût du clamp, surtout en présence de traceurs radioactifs et de 3 paliers, il serait très difficile de réaliser ces manipulations sur de grandes cohortes. L'utilisation de traceurs radioactifs possède aussi son lot d'inconvénients puisqu'il augmente la durée de réalisation de l'étude en raison de la difficulté d'acceptabilité (recrutement) des participants à recevoir de la radioactivité injectée et la durée du test (en plus de la durée du clamp, il faut prévoir 2h supplémentaires pour l'équilibration des traceurs avant le début de l'expérience). La sélection se fera forcément avec un biais et les résultats seront difficilement applicables à la population générale (utilisation de cohortes cibles).

ASC_{dAGNE} (HGPO), Aire Sous la Courbe Décrémentielle : Indice de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse

Nous savons qu'à l'état de jeûne, les niveaux d'AGNE circulants reflètent la lipolyse intra-adipocytaire, car les niveaux d'insuline sont trop bas pour activer la LPL, responsable de la lipolyse intra-vasculaire. Suite à la prise du jus sucré, la charge en glucose entraîne une augmentation des niveaux d'insuline. Tel que cité dans les mécanismes physiologiques à l'introduction (section I.3.5), cette augmentation d'insuline supprime la lipolyse intracellulaire et augmente la capture des AGNE par les tissus, ce qui entraîne une diminution des niveaux plasmatiques de ces derniers (Figure 11).

Afin de déterminer cette capacité de l'insuline à supprimer les AGNE, nous avons calculé l'aire sous la courbe décrémenteille (ASC_{dAGNE}) (Figure 11) de la diminution des niveaux plasmatiques des AGNE au cours de l'HGPO. Le terme décrémenteil implique une diminution des niveaux des AGNE en dessous de la valeur de base étant donné que les AGNE diminuent et n'augmentent pas durant l'HGPO, suite à la charge en glucose. Si l'on étudie la courbe de la cinétique des AGNE lors de l'HGPO, il s'agit donc de l'aire au-dessus de cette courbe. Plus cette aire est élevée, meilleure sera la suppression des AGNE, et donc, le ASC_{dAGNE} est un bon reflet de la sensibilité à l'insuline pour inhiber les niveaux d'AGNE.

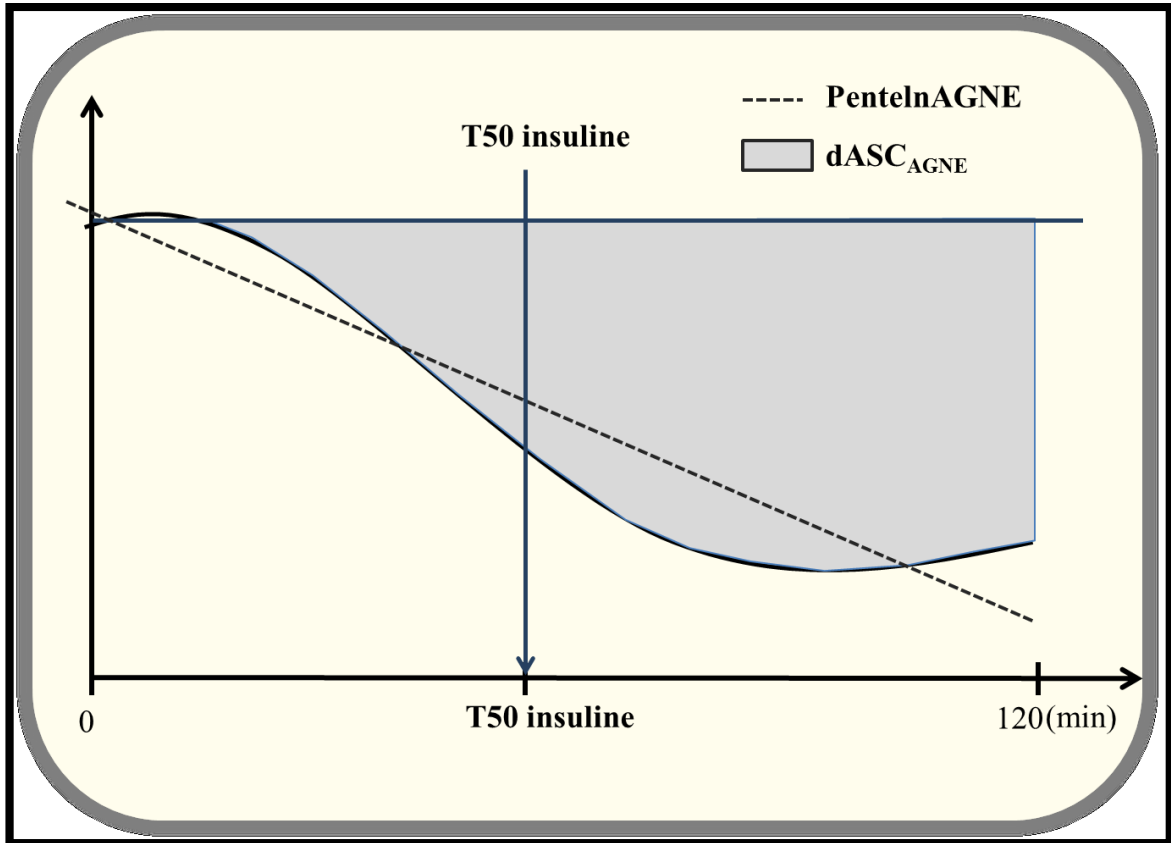


Figure 11. Schéma explicatifs des indices dérivés à partir de l'HGPO.

%suppAGNE (HGPO) : indice de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse

À partir de la même courbe de suppression des AGNE, nous avons aussi calculé un pourcentage de suppression des AGNE (%suppAGNE) durant l'HGPO. Il s'agit d'un indice de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse qui a déjà été décrit dans la littérature par des auteurs utilisant l'HGPO (Holt *et al.*, 2006). Le %suppAGNE est une estimation en pourcentage de la quantité des AGNE qui a été supprimée par l'insuline par rapport à la valeur initiale (moyenne d'AGNE plasmatique à jeun). Plus le %suppAGNE augmente, meilleure est la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse. Cet indice représente donc un paramètre de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse.

PenteLnAGNE (HGPO) : indice de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse

En plus de ces paramètres, nous avons pensé à une mesure intégrative de la suppression des AGNE par l'insuline. En fait, toujours à partir de la courbe de suppression des AGNE, la pente de cette courbe peut représenter un indice évaluant la « vitesse » avec laquelle l'insuline supprime les niveaux d'AGNE (Figure 11). L'interprétation de la pente de suppression des AGNE est la suivante : plus la pente est abrupte, plus la sensibilité à l'insuline pour la suppression d'AGNE est élevée. Étant donné l'absence de linéarité de la courbe des niveaux d'AGNE avec le temps, nous avons effectué une transformation logarithmique de ces données afin de calculer la pente sur la partie linéaire de la courbe.

En effet, la variable que l'on décrit dans cette étude est sous la forme suivante : penteLnAGNE, calculée pour chacun des participants. Bien qu'il soit possible d'interpréter la courbe de suppression des AGNE à l'aide d'une méthode mathématique de déconvolution des niveaux d'AGNE et d'insuline, comme décrit par Carpentier *et al.* (Carpentier *et al.*, 2010), nous avons choisi une méthode simplifiée plus facilement applicable dans des études sur de plus grandes cohortes d'individus.

T50_{AGNE} (HGPO) : indice de résistance à l'insuline pour la lipolyse

Le dernier paramètre calculé issu de l'HGPO est le T50_{AGNE} (Figure 11). Le T50 d'une substance donnée est un concept pharmacologique déterminant le temps nécessaire pour avoir 50 % de l'action maximale du paramètre A sur le paramètre B. Le calcul du T50_{AGNE} tient compte du temps exact qui correspond aux niveaux d'AGNE au moment (temps) du EC50_{INSULINE} (i.e. la concentration d'insuline permettant de supprimer 50% des AGNE de base), qui représente la concentration en insuline correspondante à la concentration de 50% des AGNE de base, à partir de la courbe $f(\text{AGNE}) = \text{Insuline} + \alpha$, ($\alpha = \text{constante}$).

En effet, le T50_{AGNE} est exprimé en minute et permet de déterminer le temps nécessaire pour supprimer 50% des AGNE à partir de la valeur de base (mesure à jeun). Plus ce temps est prolongé, moins bonne est la suppression des AGNE par l'insuline et plus la résistance à

l'insuline pour la lipolyse est élevée. Le $T50_{AGNE}$ représente donc un indice de résistance à l'insuline.

En comparant les indices issus de l'HGPO à ceux issus du clamp, pour tous les groupes confondus, seules les $ASCd_{AGNE}$ (HGPO) et $T50_{AGNE}$ (HGPO) qui corrèlent le mieux avec $\Delta AGNE$ (clamp) ($r = + 0,49, P = 0,007$) et $\%suppAGNE$ (clamp) ($r = - 0,58, P = 0,0009$).

La corrélation entre le $ASCd_{AGNE}$ (HGPO) et $\Delta AGNE$ (clamp) n'est significative que pour le sous-groupe des femmes SOPK ($r = + 0,65, P = 0,01$). Tandis que pour le $T50_{AGNE}$ (HGPO), toutes les corrélations sont significatives pour les sous-groupes, mais seulement avec le $\%suppAGNE$ (clamp) et pas le $\Delta AGNE$ (clamp). La corrélation significative du $T50_{AGNE}$ (HGPO) et le paramètre de suppression des AGNE du clamp est une corrélation significative. Cela est en accord avec la littérature. Baldeweg et al., en 2000, avaient trouvé que le $\%suppAGNE$ issu du clamp est un bon indicateur de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse en le comparant aux niveaux de triglycérides à jeun ($r = - 0,2570, P < 0,0001$) (Baldeweg *et al.*, 2000).

Discussion des limites de l'étude liées aux calculs et variabilités de mesure

Toutefois, bien que le calcul de ces paramètres semble bien être justifié, nous avons fait face à plusieurs problèmes avant de dériver ces calculs. Il est à noter que nous avons fait face à une variabilité de mesure importante à partir de nos valeurs brutes (avant calculs de paramètres) des AGNE et d'insuline. Étant donné que nous mesurons ces paramètres, pour chaque patiente, à toutes les 10 min (HGPO) et 5 min (clamp), cela crée une erreur de mesure amplifiée par la comparaison inter-individuelle.

En effet, il est connu que le clamp euglycémique-hyperinsulinémique est un test durant lequel la quantité d'insuline est contrôlée en fonction de la quantité de glucose en circulation, la fonction glucorégulatoire et antilipolytique sont donc dans un système isolé à compartiments limités. Selon la littérature, l'équilibre entre la dégradation de l'insuline et son apport devrait être atteint durant les 20 dernières minutes du clamp (DeFronzo *et al.*, 1979). On suppose

donc que l'action antilipolytique de l'insuline atteint son maximum durant la même période. La variabilité de mesure répétitive d'AGNE et d'insuline durant le clamp comparativement à celle durant l'HGPO semble être la cause majeure de notre difficulté d'analyse. Monzillo et Hamdy ont démontré que la variabilité de réponse insulinique lors de l'HGPO est plus importante (Monzillo and Hamdy, 2003). De plus, il a également été démontré que la cinétique de l'insuline et du glucose n'est pas simultanée lors d'un test de tolérance au glucose par voie intraveineuse (Getty *et al.*, 1998). En effet, selon cette étude, l'état d'équilibre de l'insuline sera atteint en 30 à 60 min, tandis que celui du glucose le serait en 120 à 180 minutes. Les mêmes auteurs suggèrent que l'action de l'insuline à ce niveau-là dépend de son abondance dans le milieu interstitiel (Getty *et al.*, 1998), ce qui justifie la variabilité de mesure de suppression de la lipolyse par l'insuline dans notre étude.

Un autre paramètre à prendre en considération est l'absorption intestinale du glucose durant l'HGPO. Dépendamment de la quantité de glucose qui peut être absorbée et ainsi stimuler la sécrétion/production d'insuline par le pancréas, la suppression des AGNE sera influencée indirectement par la biodisponibilité de l'insuline. Aussi, l'HGPO est un test dynamique qui reflète le mieux la cinétique métabolique. Selon nos résultats, la corrélation existante entre les paramètres discutés issus du clamp et ceux de l'HGPO nous permet d'avoir une idée sur la possibilité de simplifier le calcul de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse en utilisant une méthode simple telle que l'HGPO. À notre connaissance, seulement certaines études ont utilisés l'HGPO pour l'évaluation de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse (Campbell *et al.*, 1994, Carpentier *et al.*, 2005, Henderson *et al.*, 2012), tandis que d'autres utilisent le clamp (Abdul-Ghani *et al.*, 2009, Matsuda and DeFronzo, 1999, Ruge *et al.*, 2009). Cependant, aucune étude, jusqu'à présent, n'a comparé des indices issus de l'HGPO versus ceux issu du clamp euglycémique-hyperinsulinémique pour la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse.

Étant donné que la corrélation entre le $T50_{AGNE}$ issus de l'HGPO et le %suppAGNE (clamp) n'est pas très forte ($r = -0,58$, $P = 0,0009$) et que les indices du clamp à 2 paliers et sans traceur que nous avons utilisé n'ont pas été établis comme étalon d'or pour la mesure de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse, il était important à cette étape-ci de déterminer

qu'elles sont les indices les mieux corrélés avec les paramètres anthropométriques, connus comme étant des indicateurs de la dysfonction du tissu adipeux, et les paramètres métaboliques associés avec cette dysfonction. Cette 2^e étape permet de valider les indices vis-à-vis d'autres paramètres physiologiques pertinents, et aussi de déterminer si les indices issus de l'HGPO performant au moins aussi bien que ceux du clamp à cet égard.

III.2.2. Discussion des corrélations entre les indices de suppression de la lipolyse par l'insuline et les paramètres anthropométriques des sujets

Les mesures anthropométriques déterminent le degré d'obésité, d'adiposité globale ou d'obésité centrale (tour de taille) des individus. Ainsi, les niveaux élevés de ces paramètres peut témoigner d'une dysfonction du tissu adipeux, tel que mentionné en introduction. Une étude récente a été effectuée dans le but de déterminer quelle mesure anthropométrique peut prédire au mieux le risque du syndrome métabolique (Paula *et al.*, 2012). En effet, plusieurs indices anthropométriques ont été étudiés : le tour de taille, le tour de hanches, l'IMC, le pourcentage de masse grasse ont tous été évalués. Selon le résultat de cette étude, le tour de taille avec le ratio tour de taille sur tour de hanche (TT/TH), semblent être les indices qui prédisent le mieux le risque cardiométabolique (Paula *et al.*, 2012). Dans notre étude, nous avons étudié la relation existante entre les indices calculés de lipolyse à partir des deux techniques et les mesures anthropométriques suivantes : IMC, TT, TT/TH, %Gras, MGT = masse grasse totale (poids (kg) x %Gras) ainsi que le ratio MGT/IMG (IMG = indice de masse grasse (MGT/taille²(m)).

Nos résultats suggèrent que le ASCd_{AGNE} (HGPO) et le Δ AGNE (clamp) ne présentent aucune corrélation significative avec ces indices. La PenteLnAGNE (HGPO), le %suppAGNE (HGPO) ainsi que le %suppAGNE (clamp) présentent des corrélations (tableau 10) significatives uniquement pour le sous-groupe des femmes SOPK. Par contre, le T50_{AGNE} présentent des corrélations significatives avec la majorité des paramètres anthropométriques et ce, pour tous les groupes.

Étant donné que le TT et le TT/TH sont des paramètres anthropométriques fortement liés à la dysfonction du tissu adipeux qui mène à la résistance à l'inhibition de la lipolyse adipocytaire par l'insuline, les données discutées, pour l'instant, permettent de valider que le $T50_{AGNE}$ (HGPO), la penteLnAGNE (HGPO) et le %suppAGNE (clamp) semblent être de bons paramètres pour la mesure de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse. Comme le $T50_{AGNE}$ (HGPO) corrèle mieux avec les paramètres anthropométriques que le %suppAGNE (clamp), il semble que la méthode de l'HGPO soit au moins aussi bonne, ou même meilleure, que le clamp pour bien mesurer cette sensibilité de l'insuline pour la lipolyse.

Par ailleurs, les autres indices calculés à partir de l'HGPO ne semblent pas du tout présenter de corrélations significatives chez les femmes normales ou si toutes les femmes sont considérées ensemble. Les $ASCd_{AGNE}$, penteLnAGNE et %suppAGNE semblent être de bons indices selon l'interprétation des calculs mais qui ne peuvent être utilisés pour l'évaluation du défaut de suppression des AGNE par l'insuline et ainsi prédire la dysfonction métabolique associée. Cependant, d'autres études ont montré une diminution du %suppAGNE chez les patients résistants à l'insuline comparativement aux contrôles (Abdul-Ghani *et al.*, 2009, Ruge *et al.*, 2009, Campbell *et al.*, 1994). Par contre, dans ces études, tout comme dans notre étude, la suppression des AGNE est très élevée et peu variable chez les sujets normaux et donc la moindre baisse de suppression dans une population résistante à l'insuline fera une grande différence. Cet indice serait donc peu valable dans la population normale, d'où nos résultats. Nous avons par contre observé de bien meilleures corrélations chez les femmes avec SOPK.

III.2.3. Discussion des corrélations entre les indices de suppression de la lipolyse par l'insuline et les paramètres métaboliques des sujets

Après avoir validé quelques indices issus des deux techniques en évaluant leur relation aux mesures anthropométriques, associées à la dysfonction du tissu adipeux, nous avons voulu vérifier lequel, de tous les indices calculés, serait le meilleur prédicteur de la dysfonction du tissu adipeux et de la lipotoxicité. En effet, plusieurs paramètres métaboliques sont utilisés en recherche pour l'évaluation de la fonction glucorégulatrice de l'insuline (Stumvoll *et al.*,

2001, Van Pelt *et al.*, 2013). Pour notre étude, nous avons utilisé des valeurs à jeun (glucose, insuline), des indices à partir de l'HGPO (ISI Matsuda, ASC de glucose et d'insuline ainsi que les taux de glucose et d'insuline à 120 min) en plus de la valeur M de sensibilité à l'insuline calculée à partir du clamp euglycémique-hyperinsulinémique.

Selon nos résultats, les seuls paramètres ayant des corrélations significatives et avec la majorité des indices métaboliques (Tableau 11) sont le $T50_{AGNE}$ (HGPO) et le %suppAGNE (clamp). Cela signifie que ces deux indices semblent bien être valides pour l'estimation de la dysfonction métabolique. De plus, les deux indices corréleront bien avec les mesures de la résistance à l'insuline pour le glucose issue de l'HGPO (ISI Matsuda) ainsi que la valeur M du clamp.

En effet, le glucose à 120 min (HGPO) et l'ASCglucose (aire sous la courbe de glucose) mesurent la tolérance au glucose. L'ASCglucose est une mesure intégrative qui évalue l'augmentation globale de la glycémie, durant toute la durée de l'HGPO (Singh and Saxena, 2010). Les patients résistants à l'insuline ont des niveaux d'ASC glucose plus élevés que ceux des sujets sains (Prentki and Nolan, 2006). De plus, la relation illustrée entre la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse issu du clamp (%suppAGNE) et les mesures d'insulinémie (à jeun, 2h et ASC) indique que plus que la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse augmente, moins élevée est l'hyperinsulinémie suite à une charge en glucose et donc, plus la sensibilité du glucose à l'insuline est grande. Une tolérance moindre au glucose est le reflet d'une moins bonne sensibilité à l'insuline, mais surtout d'une défaillance de la cellule bêta qui a aussi été associée à la lipotoxicité et la dysfonction du tissu adipeux. En effet, il est connu qu'en cas de résistance à l'insuline, le pancréas réagit en sécrétant plus d'insuline pour une même quantité de glucose, ce qui représente l'hyperinsulinémie compensatoire afin d'éviter une augmentation du glucose au-delà de la normale. Ceci est confirmé par nos résultats présentant une corrélation inverse entre le $T50_{AGNE}$ (HGPO; indice de résistance à l'insuline) et les indices de sensibilité à l'insuline issus du clamp (valeur M) et de l'HGPO (ISI Matsuda) (tableau 11).

Comme le T50_{AGNE} (HGPO) et le %suppAGNE (clamp) corrélient bien avec la baisse de la tolérance au glucose et la résistance à l'insuline, il s'agit vraisemblablement de mesures valides de la lipotoxicité qui résulte d'une moindre suppression de la lipolyse induite par l'insuline, entre autres. Par ailleurs, le T50_{AGNE} (HGPO) corréle mieux ou de façon similaire avec ces paramètres métaboliques que le %suppAGNE (clamp), suggérant que l'HGPO est une méthode qui semble être aussi valide que le clamp pour mesurer la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse.

Il est connu que le clamp euglycémique-hyperinsulinémique est un test durant lequel la quantité d'insuline est contrôlée en fonction de la quantité de glucose en circulation, la fonction glucorégulatoire et antilipolytique sont donc dans un système isolé à compartiments limités. Tandis que l'HGPO est un test dynamique qui reflète le mieux la cinétique métabolique, contrairement au clamp durant lequel on sélectionne des intervalles pour dériver les indices. À notre connaissance, seulement certaines études ont utilisé l'HGPO pour l'évaluation de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse (Campbell *et al.*, 1994, Carpentier *et al.*, 2005, Henderson *et al.*, 2012), tandis que d'autres utilisent le clamp (Abdul-Ghani *et al.*, 2009, Matsuda and DeFronzo, 1999, Ruge *et al.*, 2009). Cependant, aucune étude, jusqu'à présent, n'a comparé des indices issus de l'HGPO versus ceux issus du clamp euglycémique-hyperinsulinémique pour la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse. Le fait que nos résultats montrent une relation entre les paramètres de l'HGPO et ceux du clamp indique que les deux méthodes pourraient mesurer le même phénomène, soit l'action antilipolytique de l'insuline, et suggère une certaine validité concourante. Mais les façons de mesurer ce phénomène par l'HGPO (dynamique) et le clamp (statique) ont des implications probablement suffisamment importantes pour que les corrélations entre les deux méthodes ne soient pas aussi bonnes que celles observées pour la sensibilité à l'insuline pour le glucose, par exemple.

III.2.4. Calculs non présentés pour ce mémoire

Nous n'avons pas présenté les indices de sensibilité à l'insuline issus de l'HGPO et du clamp après correction par l'ASC_{insuline} (aire sous la courbe de l'insuline) durant l'HGPO ou par les niveaux moyens d'insuline durant le palier du clamp. Cette correction est souvent faite à

l'aide d'un ratio ou d'un produit, selon l'indice, afin d'ajuster pour les différences entre les niveaux d'insuline d'un sujet à l'autre. En effet, plus l'insuline est élevée, plus il est attendu que la suppression des AGNE soit importante durant le test et donc la correction tente d'ajuster pour la quantité d'insuline qui peut avoir une action durant le test. Ceci est particulièrement important pour l'HGPO, car les réponses en insuline des sujets varient beaucoup selon leur degré de résistance à l'insuline pour le glucose. Nous avons d'ailleurs observé chez les femmes de notre étude que lorsque les indices de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse durant l'HGPO sont bas, les niveaux d'insuline sont souvent élevés concomitamment. Les indices seraient donc encore plus bas s'ils étaient corrigés par l'insuline dans ces cas-là.

Par contre, de façon générale, cette correction rend nos corrélations encore plus fortes et significatives, car les niveaux d'insuline durant l'HGPO vont corrélérer fortement avec les niveaux d'insuline durant le clamp, ce qui augmentera faussement les corrélations entre les indices corrigés de l'HGPO et ceux du clamp. De plus, les niveaux d'insulines corréleront aussi fortement avec les paramètres anthropométriques et métaboliques, augmentant ainsi les corrélations de façon inappropriée. Il n'est alors plus possible de savoir si les corrélations élevées avec les indices corrigés sont dues à la corrélation avec les niveaux d'insuline ou directement avec la suppressibilité des AGNE par l'insuline. Cela peut donc masquer la vraie corrélation entre le paramètre à évaluer et les indices évalués. Il est donc à noter que nous obtenons des corrélations significatives avec nos indices malgré l'absence de correction pour l'insuline, ce qui augmente la validité de nos résultats.

Somme toute, utiliser l'HGPO comme technique de mesure de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse semble être valable. En effet, le $T50_{AGNE}$ se démarque des autres indices issus de l'HGPO par le fait qu'il corréle avec toutes les mesures anthropométriques et quelques paramètres de dysfonction métabolique, contrairement aux autres indices du même test. En comparant les résultats de corrélations entre les deux techniques (HGPO et clamp), nous observons que le $T50_{AGNE}$ est l'indice qui corréle le mieux parmi tous les indices confondus.

III. 3 LIMITES DE L'ÉTUDE

Cette étude est de type transversale, ce qui implique une observation à un point donné de temps, ce dernier étant fixe. Le principal inconvénient de ce type d'étude est l'impossibilité de voir si nos indices sont sensibles aux changements de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse dans le temps, chez le même individu, comme par exemple suite à un traitement connu pour affecter cette sensibilité dans une direction ou l'autre. Ce genre d'étude pourrait être fait pour valider de façon plus rigoureuse que le T50_{AGNE} (HGPO) et le %supp_{AGNE} (clamp) mesurent bel et bien cette sensibilité.

L'échantillon de patientes utilisé était relativement petit et ne permettant pas d'utiliser cette méthode sur de grandes cohortes. Effectivement, il est difficile de recruter des sujets désirants effectuer les deux tests. Aussi, nous avons utilisé un petit nombre pour l'étude des sous-groupes, ce qui nous a empêchés de conclure également pour ces derniers. De plus, la population choisie n'est composée que de femmes. Ces dernières ne présentent pas la même sensibilité à l'insuline que les hommes.

Nous allons également ajouter que la population à l'étude était 100 % caucasienne et que ces résultats ne peuvent, pour l'instant, être appliqués sur d'autres ethnies.

III. 4 CONCLUSION

En conclusion, l'étude de mon mémoire a évalué la validité de mesurer spécifiquement la sensibilité à l'insuline pour sa fonction antilipolytique en utilisant une méthode simple et moins coûteuse. Pour ce faire, j'ai étudié l'association entre les indices de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse calculés à partir de l'HGPO et ceux calculés à partir du clamp euglycémique-hyperinsulinémique, afin de déterminer si une certaine cohérence interne existait entre ces indices. Dans ce cas, la force de l'association importait moins car aucune des deux méthodes (clamp et HGPO) n'est considérée comme un étalon d'or. Ensuite, j'ai évalué lesquels des indices calculés corrélaient le mieux avec les paramètres anthropométriques qui induisent une dysfonction adipeuse. Le défaut de suppression de la lipolyse par l'insuline peut aussi se traduire en le développement d'une lipotoxicité dans les

tissus maigres suite à leur exposition prolongée aux AGNE, ce qui résulte en des défauts métaboliques. J'ai donc aussi voulu déterminer lesquels des indices calculés corrélaient le mieux avec ces paramètres de dysfonction métabolique.

Ainsi, parmi tous les indices calculés à partir de l'HGPO et du clamp, le T50_{AGNE} semble être celui qui évalue le mieux la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse, dans la population de femmes étudiés, car c'est l'indice qui corrèle avec le plus de paramètres anthropométriques et métaboliques évalués dans ce projet. Il s'agit aussi de l'indice issu de l'HGPO qui corrèle le mieux avec un indice issu du clamp, soit le %suppAGNE (clamp). Le %suppAGNE issu du clamp corrèle aussi bien avec les paramètres anthropométriques et métaboliques présentés dans cette étude. Par contre, le T50_{AGNE} est associé avec plus de paramètres de dysfonction métabolique que le %suppAGNE (i.e. associé en plus avec Gluc 2h et ASCGluc). Il faut aussi noter que de petites différences dans les coefficients de corrélation n'indiquent pas que la dite variable est plus valide que l'autre pour mesurer la sensibilité antilipolytique de l'insuline, de sorte que d'autres indices tirés de l'HGPO ou certains indices du clamp pourraient être tout aussi valides que le T50_{AGNE}. En somme, l'HGPO, et en particulier la mesure du T50_{AGNE} durant ce test, serait une bonne méthode pour permettre de mesurer simplement et à moindre coûts la résistance à l'insuline pour la lipolyse. Ces résultats devront toutefois être validés sur une population plus large et avec divers troubles métaboliques avant de pouvoir conclure définitivement sur l'utilité de l'HGPO et du T50_{AGNE} pour mesurer la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse.

CHAPITRE IV : PERSPECTIVES

Pour faire suite à cette étude, il serait particulièrement intéressant d'augmenter le nombre de population à l'étude en se concentrant sur la diversité ethnique et en incluant des hommes. De plus, la mesure de ces paramètres suggérés avant et après un traitement insulino-sensibilisateur, pourrait valider au mieux les indices et leur applicabilité.

Il serait aussi intéressant de mesurer ces indices chez des sujets suivant un régime de perte de poids (i.e. avant et après) ainsi que des personnes âgées (50-55 ans) présentant des signes de sensibilité à l'insuline diminués.

Du point de vue statistique, les corrélations présentées dans ce mémoire ne permettent pas de conclure d'une manière stricte l'utilisation de l'HGPO et du T50AGNE comme mesure de sensibilité à l'insuline pour la lipolyse. Une analyse statistique plus sophistiquée serait donc nécessaire afin de pouvoir conclure au mieux l'utilisation du T50AGNE comme étant un prédicteur de la sensibilité à l'insuline pour la lipolyse, comme l'utilisation de modèles multivariées pour apprécier le caractère indépendant de la mesure. L'étude idéale à faire serait de comparer les indices du l'HGPO avec les mesures faites à partir de méthodes considérées comme des étalons d'or, comme le clamp à 3 paliers d'insuline avec utilisation de traceurs. Puisque cette technique est complexe et rarement utilisée, notre étude présente probablement les meilleures données disponibles à ce jour sur l'utilité de l'HGPO dans ce contexte.

CHAPITRE V : REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier le Pr. Baillargeon de m'avoir offert l'opportunité de faire partie de son équipe. Cela fut un grand plaisir de travailler avec lui et d'acquérir des connaissances clé ainsi que d'innover dans le cadre de ses compétences. Je remercie également l'assistante de recherche Marie-Claude Battista pour son soutien, ses conseils pertinents ainsi que sa présence et celle des étudiants du laboratoire.

Je n'oublierai pas les merveilleuses infirmières, Diane Lessard et Carol-Lynn Thibodeau et la technicienne du laboratoire, Lucie Bouffard, sans lesquelles les études cliniques ne seront jamais réalisables. Merci pour toutes les compétences transmises, le dévouement ainsi que votre patience afin de réaliser des études aussi compliquées.

Un merci particulier à ma famille ; mes parents, mon frère et ma sœur qui n'ont jamais cessés à croire en mon ambition et mon travail, sans lesquels je ne serai pas ou je suis aujourd'hui. Je pense en particulier :

À ma mère, *MALIKA*, et mon père, *MOHAMMED*, pour leur soutien inconditionnel et pour les personnes fantastiques qu'ils sont. À toi maman, qui a appris tout ce que j'ai appris en même temps tellement que tu m'as suivi. À toi papa, qui n'a jamais cessé de me poser des questions sur l'évolution de mes études ainsi que de m'inspirer avec ses réussites qui m'ont aidé à bâtir un esprit de recherche et développement.

À mon petit frère, *IMEDEDDINE*, ainsi que ma petite sœur, *RAYENE*, qui, avec leur sourire permanent, m'ont permis d'avoir le meilleur soutien et encouragements pour leur vieux frère.

À mon adorable et bien aimée épouse, *ANIA*, qui a toujours cru en moi et en mes capacités ainsi que de supporter mes humeurs changeantes avec les oscillations de la rédaction.

Un merci particulier à Dieu, qui m'a inspiré foi, patience et espérance tout au long de ma vie.

VI LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abate, N., Garg, A., Peshock, R. M., Stray-Gundersen, J. & Grundy, S. M.** (1995). Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. *J Clin Invest* **96**, 88-98.
- Abdul-Ghani, M. A., Lyssenko, V., Tuomi, T., DeFronzo, R. A. & Groop, L.** (2009). Fasting versus postload plasma glucose concentration and the risk for future type 2 diabetes: results from the Botnia Study. *Diabetes Care* **32**, 281-6.
- Abdul-Ghani, M. A., Molina-Carrion, M., Jani, R., Jenkinson, C. & DeFronzo, R. A.** (2008). Adipocytes in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance are resistant to the anti-lipolytic effect of insulin. *Acta Diabetol* **45**, 147-50.
- Akinmokun, A., Selby, P. L., Ramaiya, K. & Alberti, K. G.** (1992). The short insulin tolerance test for determination of insulin sensitivity: a comparison with the euglycaemic clamp. *Diabet Med* **9**, 432-7.
- Albu, J. B., Curi, M., Shur, M., Murphy, L., Matthews, D. E. & Pi-Sunyer, F. X.** (1999). Systemic resistance to the antilipolytic effect of insulin in black and white women with visceral obesity. *Am J Physiol* **277**, E551-60.
- Albu, J. B., Heilbronn, L. K., Kelley, D. E., Smith, S. R., Azuma, K., Berk, E. S., Pi-Sunyer, F. X., Ravussin, E. & Look, A. A. R. G.** (2010). Metabolic changes following a 1-year diet and exercise intervention in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **59**, 627-33.
- Allison, D. B., Downey, M., Atkinson, R. L., Billington, C. J., Bray, G. A., Eckel, R. H., Finkelstein, E. A., Jensen, M. D. & Tremblay, A.** (2008). Obesity as a disease: a white paper on evidence and arguments commissioned by the Council of the Obesity Society. *Obesity (Silver Spring)* **16**, 1161-77.
- American Diabetes, A.** (2014). Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care* **37** Suppl 1, S14-80.
- Armstrong, M. J., Hazlehurst, J. M., Hull, D., Guo, K., Borrows, S., Yu, J., Gough, S. C., Newsome, P. N. & Tomlinson, J. W.** (2014). Abdominal subcutaneous adipose tissue insulin resistance and lipolysis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Diabetes Obes Metab* **16**, 651-60.
- Arner, P.** (1995). Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med* **27**, 435-8.
- Arner, P.** (2005). Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **19**, 471-82.
- Ashcroft, F. M. & Gribble, F. M.** (2000). Tissue-specific effects of sulfonylureas: lessons from studies of cloned K(ATP) channels. *J Diabetes Complications* **14**, 192-6.
- Axelsen, M., Lonnroth, P., Lenner, R. A., Taskinen, M. R. & Smith, U.** (2000). Suppression of nocturnal fatty acid concentrations by bedtime carbohydrate supplement in type 2 diabetes: effects on insulin sensitivity, lipids, and glycemic control. *Am J Clin Nutr* **71**, 1108-14.
- Azziz, R.** (2006). Controversy in clinical endocrinology: diagnosis of polycystic ovarian syndrome: the Rotterdam criteria are premature. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 781-5.
- Azziz, R., Carmina, E., Dewailly, D., Diamanti-Kandarakis, E., Escobar-Morreale, H. F., Futterweit, W., Janssen, O. E., Legro, R. S., Norman, R. J., Taylor, A. E., Witchel, S. F., Task Force on the Phenotype of the Polycystic Ovary Syndrome of The Androgen, E. & Society, P.** (2009). The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril* **91**, 456-88.
- Baillargeon, J. P., Jakubowicz, D. J., Luorno, M. J., Jakubowicz, S. & Nestler, J. E.** (2004). Effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, in nonobese women with polycystic ovary syndrome and normal indices of insulin sensitivity. *Fertil Steril* **82**, 893-902.

- Bajaj, M., Suraamornkul, S., Romanelli, A., Cline, G. W., Mandarino, L. J., Shulman, G. I. & DeFronzo, R. A.** (2005). Effect of a sustained reduction in plasma free fatty acid concentration on intramuscular long-chain fatty Acyl-CoAs and insulin action in type 2 diabetic patients. *Diabetes* **54**, 3148-53.
- Baldeweg, S. E., Golay, A., Natali, A., Balkau, B., Del Prato, S. & Coppock, S. W.** (2000). Insulin resistance, lipid and fatty acid concentrations in 867 healthy Europeans. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Eur J Clin Invest* **30**, 45-52.
- Baldo, A., Sniderman, A. D., St-Luce, S., Avramoglu, R. K., Maslowska, M., Hoang, B., Monge, J. C., Bell, A., Mulay, S. & Cianflone, K.** (1993). The adipin-acylation stimulating protein system and regulation of intracellular triglyceride synthesis. *J Clin Invest* **92**, 1543-7.
- Belfort, R., Mandarino, L., Kashyap, S., Wirfel, K., Pratipanawatr, T., Berria, R., DeFronzo, R. A. & Cusi, K.** (2005). Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes* **54**, 1640-8.
- Bellanger, S., Battista, M. C., Fink, G. D. & Baillargeon, J. P.** (2012). Saturated fatty acid exposure induces androgen overproduction in bovine adrenal cells. *Steroids* **77**, 347-53.
- Bergman, R. N.** (1989). Lilly lecture 1989. Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal-model approach. *Diabetes* **38**, 1512-27.
- Bergman, R. N., Hope, I. D., Yang, Y. J., Watanabe, R. M., Meador, M. A., Youn, J. H. & Ader, M.** (1989). Assessment of insulin sensitivity in vivo: a critical review. *Diabetes Metab Rev* **5**, 411-29.
- Bergman, R. N., Ider, Y. Z., Bowden, C. R. & Cobelli, C.** (1979). Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol* **236**, E667-77.
- Bergman, R. N., Van Citters, G. W., Mittelman, S. D., Dea, M. K., Hamilton-Wessler, M., Kim, S. P. & Ellmerer, M.** (2001). Central role of the adipocyte in the metabolic syndrome. *J Investig Med* **49**, 119-26.
- Bjorntorp, P.** (1990). "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* **10**, 493-6.
- Bjorntorp, P. & Sjostrom, L.** (1978). Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations. *Metabolism* **27**, 1853-65.
- Blucher, M.** (2009). Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **117**, 241-50.
- Bock, G., Dalla Man, C., Campioni, M., Chittilapilly, E., Basu, R., Toffolo, G., Cobelli, C. & Rizza, R.** (2006). Pathogenesis of pre-diabetes: mechanisms of fasting and postprandial hyperglycemia in people with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance. *Diabetes* **55**, 3536-49.
- Boden, G.** (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* **46**, 3-10.
- Boivin, A., Brochu, G., Marceau, S., Marceau, P., Hould, F. S. & Tchernof, A.** (2007). Regional differences in adipose tissue metabolism in obese men. *Metabolism* **56**, 533-40.
- Borel, A. L., Boulet, G., Nazare, J. A., Smith, J., Almeras, N., Tremblay, A., Bergeron, J., Poirier, P., Carpentier, A. C. & Despres, J. P.** (2013). Improved plasma FFA/insulin homeostasis is independently associated with improved glucose tolerance after a 1-year lifestyle intervention in viscerally obese men. *Diabetes Care* **36**, 3254-61.
- Campbell, P. J., Carlson, M. G. & Nurjhan, N.** (1994). Fat metabolism in human obesity. *Am J Physiol* **266**, E600-5.
- Carpentier, A., Mittelman, S. D., Bergman, R. N., Giacca, A. & Lewis, G. F.** (2000). Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic beta-cell function in obese nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* **49**, 399-408.
- Carpentier, A., Mittelman, S. D., Lamarche, B., Bergman, R. N., Giacca, A. & Lewis, G. F.** (1999). Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. *Am J Physiol* **276**, E1055-66.

- Carpentier, A. C.** (2008). Postprandial fatty acid metabolism in the development of lipotoxicity and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* **34**, 97-107.
- Carpentier, A. C.** (2013). The 2012 CDA-CIHR INMD Young Investigator Award Lecture: Dysfunction of Adipose Tissues and the Mechanisms of Ectopic Fat Deposition in Type 2 Diabetes. *Can J Diabetes* **37**, 109-14.
- Carpentier, A. C., Bourbonnais, A., Frisch, F., Giacca, A. & Lewis, G. F.** (2010). Plasma nonesterified Fatty Acid intolerance and hyperglycemia are associated with intravenous lipid-induced impairment of insulin sensitivity and disposition index. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 1256-64.
- Carpentier, A. C., Frisch, F., Cyr, D., Genereux, P., Patterson, B. W., Giguere, R. & Baillargeon, J. P.** (2005). On the suppression of plasma nonesterified fatty acids by insulin during enhanced intravascular lipolysis in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**, E849-56.
- Cheng, C., Campbell, K. L., Kushner, H. & Falkner, B. E.** (2004). Correlation of oral glucose tolerance test-derived estimates of insulin sensitivity with insulin clamp measurements in an African-American cohort. *Metabolism* **53**, 1107-12.
- Coppack, S. W., Patel, J. N. & Lawrence, V. J.** (2001). Nutritional regulation of lipid metabolism in human adipose tissue. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **109 Suppl 2**, S202-14.
- Corbould, A.** (2007). Chronic testosterone treatment induces selective insulin resistance in subcutaneous adipocytes of women. *J Endocrinol* **192**, 585-94.
- Cryer, P. E., Axelrod, L., Grossman, A. B., Heller, S. R., Montori, V. M., Seaquist, E. R. & Service, F. J.** (2009). Evaluation and management of adult hypoglycemic disorders: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 709-28.
- Da Silva, M. S., Julien, P., Couture, P., Lemieux, S., Vohl, M. C. & Rudkowska, I.** (2014). Associations between dairy intake and metabolic risk parameters in a healthy French-Canadian population. *Appl Physiol Nutr Metab* **39**, 1323-31.
- De Meyts, P.** (2004). Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays* **26**, 1351-62.
- DeFronzo, R. A., Tobin, J. D. & Andres, R.** (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* **237**, E214-23.
- Despres, J. P.** (2001). Health consequences of visceral obesity. *Ann Med* **33**, 534-41.
- Despres, J. P.** (2012). Abdominal obesity and cardiovascular disease: is inflammation the missing link? *Can J Cardiol* **28**, 642-52.
- Despres, J. P. & Lemieux, I.** (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* **444**, 881-7.
- Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E. & Raptis, S. A.** (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract* **93 Suppl 1**, S52-9.
- Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M. E., Dufour, S., Cline, G. W., Slezak, L. A., Andersen, D. K., Hundal, R. S., Rothman, D. L., Petersen, K. F. & Shulman, G. I.** (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* **103**, 253-9.
- Drolet, R., Richard, C., Sniderman, A. D., Mailloux, J., Fortier, M., Huot, C., Rheume, C. & Tchernof, A.** (2008). Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int J Obes (Lond)* **32**, 283-91.
- Duman, J. G. & Forte, J. G.** (2003). What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C237-49.
- Dunaif, A., Segal, K. R., Futterweit, W. & Dobrjansky, A.** (1989). Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* **38**, 1165-74.

Duncan, R. E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E. & Sul, H. S. (2007). Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr* **27**, 79-101.

Fabbrini, E., Magkos, F., Mohammed, B. S., Pietka, T., Abumrad, N. A., Patterson, B. W., Okunade, A. & Klein, S. (2009). Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15430-5.

Ferrari, P., Alleman, Y., Shaw, S., Riesen, W. & Weidmann, P. (1991). Reproducibility of insulin sensitivity measured by the minimal model method. *Diabetologia* **34**, 527-30.

Fielding, B. A. & Frayn, K. N. (1998). Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids. *Br J Nutr* **80**, 495-502.

Finucane, F. M., Sharp, S. J., Hatunic, M., Sleight, A., De Lucia Rolfe, E., Sayer, A. A., Cooper, C., Griffin, S. J., Savage, D. B. & Wareham, N. J. (2013). Intrahepatic Lipid Content and Insulin Resistance Are More Strongly Associated with Impaired NEFA Suppression after Oral Glucose Loading Than with Fasting NEFA Levels in Healthy Older Individuals. *Int J Endocrinol* **2013**, 870487.

Foo, L. H., Teo, P. S., Abdullah, N. F., Aziz, M. E. & Hills, A. P. (2013). Relationship between anthropometric and dual energy X-ray absorptiometry measures to assess total and regional adiposity in Malaysian adolescents. *Asia Pac J Clin Nutr* **22**, 348-56.

Foretz, M., Ancellin, N., Andreelli, F., Saintillan, Y., Grondin, P., Kahn, A., Thorens, B., Vaulont, S. & Viollet, B. (2005). Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes* **54**, 1331-9.

Frayn, K. N. (2002). Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* **45**, 1201-10.

Frayn, K. N., Karpe, F., Fielding, B. A., Macdonald, I. A. & Coppack, S. W. (2003). Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**, 875-88.

Frayn, K. N., Shadid, S., Hamlani, R., Humphreys, S. M., Clark, M. L., Fielding, B. A., Boland, O. & Coppack, S. W. (1994). Regulation of fatty acid movement in human adipose tissue in the postabsorptive-to-postprandial transition. *Am J Physiol* **266**, E308-17.

Garg, A. (2004). Regional adiposity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 4206-10.

Getty, L., Hamilton-Wessler, M., Ader, M., Dea, M. K. & Bergman, R. N. (1998). Biphasic insulin secretion during intravenous glucose tolerance test promotes optimal interstitial insulin profile. *Diabetes* **47**, 1941-7.

Ginsburg, J. M. (1972). Effect of glucose and free fatty acid on phosphate transport in dog kidney. *Am J Physiol* **222**, 1153-60.

Gonzalez-Ortiz, M., Martinez-Abundis, E. & Pascoe-Gonzalez, S. (1999). Comparison between usual and low doses of insulin in the assessment of insulin sensitivity with a short insulin tolerance test in obese women. *Arch Med Res* **30**, 385-7.

Goodarzi, M. O. & Korenman, S. G. (2003). The importance of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **80**, 255-8.

Grigsby, R. J. & Dobrowsky, R. T. (2001). Inhibition of ceramide production reverses TNF-induced insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 1121-4.

Groop, L. C., Bonadonna, R. C., Simonson, D. C., Petrides, A. S., Shank, M. & DeFronzo, R. A. (1992). Effect of insulin on oxidative and nonoxidative pathways of free fatty acid metabolism in human obesity. *Am J Physiol* **263**, E79-84.

Hanson, R. L., Pratley, R. E., Bogardus, C., Narayan, K. M., Roumain, J. M., Imperatore, G., Fagot-Campagna, A., Pettitt, D. J., Bennett, P. H. & Knowler, W. C. (2000). Evaluation of simple indices of insulin sensitivity and insulin secretion for use in epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* **151**, 190-8.

Haslam, D. (2007). Obesity: a medical history. *Obes Rev* **8 Suppl 1**, 31-6.

Hassan, M., Latif, N. & Yacoub, M. (2012). Adipose tissue: friend or foe? *Nat Rev Cardiol* **9**, 689-702.

- Hellerstein, M. K., Christiansen, M., Kaempfer, S., Kletke, C., Wu, K., Reid, J. S., Mulligan, K., Hellerstein, N. S. & Shackleton, C. H.** (1991). Measurement of de novo hepatic lipogenesis in humans using stable isotopes. *J Clin Invest* **87**, 1841-52.
- Hellerstein, M. K., Schwarz, J. M. & Neese, R. A.** (1996). Regulation of hepatic de novo lipogenesis in humans. *Annu Rev Nutr* **16**, 523-57.
- Hellmer, J., Marcus, C., Sonnenfeld, T. & Arner, P.** (1992). Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* **75**, 15-20.
- Henderson, M., Baillargeon, J. P., Rabasa-Lhoret, R., Chiasson, J. L., Hanley, J. & Lambert, M.** (2012). Estimating insulin secretion in youth using simple indices derived from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Metab* **38**, 309-15.
- Hill, J. O.** (2006). Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr Rev* **27**, 750-61.
- Hollenbeck, C. B., Chen, N., Chen, Y. D. & Reaven, G. M.** (1984). Relationship between the plasma insulin response to oral glucose and insulin-stimulated glucose utilization in normal subjects. *Diabetes* **33**, 460-3.
- Holt, H. B., Wild, S. H., Wood, P. J., Zhang, J., Darekar, A. A., Dewbury, K., Poole, R. B., Holt, R. I., Phillips, D. I. & Byrne, C. D.** (2006). Non-esterified fatty acid concentrations are independently associated with hepatic steatosis in obese subjects. *Diabetologia* **49**, 141-8.
- Horowitz, J. F., Coppack, S. W., Paramore, D., Cryer, P. E., Zhao, G. & Klein, S.** (1999). Effect of short-term fasting on lipid kinetics in lean and obese women. *Am J Physiol* **276**, E278-84.
- Hui, D. Y., Labonte, E. D. & Howles, P. N.** (2008). Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. III. Intestinal transporters and cholesterol absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**, G839-43.
- Itani, S. I., Ruderman, N. B., Schmedier, F. & Boden, G.** (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* **51**, 2005-11.
- Item, F. & Konrad, D.** (2012). Visceral fat and metabolic inflammation: the portal theory revisited. *Obes Rev* **13 Suppl 2**, 30-9.
- Janssen, I., Katzmarzyk, P. T. & Ross, R.** (2004). Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *Am J Clin Nutr* **79**, 379-84.
- Jansson, P. A., Larsson, A., Smith, U. & Lonroth, P.** (1992). Glycerol production in subcutaneous adipose tissue in lean and obese humans. *J Clin Invest* **89**, 1610-7.
- Jensen, M. D., Caruso, M., Heiling, V. & Miles, J. M.** (1989). Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes* **38**, 1595-601.
- Jocken, J. W., Goossens, G. H., Boon, H., Mason, R. R., Essers, Y., Havekes, B., Watt, M. J., van Loon, L. J. & Blaak, E. E.** (2013). Insulin-mediated suppression of lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle of obese type 2 diabetic men and men with normal glucose tolerance. *Diabetologia* **56**, 2255-65.
- Jocken, J. W., Langin, D., Smit, E., Saris, W. H., Valle, C., Hul, G. B., Holm, C., Arner, P. & Blaak, E. E.** (2007). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 2292-9.
- Kanety, H., Hemi, R., Papa, M. Z. & Karasik, A.** (1996). Sphingomyelinase and ceramide suppress insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem* **271**, 9895-7.
- Kaplan, R. M., Bush, J. W. & Berry, C. C.** (1976). Health status: types of validity and the index of well-being. *Health Serv Res* **11**, 478-507.
- Katzmarzyk, P. T.** (2002). The Canadian obesity epidemic: an historical perspective. *Obes Res* **10**, 666-74.

Kelley, D., Mitrakou, A., Marsh, H., Schwenk, F., Benn, J., Sonnenberg, G., Arcangeli, M., Aoki, T., Sorensen, J., Berger, M. & et al. (1988). Skeletal muscle glycolysis, oxidation, and storage of an oral glucose load. *J Clin Invest* **81**, 1563-71.

Kelsey, M. M., Forster, J. E., Van Pelt, R. E., Reusch, J. E. & Nadeau, K. J. (2013). Adipose tissue insulin resistance in adolescents with and without type 2 diabetes. *Pediatr Obes*.

Khalfallah, Y., Fages, S., Laville, M., Langin, D. & Vidal, H. (2000). Regulation of uncoupling protein-2 and uncoupling protein-3 mRNA expression during lipid infusion in human skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *Diabetes* **49**, 25-31.

Kim, J. K., Kim, Y. J., Fillmore, J. J., Chen, Y., Moore, I., Lee, J., Yuan, M., Li, Z. W., Karin, M., Perret, P., Shoelson, S. E. & Shulman, G. I. (2001). Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* **108**, 437-46.

Krentz, A. J. (1996). Insulin resistance. *BMJ* **313**, 1385-9.

Kruszynska, Y. T., Worrall, D. S., Ofrecio, J., Frias, J. P., Macaraeg, G. & Olefsky, J. M. (2002). Fatty acid-induced insulin resistance: decreased muscle PI3K activation but unchanged Akt phosphorylation. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 226-34.

Lafontan, M. (2008). Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)* **32 Suppl 7**, S39-51.

Lam, T. K., Carpentier, A., Lewis, G. F., van de Werve, G., Fantus, I. G. & Giacca, A. (2003). Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E863-73.

Lapidus, L., Bengtsson, C., Larsson, B., Pennert, K., Rybo, E. & Sjostrom, L. (1984). 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**, 1257-61.

Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H. & Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* **30**, 294-309.

Lau, D. C., Douketis, J. D., Morrison, K. M., Hramiak, I. M., Sharma, A. M. & Ur, E. (2007). 2006 Canadian clinical practice guidelines on the management and prevention of obesity in adults and children [summary]. *CMAJ* **176**, S1-13.

Lee, Y. H., Mottillo, E. P. & Granneman, J. G. (2014). Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 358-69.

Legro, R. S., Finegood, D. & Dunaif, A. (1998). A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 2694-8.

Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkison, W. O., Willson, T. M. & Kliewer, S. A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* **270**, 12953-6.

Lewis, G. F., Carpentier, A., Adeli, K. & Giacca, A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* **23**, 201-29.

Lomonaco, R., Ortiz-Lopez, C., Orsak, B., Webb, A., Hardies, J., Darland, C., Finch, J., Gastaldelli, A., Harrison, S., Tio, F. & Cusi, K. (2012). Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **55**, 1389-97.

Mai, K., Bobbert, T., Reinecke, F., Andres, J., Maser-Gluth, C., Wudy, S. A., Mohlig, M., Weickert, M. O., Hartmann, M. F., Schulte, H. M., Diederich, S., Pfeiffer, A. F. & Spranger, J. (2008). Intravenous lipid and heparin infusion-induced elevation in free fatty acids and triglycerides modifies circulating androgen levels in women: a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 3900-6.

Mandarino, L. J., Printz, R. L., Cusi, K. A., Kinchington, P., O'Doherty, R. M., Osawa, H., Sewell, C., Consoli, A., Granner, D. K. & DeFronzo, R. A. (1995). Regulation of hexokinase II and glycogen synthase mRNA, protein, and activity in human muscle. *Am J Physiol* **269**, E701-8.

Mao, J., DeMayo, F. J., Li, H., Abu-Elheiga, L., Gu, Z., Shaikenov, T. E., Kordari, P., Chirala, S. S., Heird, W. C. & Wakil, S. J. (2006). Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8552-7.

Marin, P., Andersson, B., Ottosson, M., Olbe, L., Chowdhury, B., Kvist, H., Holm, G., Sjostrom, L. & Bjorntorp, P. (1992). The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism* **41**, 1242-8.

Martin-Gronert, M. S. & Ozanne, S. E. (2013). Early life programming of obesity. *Med Wieku Rozwoj* **17**, 7-12.

Matsuda, M. & DeFronzo, R. A. (1999). Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* **22**, 1462-70.

Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F. & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412-9.

McLaughlin, T., Yee, G., Glassford, A., Lamendola, C. & Reaven, G. (2011). Use of a two-stage insulin infusion study to assess the relationship between insulin suppression of lipolysis and insulin-mediated glucose uptake in overweight/obese, nondiabetic women. *Metabolism* **60**, 1741-7.

McQuaid, S. E., Hodson, L., Neville, M. J., Dennis, A. L., Cheeseman, J., Humphreys, S. M., Ruge, T., Gilbert, M., Fielding, B. A., Frayn, K. N. & Karpe, F. (2011). Downregulation of adipose tissue fatty acid trafficking in obesity: a driver for ectopic fat deposition? *Diabetes* **60**, 47-55.

Miles, J. M., Wooldridge, D., Grellner, W. J., Windsor, S., Isley, W. L., Klein, S. & Harris, W. S. (2003). Nocturnal and postprandial free fatty acid kinetics in normal and type 2 diabetic subjects: effects of insulin sensitization therapy. *Diabetes* **52**, 675-81.

Monzillo, L. U. & Hamdy, O. (2003). Evaluation of insulin sensitivity in clinical practice and in research settings. *Nutr Rev* **61**, 397-412.

Muniyappa, R., Lee, S., Chen, H. & Quon, M. J. (2008). Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E15-26.

Muoio, D. M. & Newgard, C. B. (2008). Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 193-205.

Nellemann, B., Gormsen, L. C., Sorensen, L. P., Christiansen, J. S. & Nielsen, S. (2012). Impaired insulin-mediated antilipolysis and lactate release in adipose tissue of upper-body obese women. *Obesity (Silver Spring)* **20**, 57-64.

Nestler, J. E., Jakubowicz, D. J., de Vargas, A. F., Brik, C., Quintero, N. & Medina, F. (1998). Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 2001-5.

Ninomiya, K., Matsuda, H., Shimoda, H., Nishida, N., Kasajima, N., Yoshino, T., Morikawa, T. & Yoshikawa, M. (2004). Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorg Med Chem Lett* **14**, 1943-6.

Ntyintyane, L., Panz, V., Raal, F. & Gill, G. (2010). Comparison between surrogate indices of insulin sensitivity and resistance, and the hyperinsulinaemic euglycaemic glucose clamp in urban South African blacks with and without coronary artery disease. *Diab Vasc Dis Res* **7**, 151-7.

Olivecrona, G. & Olivecrona, T. (2010). Triglyceride lipases and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **21**, 409-15.

- Pacini, G. & Bergman, R. N.** (1986). MINMOD: a computer program to calculate insulin sensitivity and pancreatic responsiveness from the frequently sampled intravenous glucose tolerance test. *Comput Methods Programs Biomed* **23**, 113-22.
- Paula, H. A., Ribeiro Rde, C., Rosado, L. E., Abranches, M. V. & Franceschini Sdo, C.** (2012). Classic anthropometric and body composition indicators can predict risk of metabolic syndrome in elderly. *Ann Nutr Metab* **60**, 264-71.
- Peeva, E., Brun, L. D., Ven Murthy, M. R., Despres, J. P., Normand, T., Gagne, C., Lupien, P. J. & Julien, P.** (1992). Adipose cell size and distribution in familial lipoprotein lipase deficiency. *Int J Obes Relat Metab Disord* **16**, 737-44.
- Pellerin, L.** (2010). Food for thought: the importance of glucose and other energy substrates for sustaining brain function under varying levels of activity. *Diabetes Metab* **36 Suppl 3**, S59-63.
- Penna, I. A., Canella, P. R., Reis, R. M., Silva de Sa, M. F. & Ferriani, R. A.** (2005). Acarbose in obese patients with polycystic ovarian syndrome: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Hum Reprod* **20**, 2396-401.
- Peraldi, P., Hotamisligil, G. S., Buurman, W. A., White, M. F. & Spiegelman, B. M.** (1996). Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem* **271**, 13018-22.
- Perret, P., Ghezzi, C., Mathieu, J. P., Morin, C. & Fagret, D.** (2003). Assessment of insulin sensitivity in vivo in control and diabetic mice with a radioactive tracer of glucose transport: [125I]-6-deoxy-6-iodo-D-glucose. *Diabetes Metab Res Rev* **19**, 306-12.
- Petersen, K. F. & Shulman, G. I.** (2006). Etiology of insulin resistance. *Am J Med* **119**, S10-6.
- Petta, S., Muratore, C. & Craxi, A.** (2009). Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future. *Dig Liver Dis* **41**, 615-25.
- Poirier, H., Degrace, P., Niot, I., Bernard, A. & Besnard, P.** (1996). Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *Eur J Biochem* **238**, 368-73.
- Prentki, M. & Nolan, C. J.** (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* **116**, 1802-12.
- Qu, J., Wang, Y., Wu, X., Gao, L., Hou, L. & Erkkola, R.** (2009). Insulin resistance directly contributes to androgenic potential within ovarian theca cells. *Fertil Steril* **91**, 1990-7.
- Radziuk, J.** (2000). Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 4426-33.
- Rehnan, A. G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R. F. & Zwahlen, M.** (2008). Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* **371**, 569-78.
- Revelo, X. S., Luck, H., Winer, S. & Winer, D. A.** (2014). Morphological and inflammatory changes in visceral adipose tissue during obesity. *Endocr Pathol* **25**, 93-101.
- Reynisdottir, S., Dazats, M., Thorne, A. & Langin, D.** (1997). Comparison of hormone-sensitive lipase activity in visceral and subcutaneous human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 4162-6.
- Riccio, A., Del Prato, S., Vigili de Kreutzenberg, S. & Tiengo, A.** (1991). Glucose and lipid metabolism in non-insulin-dependent diabetes. Effect of metformin. *Diabete Metab* **17**, 180-4.
- Richardson, D. K., Kashyap, S., Bajaj, M., Cusi, K., Mandarino, S. J., Finlayson, J., DeFronzo, R. A., Jenkinson, C. P. & Mandarino, L. J.** (2005). Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle. *J Biol Chem* **280**, 10290-7.

- Rincon, J., Holmang, A., Wahlstrom, E. O., Lonroth, P., Bjorntorp, P., Zierath, J. R. & Wallberg-Henriksson, H.** (1996). Mechanisms behind insulin resistance in rat skeletal muscle after oophorectomy and additional testosterone treatment. *Diabetes* **45**, 615-21.
- Roden, M., Price, T. B., Perseghin, G., Petersen, K. F., Rothman, D. L., Cline, G. W. & Shulman, G. I.** (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* **97**, 2859-65.
- Roden, M., Stingl, H., Chandramouli, V., Schumann, W. C., Hofer, A., Landau, B. R., Nowotny, P., Waldhausl, W. & Shulman, G. I.** (2000). Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. *Diabetes* **49**, 701-7.
- Ruge, T., Hodson, L., Cheeseman, J., Dennis, A. L., Fielding, B. A., Humphreys, S. M., Frayn, K. N. & Karpe, F.** (2009). Fasted to fed trafficking of Fatty acids in human adipose tissue reveals a novel regulatory step for enhanced fat storage. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 1781-8.
- Sadur, C. N. & Eckel, R. H.** (1982). Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase. Use of the euglycemic clamp technique. *J Clin Invest* **69**, 1119-25.
- Saghizadeh, M., Ong, J. M., Garvey, W. T., Henry, R. R. & Kern, P. A.** (1996). The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* **97**, 1111-6.
- Schalch, D. S. & Kipnis, D. M.** (1965). Abnormalities in carbohydrate tolerance associated with elevated plasma nonesterified fatty acids. *J Clin Invest* **44**, 2010-20.
- Schwarz, J. M., Linfoot, P., Dare, D. & Aghajanian, K.** (2003). Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr* **77**, 43-50.
- Scow, R. O., Blanchette-Mackie, E. J. & Smith, L. C.** (1980). Transport of lipid across capillary endothelium. *Fed Proc* **39**, 2610-7.
- Seidell, J. C., Cigolini, M., Charzewska, J., Ellsinger, B. M. & di Biase, G.** (1990). Fat distribution in European women: a comparison of anthropometric measurements in relation to cardiovascular risk factors. *Int J Epidemiol* **19**, 303-8.
- Sharma, A. M. & Kushner, R. F.** (2009). A proposed clinical staging system for obesity. *Int J Obes (Lond)* **33**, 289-95.
- Shulman, G. I.** (2004). Unraveling the cellular mechanism of insulin resistance in humans: new insights from magnetic resonance spectroscopy. *Physiology (Bethesda)* **19**, 183-90.
- Singh, B. & Saxena, A.** (2010). Surrogate markers of insulin resistance: A review. *World J Diabetes* **1**, 36-47.
- Slawik, M. & Vidal-Puig, A. J.** (2006). Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging. *Ageing Res Rev* **5**, 144-64.
- Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Ryden, M., Frisen, J. & Arner, P.** (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783-7.
- Staehr, P., Hother-Nielsen, O., Landau, B. R., Chandramouli, V., Holst, J. J. & Beck-Nielsen, H.** (2003). Effects of free fatty acids per se on glucose production, gluconeogenesis, and glycogenolysis. *Diabetes* **52**, 260-7.
- Stahl, A., Gimeno, R. E., Tartaglia, L. A. & Lodish, H. F.** (2001). Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrinol Metab* **12**, 266-73.
- Steil, G. M., Murray, J., Bergman, R. N. & Buchanan, T. A.** (1994). Repeatability of insulin sensitivity and glucose effectiveness from the minimal model. Implications for study design. *Diabetes* **43**, 1365-71.
- Stein, C. J. & Colditz, G. A.** (2004). The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2522-5.
- Steiner, D. F., Park, S. Y., Stoy, J., Philipson, L. H. & Bell, G. I.** (2009). A brief perspective on insulin production. *Diabetes Obes Metab* **11 Suppl 4**, 189-96.

- Stumvoll, M., Wahl, H. G., Loblein, K., Becker, R., Volk, A., Renn, W., Jacob, S. & Haring, H.** (2001). A novel use of the hyperinsulinemic-euglycemic clamp technique to estimate insulin sensitivity of systemic lipolysis. *Horm Metab Res* **33**, 89-95.
- Summers, S. A.** (2006). Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* **45**, 42-72.
- Sun, K., Kusminski, C. M. & Scherer, P. E.** (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* **121**, 2094-101.
- Tanti, J. F., Gremeaux, T., van Obberghen, E. & Le Marchand-Brustel, Y.** (1994). Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *J Biol Chem* **269**, 6051-7.
- Tchernof, A.** (2007). Visceral adipocytes and the metabolic syndrome. *Nutr Rev* **65**, S24-9.
- Tchernof, A., Belanger, C., Morisset, A. S., Richard, C., Mailloux, J., Laberge, P. & Dupont, P.** (2006). Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution. *Diabetes* **55**, 1353-60.
- Tchernof, A. & Despres, J. P.** (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev* **93**, 359-404.
- Tessari, P., Coracina, A., Cosma, A. & Tiengo, A.** (2009). Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **19**, 291-302.
- Tremblay, A. J., Despres, J. P., Piche, M. E., Nadeau, A., Bergeron, J., Almeras, N., Tremblay, A. & Lemieux, S.** (2004). Associations between the fatty acid content of triglyceride, visceral adipose tissue accumulation, and components of the insulin resistance syndrome. *Metabolism* **53**, 310-7.
- Trikudanathan, S., Raji, A., Chamarthi, B., Seely, E. W. & Simonson, D. C.** (2013). Comparison of insulin sensitivity measures in South Asians. *Metabolism* **62**, 1448-54.
- Tripathy, D., Almgren, P., Tuomi, T. & Groop, L.** (2004). Contribution of insulin-stimulated glucose uptake and basal hepatic insulin sensitivity to surrogate measures of insulin sensitivity. *Diabetes Care* **27**, 2204-10.
- Tripathy, D., Mohanty, P., Dhindsa, S., Syed, T., Ghanim, H., Aljada, A. & Dandona, P.** (2003). Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* **52**, 2882-7.
- Trottier, A., Battista, M. C., Geller, D. H., Moreau, B., Carpentier, A. C., Simoneau-Roy, J. & Baillargeon, J. P.** (2012). Adipose tissue insulin resistance in peripubertal girls with first-degree family history of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **98**, 1627-34.
- Tura, A., Sbrignadello, S., Succurro, E., Groop, L., Sesti, G. & Pacini, G.** (2010). An empirical index of insulin sensitivity from short IVGTT: validation against the minimal model and glucose clamp indices in patients with different clinical characteristics. *Diabetologia* **53**, 144-52.
- Unger, R. H.** (1995). Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* **44**, 863-70.
- Unger, R. H.** (2002). Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med* **53**, 319-36.
- Van Pelt, R. E., Gozansky, W. S. & Kohrt, W. M.** (2013). A novel index of whole body antilipolytic insulin action. *Obesity (Silver Spring)* **21**, E162-5.
- Venkatesan, V., Madhira, S. L., Malakapalli, V. M., Chalasani, M., Shaik, S. N., Seshadri, V., Kodavalla, V., Bhone, R. R. & Nappanveetil, G.** (2013). Obesity, insulin resistance, and metabolic syndrome: a study in WNIN/Ob rats from a pancreatic perspective. *Biomed Res Int* **2013**, 617569.
- Vettor, R., Milan, G., Rossato, M. & Federspil, G.** (2005). Review article: adipocytokines and insulin resistance. *Aliment Pharmacol Ther* **22 Suppl 2**, 3-10.
- Virtue, S. & Vidal-Puig, A.** (2008). It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol* **6**, e237.
- Wahrenberg, H., Lonnqvist, F. & Arner, P.** (1989). Mechanisms underlying regional differences in lipolysis in human adipose tissue. *J Clin Invest* **84**, 458-67.

- Wang, C. N., O'Brien, L. & Brindley, D. N.** (1998). Effects of cell-permeable ceramides and tumor necrosis factor-alpha on insulin signaling and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **47**, 24-31.
- Wang, D. Q.** (2007). Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu Rev Physiol* **69**, 221-48.
- Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K. & Scherer, P. E.** (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* **19**, 1338-44.
- Weyer, C., Foley, J. E., Bogardus, C., Tataranni, P. A. & Pratley, R. E.** (2000). Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia* **43**, 1498-506.
- Woerle, H. J., Meyer, C., Dostou, J. M., Gosmanov, N. R., Islam, N., Popa, E., Wittlin, S. D., Welle, S. L. & Gerich, J. E.** (2003). Pathways for glucose disposal after meal ingestion in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E716-25.
- Yang, J., Kang, J. & Guan, Y.** (2013). The mechanisms linking adiposopathy to type 2 diabetes. *Front Med* **7**, 433-44.
- Yang, Y. J., Youn, J. H. & Bergman, R. N.** (1987). Modified protocols improve insulin sensitivity estimation using the minimal model. *Am J Physiol* **253**, E595-602.
- Yildiz, B. O., Knochenhauer, E. S. & Azziz, R.** (2008). Impact of obesity on the risk for polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 162-8.