

**UNIVERSITE DE NANTES
UFR DE MEDECINE ET TECHNIQUES MEDICALES**

**NOUVELLE APPROCHE DE L'ETUDE CINETIQUE DU
MÉTABOLISME DES HDL PAR MARQUAGE
ENDOGENE DE L'APO A-I PAR LES ISOTOPES
STABLES CHEZ L'HOMME**

THESE DE DOCTORAT

**Ecole Doctorale de Chimie Biologie
Discipline : Science de la vie et de la Santé
Spécialité : Nutrition et Métabolisme**

présentée et soutenue par

Maud CHETIVEAUX

Le 12 octobre 2004, devant le jury ci-dessous

**Rapporteurs Mr Philippe Moulin, Professeur des Universités, CHU, Lyon
 Mr Bruno Vergès, Professeur des Universités, CHU, Dijon**

**Examineurs Mr John M. Chapman, Directeur de recherche, Inserm U551, Paris
 Mr Gilles Lambert, Maître de Conférence, Faculté de médecine, Nantes
 Mr Thierry Magot, Professeur des Universités, Faculté des Sciences et
 des techniques, Nantes**

Directeur de thèse : Mr Michel Krempf, Professeur des Universités, CHU, Nantes

REMERCIEMENTS

Je remercie tout particulièrement le Professeur Michel Krempf de m'avoir fait confiance tout au long de cette thèse. Qu'il sache ici que je lui suis sincèrement reconnaissante de son aide et de son soutien.

Je remercie Monsieur Philippe Moulin et Monsieur Bruno Vergès pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail, en tant que rapporteurs et en dépit de leur charge ; qu'ils trouvent ici ma profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur John Chapman qui m'a fait l'honneur de juger cette thèse, qu'il accepte ici ma chaleureuse gratitude.

Je remercie Monsieur Thierry Magot de m'avoir offert mon premier stage au sein de ce laboratoire et pour avoir très cordialement accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie Monsieur Gilles Lambert pour son amical soutien, et d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Madame Khadija Ouguerram pour sa confiance, sa patience et ses judicieux conseils concernant la modélisation des lipoprotéines.

LISTE DES PUBLICATION ET DES PRINCIPALES COMMUNICATIONS

Publications scientifiques

Chetiveaux M., Lalanne F., Lambert G., Zaïr Y., Ouguerram K., Krempf M. **2004** New insight in the study of kinetic aspects of HDL metabolism in type II diabetes patients with stable isotopes *Soumis à J.Clin.Endocrinol.Metab.*

Ouguerram K., Chetiveaux M., Zaïr Y., Costet P., Abifadel M., Varret M., Boileau C., Magot T., Krempf M. **2004** Apolipoprotein B100 Metabolism in Autosomal-Dominant Hypercholesterolemia Related to Mutations in PCSK9. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 27

Chetiveaux M., Ouguerram K., Zaïr Y., Maugère P., Falconi I., Nazih H., Krempf M. **2004** New model for kinetic studies of HDL metabolism in humans *Eur.J.Clin.Invest.* 34 : 262-267

Chetiveaux M., Nazih H., Ferchaud-Roucher V., Lambert G., Zair Y., Masson M., Ouguerram K., Bouhours D., Krempf M. **2002** The differential apoA-I enrichment of pre β_1 and α HDL is detectable by gel filtration separation. *J.Lipid.Res.* 43 : 1986-1993

Krempf M., Chetiveaux M., Masson M. **2001** Métabolisme des lipoprotéines. Traité de nutrition clinique de l'adulte. *Médecine-Science. Flammarion.* 63-70.

Principales communications

Communication orale au congrès annuel de la NSFA, Biarritz, 2004

Chétiveaux M., Ouguerram K., Zaïr Y., Krempf M. Etude cinétique du métabolisme de l'Apo A-I lors d'un diabète de type II : Importance du recyclage des HDL

Communication orale aux JFN, Dijon, 2002

Chétiveaux M., Ouguerram K., Zaïr Y., Nazih H., Krempf M. Analyse cinétique de l'Apo A-I des pré β_1 HDL et α HDL lors d'un diabète de type II

Communication affichée au congrès annuel de la NSFA, Biarritz, 2004

Gaugler M-H., Chétiveaux M., Krempf M. High density lipoproteins differentially modulate radiation-induced production of interleukin (IL)-6, IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by endothelial cells

Communication affichée au congrès de AHA, Orlando, 2003

Chétiveaux M., Ouguerram K., Zaïr Y., Maugère P., Nazih H., Krempf M. A new model for kinetic studies of HDL metabolism

Communication affichée au congrès annuel de la SFA, Biarritz, 2003

Chétiveaux M., Ouguerram K., Zaïr Y., Nazih H., Krempf M. Pré β_1 et α HDL : nouveau modèle d'analyse cinétique

Communication affichée au congrès de l'ALFEDIAM, Bordeaux, 2003

Chétiveaux M., Ouguerram K., Zaïr Y., Nazih H., Krempf M. Analyse cinétique de l'Apo A-I des pré β_1 HDL et α HDL lors d'un diabète de type II

Communication Affichée au congrès annuel de la SFA, Arcachon, 2002

Chétiveaux M., Ouguerram K., Zaïr Y., Maugère P., Nazih H., Krempf M. Analyse cinétique de l'Apo A-I des pré β_1 HDL et α HDL isolées par FPLC

Communication Affichée aux congrès AFERO, AFN & SNDLF, Paris, 2001

Chétiveaux M., Nazih H., Maugère P., Ferchaud-Roucher V., Ouguerram K., Krempf M. Mesure de l'enrichissement de l'Apo A-I des sous-populations de HDL isolées par FPLC

Communication Affichée aux journées francophones de nutrition, Tours, 2000

Chétiveaux M., Masson M., Krempf M. Mesure de l'enrichissement de l'Apo A-I des HDL isolées par FPLC et par ultracentrifugation

AFERO: Association française d'études et de recherche sur l'obésité

ALFEDIAM : Association de langue française pour l'étude du diabète des maladies métaboliques

ARCOL: Comité français de coordination des recherches sur le cholestérol

SFA : Société française d'athérosclérose

SNDLF : Société de nutrition et de diététique de langue française

SFN : Société française de nutrition

TABLE DES MATIERES

LISTES DES ABRÉVIATIONS	1
LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES	2
INTRODUCTION	6
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	8
I. LES LIPOPROTÉINES DE HAUTE DENSITÉ	8
I. I-1 Introduction : généralité sur les lipoprotéines	8
I-2 Les acteurs du métabolisme des HDL	10
I-2-1 Hétérogénéité des HDL	11
I-2-2 L'apolipoprotéine A-I	13
➤ Données physico-chimiques	13
➤ Polymorphisme de l'Apo A-I	14
➤ Régulation de l'expression de l'Apo A-I	15
I-2-3 Les autres apolipoprotéines	16
➤ L'apolipoprotéine A-II	16
I-2-4 Les enzymes et protéines intervenant dans le métabolisme des HDL	17
➤ La LCAT : « Lecithin : Cholesteryl Acyl Transferase »	18
➤ La HL : « Hepatic Lipase »	19
➤ La CETP : « Cholesteryl Ester Transfert Protein »	20
➤ La PLTP : « Phospholipid Transfer Protein »	20
➤ La LPL : « Lipoprotein Lipase »	21
I-2-5 Les récepteurs et transporteurs cellulaires intervenant dans le métabolisme des HDL	22
➤ L'ABCA1 : « ATP Binding Cassette class A1 »	22
➤ SR-BI : « Scavenger Recepteur Class B type I »	23
I-3 Le transport reverse du cholestérol	25
I-3-1 Origine des particules Apo A-I pauvres en lipides	26
I-3-2 Formation des préβ HDL	27
➤ Propriétés, régulations et expression des préβ HDL	28
I-3-3 Conversion des préβ HDL en αHDL petites	30

I-3-4 Conversion des α HDL petites en α HDL larges	30
I-3-5 Conversion des α HDL en pré β HDL	31
I-3-6 Catabolisme des HDL	33
➤ L'action de CETP, HL, SR-BI	33
➤ Mégaline/Cubuline	34
➤ ATP synthase	35
II. EXPLORATION CINÉTIQUE DU MÉTABOLISME DES HDL	35
II-1 Méthode de marquage de l'Apo A-I	36
II-1-1 Marquage exogène par des radiotraceurs	36
II-1-2 Marquage endogène	37
➤ Marquage endogène par des radioisotopes	37
➤ Marquage endogène par des isotopes stables	37
II-1-3 Choix du traceur	38
II-1-4 Administration du traceur	39
II-1-3 Choix du pool précurseur	40
II-2 Méthode d'analyse cinétique par modélisation	42
II-2-1 Définitions et nomenclature	42
➤ Système, compartiments et échanges entre compartiments	42
➤ Les équations différentielles	43
➤ Le FCR	44
II-2-2 Modélisation élémentaire du métabolisme de l'Apo A-I	44
➤ Principe	44
➤ Métabolisme de l'Apo A-I	45
II-2-3 méthodes évoluées de modélisation du métabolisme de l'Apo A-I	46
III. PHYSIOPATHOLOGIE DU MÉTABOLISME DES HDL	50
III-1 HDL et athérosclérose	50
III-1-1 Les mécanismes généraux de l'athérosclérose	50
III-1-2 Le rôle anti-athérogène des HDL	52
➤ HDL et paraoxonase	52
➤ HDL et PAF-AH	52
➤ HDL et NO	53
III-2 Variations cinétiques du métabolisme des HDL au cours de pathologies	54
III-2-1 Diabète de type II	54
III-2-2 Syndrome X plurimétabolique	55

III-2-3 Hypercholestérolémies familiales	56
III-2-4 Hypertriglycéridémie	57
III-2-5 Affectation de la LCAT	59
➤ La maladie de l'œil de poisson (Fish-Eye Disease)	59
➤ La déficience familiale en LCAT (FLD)	59
III-2-6 Affectation de l'ABCA1 : la maladie de Tangier	60
III-2-7 Affectation de la CETP	61
III-2-8 Hyperalphalipoprotéïnémie familiale	62
III-2-9 Mutation de l'Apo A-I	63
III-2-10 Conditions physiologiques	64
III-3 Les hypocholestérolémiants et hypotriglycéridémiants	66
III-3-1 Les statines	66
➤ Mécanismes d'action des statines	66
➤ Effets des statines sur le métabolisme des HDL	67
III-3-2 Les fibrates	67
➤ Mécanismes d'action des fibrates	67
➤ Effets des fibrates sur le métabolisme des HDL	68
III-4 Conclusion	69
OBJECTIFS	71
<hr/>	
TRAVAUX PERSONNELS	72
<hr/>	
Etude 1 : The differential Apo A-I enrichment of pre β_1 and α HDL is detectable by gel filtration	72
Etude 2 : New model for kinetic studies of HDL metabolism in humans	85
Etude 3 : Kinetics of pre β_1 HDL and α HDL in type II diabetic patients	94
Etude 4 : Etude du métabolisme des pré β_1 HDL et des α HDL à jeun et à l'état nourri	112
DISCUSSION GENERALE et CONCLUSION	139
<hr/>	
BIBLIOGRAPHIE	145
<hr/>	

LISTES DES ABREVIATIONS

ABCA1 :	« ATP binding cassette transporter de classe A »
Apo :	Apolipoprotéine
APR :	« Absolute Production Rate »
CE :	Cholestérol estérifié ou Esters de cholestérol
CETP :	« Cholesterol Ester Transfer Protein »
GC-MS :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
FCR :	« Fractional Catabolic Rate »
FPLC :	« Fast protein liquid chromatography »
FPR :	« Fractional Production Rate »
HDL :	« High Density Lipoprotein »
HL :	« Hepatic Lipase »
IMC ou BMI :	Indice de Masse Corporelle ou « Body Mass Index »
IDL :	« Intermediate Density Lipoproteins »
kDa :	Kilo Daltons
KO :	« Knock-out »
LCAT :	« Lecithin :Cholesterol Acyltransferase »
LDL :	« Low density lipoprotein »
LPL :	« Lipoprotein Lipase »
<i>m/z</i> :	Rapport masse sur charge
PL :	Phospholipides
PLTP :	« Phospholipid Transfer Protein »
PPAR :	« Peroxisome Proliferator Activated Receptor »
RXR:	« Retinoïc X Receptor »
SAAM II:	« Simulation Analysis And Modeling »
SDS-PAGE:	« Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis »
SR-BI :	« Scavenger Receptor Class B Type I »
TG :	Triglycérides
TRL:	« Triglyceride Rich Lipoprotein »
VLDL :	« Very low density lipoprotein »

LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES (non inclus dans les publications)

Liste des Tableaux

Tableau 1 :	Caractéristiques physico-chimiques des lipoprotéines (d'après Gotto <i>et al.</i> , 1986)	9
Tableau 2 :	Identité, expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines humaines	17
Tableau 3 :	Variations des paramètres cinétiques du métabolisme de l'Apo A-I des HDL en fonction du sexe, de l'alimentation ou de l'exercice	64
Tableau 4 :	Variations des paramètres cinétiques du métabolisme de l'Apo A-I des HDL dans diverses situations pathologiques	69
Tableau 5 :	Composition du repas administré aux patients pendant la durée de la cinétique	118
Tableau 6 :	Composition des lipides et apolipoprotéines du plasma (g/l)	118
Tableau 7 :	Synthèse des données cinétiques de l'Apo B48 des TRL	122
Tableau 8 :	Paramètres cinétiques des l'Apo A-I des TRL et des HDL selon notre modèle	127
Tableau 9 :	Paramètres cinétiques des l'Apo A-I des TRL et des HDL selon le modèle de Vélez-Carrasco <i>et al.</i>	132

Listes des Figures

Figure 1 :	Représentation schématique d'une lipoprotéine (d'après Brewer <i>et al.</i> , 1981)	8
Figure 2 :	HDL et transport reverse du cholestérol	11
Figure 3 :	Hétérogénéité des HDL humaines	12
Figure 4 :	Gène cluster Apo A-I – C-III – A-IV - Localisation des différents polymorphismes du gène de l'Apo A-I	14
Figure 5 :	Représentation schématique d'ABCA1	22
Figure 6 :	Représentation schématique du mode d'action de SR-BI	24
Figure 7 :	Cycle de renouvellement des HDL	26
Figure 8 :	Origine des particules Apo A-I pauvres en lipides	27
Figure 9 :	Mécanismes moléculaires de l'efflux du cholestérol cellulaire	28
Figure 10 :	Conversion des α HDL petites en α HDL larges sous l'action de la LCAT	31
Figure 11 :	Rôle de la PLTP dans le remodelage des HDL et le transport reverse du cholestérol	32
Figure 12 :	Rôle de l'ATP synthase dans l'endocytose des HDL	35
Figure 13 :	Représentation graphique d'un modèle	43
Figure 14 :	Représentation monocompartmentale	44

Figure 15 :	Modèle représentant le métabolisme de l'Apo A-I des HDL selon Blum <i>et al.</i> (Blum <i>et al.</i> , 1977).	47
Figure 16 :	Modèle du métabolisme de l'Apo A-I selon Zech <i>et al.</i> (Zech <i>et al.</i> , 1983).	48
Figure 17 :	Modèles du métabolisme de l'Apo A-I selon Fisher <i>et al.</i> (Fischer <i>et al.</i> , 1995).	48
Figure 18 :	Modèle du métabolisme de l'Apo A-I selon Watts <i>et al.</i> ou Bilz <i>et al.</i> (Watts <i>et al.</i> , 2003)(Bilz <i>et al.</i> , 2004).	49
Figure 19 :	Modèle du métabolisme de l'Apo A-I selon Colvin <i>et al.</i> (Colvin <i>et al.</i> , 1999).	49
Figure 20 :	Formation de la plaque athéromateuse	51
Figure 21 :	Voies de signalisation de l'activation de eNOS par les HDL	53
Figure 22 :	Le syndrome X plurimétabolique	56
Figure 23 :	Hypertriglycéridémie et métabolisme des HDL (d'après Lamarche <i>et al.</i> 1999)	58
Figure 24 :	Représentation schématique du métabolisme des HDL en présence et en absence d'efflux de cholestérol régulé par l'ABCA1	61
Figure 25 :	Mécanisme d'action des statines	66
Figure 26 :	Mécanisme d'action des fibrates	68
Figure 27 :	Chromatogramme des pré β_1 HDL	82
Figure 28 :	Spectres de masse de l'albumine (a), la pro-albumine (b) et l'Apo A-I (c et d) présentes au sein des pré β_1 HDL	83
Figure 29 :	Concentration en Apo A-I des HDL plasmatiques et chyleuses en fonction des fractions éluées après FPLC	114
Figure 30 :	Electrophorèse bidimensionnelle du plasma et du chyle après révélation avec un anticorps anti-Apo A-I	115
Figure 31 :	Concentrations en cholestérol, triglycérides, phospholipides et Apo B du plasma et du chyle d'une patiente présentant un chylothorax en fonction du volume d'éluion en sortie de FPLC	115
Figure 32 :	Représentation schématique du conduit thoracique	116
Figure 33 :	Protocole expérimental du marquage endogène de l'Apo A-I des HDL à jeun et à l'état nourri	117
Figure 34 :	Courbes d'enrichissement en d_3 -leucine de l'Apo B100 des VLDL à jeun et à l'état nourri	121
Figure 35 :	Courbe d'enrichissement en d_3 -leucine de l'Apo B48 des TRL	121
Figure 36 :	Courbes d'enrichissement en d_3 -leucine de l'Apo A-I des pré β_1 HDL à jeun et à l'état nourri	123
Figure 37 :	Courbes d'enrichissement en d_3 -leucine de l'Apo A-I des α HDL à jeun et à l'état nourri	123
Figure 38 :	Courbes d'enrichissement en d_3 -leucine de l'Apo A-I des TRL à l'état nourri	123

Figure 39 :	Bilan des courbes d'enrichissement en d_3 -leucine de l'Apo A-I au niveau des TRL, des pré β_1 HDL et des α HDL à l'état nourri	124
Figure 40 :	(a) Modèle simple pour l'étude à l'état de jeune (b) Modèle à double entrée forcée pour l'étude à l'état nourri	125
Figure 41 :	Modèle de Vélez-Carrasco <i>et al.</i>	125
Figure 42 :	Modèle compartimental du métabolisme de l'Apo A-I à l'état de nourri	126
Figure 43 :	Données cinétiques du métabolisme de l'Apo A-I à jeun et à l'état nourri – modèle complexe	127
Figure 44	Valeurs d'enrichissement de l'Apo A-I des TRL, pré β_1 HDL et α HDL pour un patient représentatif. Les lignes représentent les fits obtenus avec le modèle.	127
Figure 45	Données cinétiques de l'Apo A-I des TRL et des α HDL – modèle simple étude sous 14h de cinétique. Valeurs d'enrichissement de l'Apo A-I des TRL, et α HDL pour un patient représentatif. Les lignes représentent les fits obtenus avec le modèle.	128
Figure 46	Valeurs d'enrichissement de l'Apo A-I des TRL, et α HDL pour un patient représentatif - modèle simple étude sous 96h de cinétique. Les lignes représentent les fits obtenus avec le modèle.	129
Figure 47 :	Données cinétiques, valeurs d'enrichissement et fits de l'Apo A-I des TRL et des HDL par Vélez-Carrasco <i>et al.</i> (Vélez-Carrasco W. et al. 1999)	132
Figure 48 :	Protocole expérimental du double marquage endogène de l'Apo A-I des HDL à jeun et à l'état nourri	136
Figure 49 :	Composition du glutamate, de la glutamine et du DABA	137
Figure 50 :	Courbes d'enrichissement en ^{13}C -Glutamate au niveau du plasma à l'état à jeun	138

Les maladies cardio-vasculaires liées à l'athérosclérose représentent la première cause de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés. L'athérosclérose a une origine multifactorielle et les anomalies du métabolisme des lipoprotéines constituent l'un des éléments contribuant à son développement. De nombreuses études ont montré qu'il existe une corrélation négative entre le risque athéromateux et la concentration en cholestérol dans les lipoprotéines de haute densité (HDL), suggérant ainsi un rôle protecteur des HDL qui peut s'expliquer par leur forte implication dans le retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, appelé transport inverse du cholestérol. En effet, l'élimination en acides biliaires par le foie du cholestérol en excès implique un ensemble de processus complexes comportant plusieurs étapes au cours desquelles les HDL exercent des fonctions importantes. La première est une étape clé qui consiste en la prise en charge du cholestérol libre des tissus périphériques par les pré β_1 HDL. A la surface de ces lipoprotéines dites précurseurs, le cholestérol libre subit une estérification ; processus au cours duquel les pré β_1 HDL sont maturées en α HDL. Puis le cholestérol estérifié peut être ensuite capté de façon sélective ou transféré aux VLDL et LDL. Au cours de ces différents processus, les α HDL sont recyclées en pré β_1 HDL.

Les VLDL et les LDL sont alors captées par le foie par des récepteurs spécifiques. Néanmoins, les LDL transportent aussi le cholestérol du foie vers les tissus périphériques et leur accumulation est considérée comme athérogène.

Bien que la mesure du LDL et du HDL-cholestérol ait amélioré la définition du risque d'athérosclérose, le contenu des lipoprotéines en apolipoprotéines doit être également considéré. En particulier, la concentration en apolipoprotéine A-I (Apo A-I), composant protéique majeur des HDL, apparaît plus élevée chez des sujets sains que des patients coronariens. De même, il existe une corrélation inverse entre la concentration d'Apo A-I et le risque cardiovasculaire.

En tout état de cause, on ne peut appréhender le degré pathologique d'un patient à l'examen de son bilan lipidique exclusivement. Afin de cerner le métabolisme d'une particule, les investigations cinétiques, de part leur caractère dynamique, constituent un outil privilégié. En effet, elles renseignent sur la production, le catabolisme et les taux de conversion d'une particule étudiée au cours du temps. Depuis une vingtaine d'années, l'utilisation d'isotopes stables et le développement de la spectrométrie de masse sont à l'origine de réels progrès dans les connaissances physiologiques. Ces techniques donnent l'accès à un élargissement de l'exploration du métabolisme des lipoprotéines chez l'homme *in vivo*, puisque les restrictions éthiques sont beaucoup moins importantes qu'avec les radioisotopes. A ce jour, la plupart de ces études utilisent les techniques d'ultracentrifugation pour séparer les lipoprotéines et par

conséquence étudient le métabolisme des HDL₂ et HDL₃ ou encore appelées α HDL (les pré β ₁ HDL étant perdues lors de l'ultracentrifugation).

L'objectif de ce travail était de développer une technique permettant l'exploration du métabolisme des pré β ₁ HDL et des α HDL après un marquage endogène de Apo A-I des HDL par un isotope stable. Les sous fractions de HDL ont ainsi été séparées par FPLC. Cette démarche a abouti au développement d'un modèle multicompartimental prenant en compte les différents processus impliqués dans le métabolisme des sous populations de HDL lors du transport inverse du cholestérol chez l'homme.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au diabète de type II, qui est souvent associé chez l'homme à une obésité et à un profil lipidique défavorable comprenant des niveaux élevés de triglycérides et des concentrations faibles de HDL-cholestérol et d'Apo A-I de même que la présence de particules LDL petites et denses. Suivant la même dynamique que précédemment, les répercussions de cette pathologie sur les paramètres cinétiques du métabolisme des pré β ₁ HDL et des α HDL ont été analysées.

Le dernier volet de notre travail était d'étudier le métabolisme des pré β ₁ HDL et des α HDL à jeun et à l'état nourri dans le but d'estimer une possible contribution de l'intestin dans la synthèse de l'Apo A-I.

II. Les lipoprotéines de haute densité

I-1 Introduction : généralité sur les lipoprotéines

Les lipides constituent une famille hétérogène de molécules hydrophobes, insolubles dans les milieux biologiques aqueux. Les principaux composés lipidiques (cholestérol non-estérifié, ester de cholestérol, triglycérides et phospholipides) ne peuvent circuler sous forme monomérique libre. Pour passer des lieux de synthèse et d'absorption vers des lieux de stockage, d'utilisation et d'élimination, les lipides sont véhiculés à travers les divers compartiments extracellulaires de l'organisme (plasma, lymphe et liquide interstitiel) au sein d'édifices macromoléculaires complexes : les lipoprotéines. Ces microémulsions sont sphériques et composées d'un centre hydrophobe associant des triglycérides et des esters de cholestérol et d'une couche externe hydrophile formée de phospholipides, cholestérol libre et d'apolipoprotéines (Figure 1) (Brewer H.B., 1981).

Les apolipoprotéines, constituants protéiques des lipoprotéines, jouent un rôle structural et stabilisateur essentiel. Elles permettent la solubilisation et le transport des lipides, assurent un rôle de co-facteur des enzymes et/ou de ligand de récepteur intervenant dans le métabolisme des lipoprotéines.

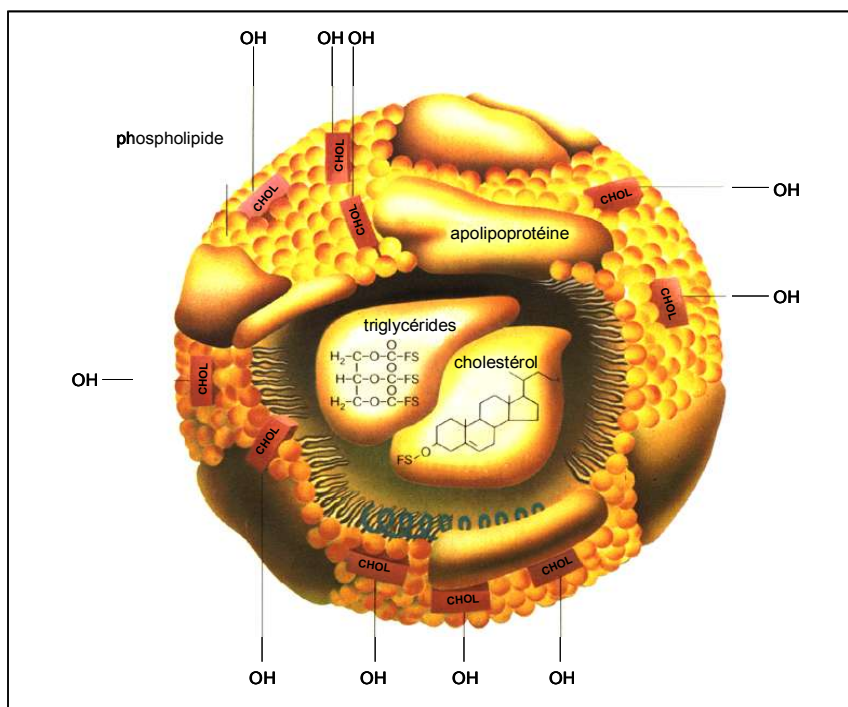


Figure 1 : Représentation schématique d'une lipoprotéine (d'après Brewer et al., 1981)

On peut séparer les lipoprotéines en se basant sur leurs caractéristiques physicochimiques, comme leur densité à l'aide d'ultracentrifugations, leur mobilité électrophorétique, leur taille

grâce à des systèmes de gel filtration comme la FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) ou encore leur composition en lipides et apolipoprotéines. On distingue cinq classes de lipoprotéines : les chylomicrons, les VLDL (lipoprotéines de très basse densité), les IDL (lipoprotéines de densité intermédiaire), les LDL (lipoprotéines de basse densité) et les HDL (lipoprotéines de haute densité). Les caractéristiques physico-chimiques de ces différentes lipoprotéines sont détaillées dans le tableau 1 (Gotto et al., 1986).

Classe de lipoprotéines	Densité (g/l)	Mobilité électrophorétique	Diamètre (nm)	Apolipoprotéines principales	Poids moléculaire	Composition (% masse) P/PL/CL/CE/TG
Chylomicrons	0.93	Origine	75-1200	A-I, B48, C, E	400 000 000	2/5/1/2/90
VLDL	0.93-1.006	pré β	30-80	B100, C, E	10 – 80 000 000	10/16/7/13/54
IDL	1.006-1.019	pré β - β	25-35	B100, E	5 – 10 000 000	17/20/9/34/20
LDL	1.019-1.063	β	18-25	B100	2 300 000	23/21/11/41/4
HDL ²	1.063-1.125	α	9-12	A-I	360 000	42/35/5/13/5
HDL ³	1.125-1.21	α	5-9	A-I, A-II	175 000	56/23/3/15/3
Pré β ¹ HDL	1.21-1.25	Pré β	5-6	A-I	70 000	91/6.5/0.5/2/0

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des lipoprotéines (d'après Gotto *et al.*, 1986)

Du point de vue fonctionnel, les chylomicrons transportent les lipides alimentaires de l'intestin dans la circulation générale. Constitués à 90% de TG, ces lipoprotéines sont de véritables émulsions lipidiques qui confèrent au plasma un caractère lactescent postprandial. Les VLDL, IDL et LDL sont les constituants majeurs du transport des graisses endogènes dont les TG et le cholestérol entre le foie et les tissus périphériques (Breslow J.L., 1993). Les VLDL sont sécrétées essentiellement par le foie. Les triglycérides des VLDL sont hydrolysés par la LPL (Lipoprotéine Lipase), avec l'aide de son cofacteur l'Apo C-II, donnant naissance aux IDL. Une partie de ces particules peut être éliminée du plasma en se liant aux récepteurs hépatiques des LDL via l'Apo E. L'autre partie des IDL, qui échappent à cette clearance, est hydrolysée par la HL (Lipase Hépatique) formant des LDL, particules riches en cholestérol et en Apo B100, protéine qui sert ensuite de ligand aux récepteurs hépatiques des LDL.

Lors de situations pathologiques, les LDL sont susceptibles de passer la barrière endothéliale où elles subissent une oxydation. Ce phénomène va avoir un effet chimiotactique sur des cellules macrophagiques permettant la captation puis la dégradation des LDL

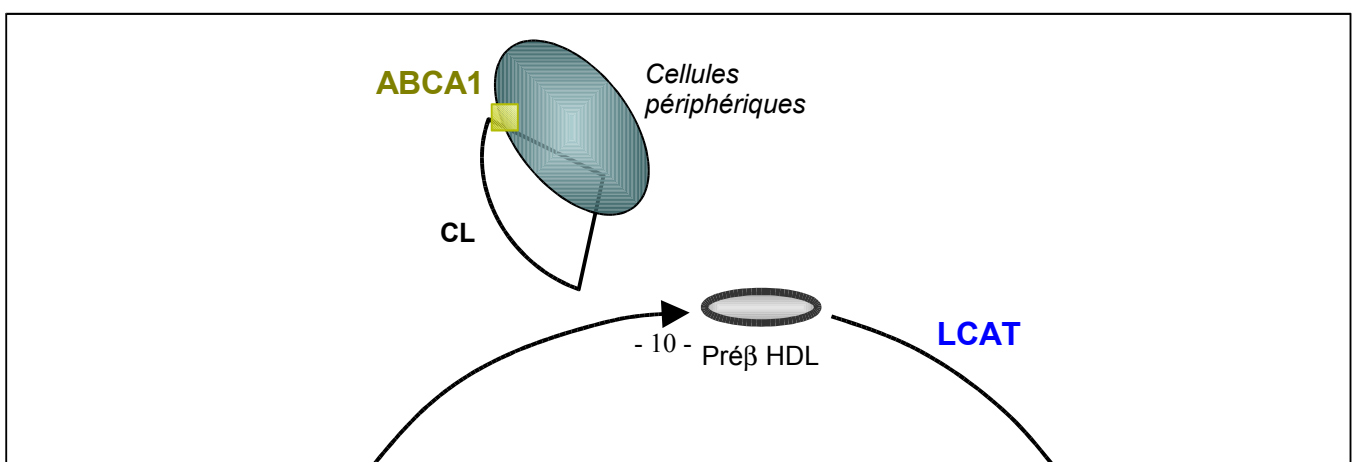
modifiées. Ces cellules, gorgées de lipides oxydés, deviennent spumeuses et vont former des dépôts cellulaires le long des parois vasculaires : des plaques athéromateuses. Les LDL sont dites athérogènes. Au contraire, les HDL présentent des propriétés anti-athérogènes en assurant notamment le transport reverse du cholestérol vers le foie.

I-2 Les acteurs du métabolisme des HDL

Les HDL jouent un rôle clé dans le transport reverse du cholestérol, processus métabolique qui permet le retour du cholestérol excédentaire des cellules périphériques au foie pour y subir son catabolisme (Figure 2). De manière très concrète, lors de ce transport, l'efflux du cholestérol des cellules périphériques vers les pré β HDL est en partie assuré par l'ABCA1 (ATP Binding Cassette de sous classe A 1). Le cholestérol va ensuite passer des pré β HDL aux α HDL tout en étant estérifié par la LCAT (lecithin cholesterol acyl transferase). A ce stade, la CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) peut induire un transfert du cholestérol estérifié des α HDL vers les VLDL et LDL en échange de triglycérides donnant naissance ainsi aux HDL₂-TG. Parallèlement la PLTP (Phospholipides Transfer Protein) permet le transfert des phospholipides entre les HDL et les VLDL. L'hydrolyse des HDL-TG par la HL (Hepatic Lipase) donne lieu à la formation d'une part de particules d'Apo A-I pauvres en lipides et d'autre part de remnants HDL₂, particules constituées à majorité de cholestérol estérifié rapidement capté par le foie. Ce dernier processus représente une captation sélective des esters de cholestérol et est assuré par la protéine SR-BI (Scavenger Receptor Class B Type I).

Au niveau du foie, le cholestérol est soit recyclé, soit excrété dans la bile principalement sous forme d'acides biliaires. Finalement, il est probablement nécessaire que les concentrations des pré β et des α HDL soient en parfait équilibre dynamique afin de réaliser un transport reverse du cholestérol idéal.

Dans un premier temps, nous allons nous attarder sur les différents acteurs du métabolisme des HDL : l'Apo A-I, les enzymes ou protéines de transport clés.



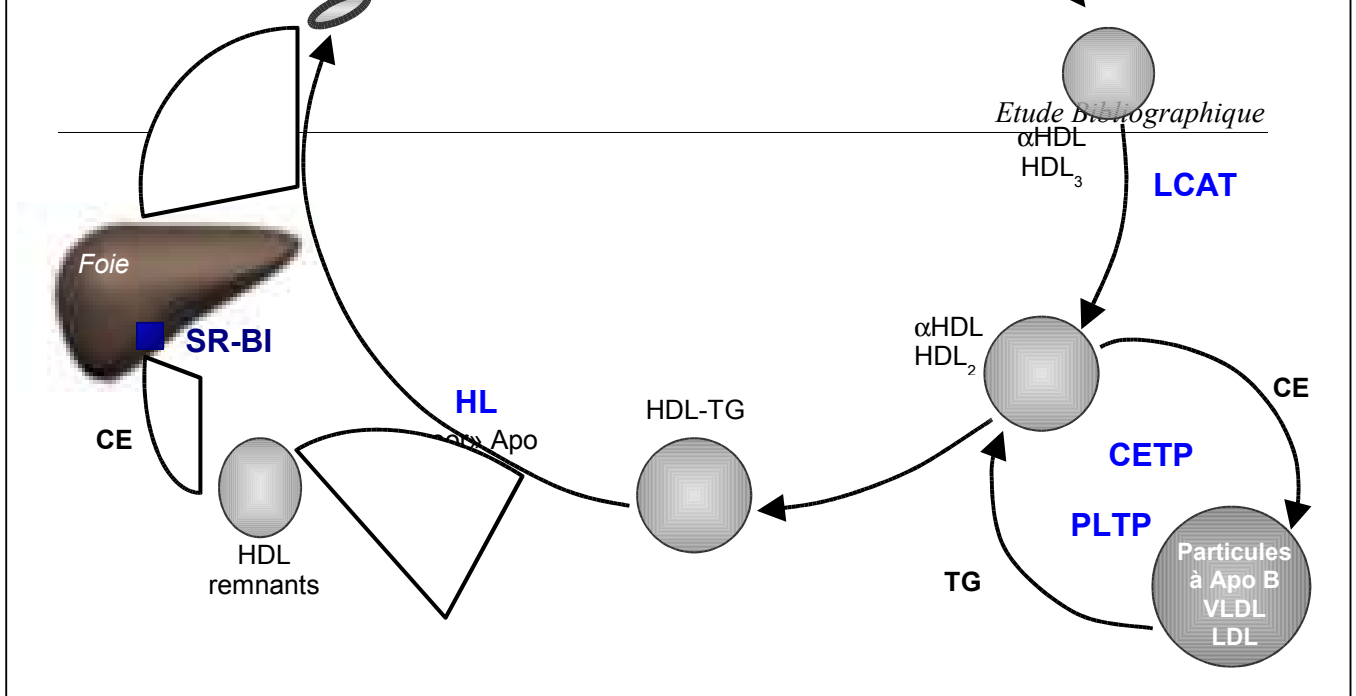


Figure 2 : HDL et transport reverse du cholestérol

I-2-1 Hétérogénéité des HDL

Les HDL représentent des fractions hétérogènes (Figure 3) au niveau du plasma humain et peuvent être séparées à l'aide de diverses méthodes en fonction de leur propriété physico-chimique :

- Par microscopie électronique, les HDL apparaissent sphériques ou discoïdales, bien que la majorité soit sphérique.
- L'hétérogénéité des HDL peut aussi être basée sur leur charge. Par séparation sur gel électrophorétique d'agarose, les HDL peuvent avoir deux migrations majeures soit en position alpha (α), soit en position prébeta (pré β). Les particules qui migrent en position α (α HDL) sont sphériques et majoritaires au niveau du plasma. Les α HDL incluent les HDL₂ et HDL₃ ou autrement dit les HDL matures. Les HDL qui migrent en position pré β (pré β HDL) sont elles discoïdales, dites précurseurs des HDL et regroupent les pré β ₁, pré β ₂ et pré β ₃ HDL. Une population mineure de gamma HDL ont

aussi été décrites, ces particules discoïdales contiendraient de l'Apo E et des phospholipides.

- Quand les HDL sont séparées par ultracentrifugation en fonction de leur densité, deux sous fractions majeures peuvent être isolées : les HDL₂ ($1,063 < d < 1,125$ g/ml) et les HDL₃ ($1,125 < d < 1,21$ g/ml) (Havel R.J. et al., 1955; Chapman et al., 1981). Après ultracentrifugation, les particules pré β ces particules sont retrouvées à des densités supérieures à 1,21 g/ml, indiquant leur perte de la masse des HDL.

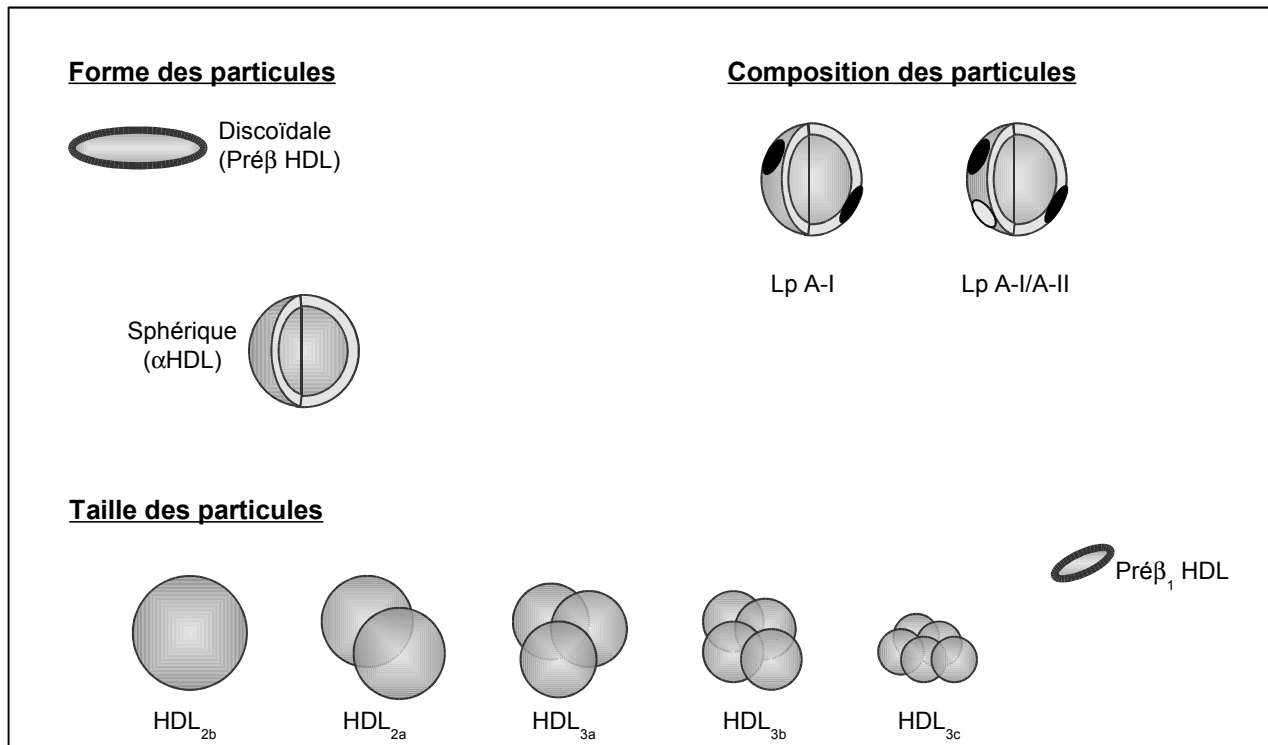


Figure 3 : Hétérogénéité des HDL humaines

- Les électrophorèses bi-dimensionnelles en condition non dénaturantes sont aussi très souvent utilisées pour séparer les sous populations de HDL. Cette technique permet de séparer les particules en fonction de leur charge sur des gels d'agarose dans un premier temps ; puis sur une deuxième dimension en fonction de leur taille sur des gels de polyacrylamide. Pour les HDL matures, cinq sous fractions distinctes peuvent être identifiées. Dans l'ordre de taille décroissante, on observe les HDL_{2b} (diamètre moyen 10,6 nm), les HDL_{2a} (9,2 nm), les HDL_{3a} (8,4 nm), les HDL_{3b} (8 nm) et les HDL_{3c} (7,6 nm). Les HDL_{2a} et HDL_{2b} rentrant dans la gamme de densité des HDL₂ et les HDL_{3a}, HDL_{3b} et HDL_{3c} dans la gamme des HDL₃ (Blanche P.J. et al., 1981). Pour les précurseur des HDL, on distingue les pré β _{1a} et pré β _{1b} HDL (5,79 nm et 5,38 nm,

respectivement) et pré β_{2a} , pré β_{2b} et pré β_{2c} HDL (13,74 nm, 12,85 nm et 12,17 nm, respectivement) (Asztalos B.F. et al., 1993).

- Les HDL peuvent aussi être identifiées sous la forme de deux sous populations en fonction de leur composition en lipoprotéines : l'une prenant en compte les HDL qui contiennent l'Apo A-I mais pas d'Apo A-II (Lp A-I) et l'autre les particules contenant l'Apo A-I et l'Apo A-II (Lp A-I/A-II). Alors que l'Apo A-I dans les HDL est distribuée de manière à peu près égale entre les Lp A-I et les Lp A-I/A-II, plus de 90% de l'Apo A-II constitue les Lp A-I/A-II. Il existe une classe mineure de HDL qui contient l'Apo A-II mais pas d'Apo A-I (A-II HDL).

I-2-2 L'apolipoprotéine A-I

➤ Données physico-chimiques

L'Apo A-I est la principale apolipoprotéine des HDL puisqu'elle constitue environ 65% de la masse protéique totale. Sa concentration plasmatique moyenne reportée chez l'homme est de 1.2 à 1.8 g/l. La forme originelle de cette protéine est un précurseur de 267 acides aminés, la pré-pro-Apo A-I, constitué de l'Apo A-I mature avec une extension de 24 acides aminés du côté N-terminal. Il se produit ensuite un clivage de 18 de ces résidus de façon co-translationnelle, permettant la libération dans la circulation de la pro-Apo A-I, composé donc de 249 acides aminés. Puis la pro-Apo A-I subit une transformation protéolytique rapide intraplasmique, qui donne naissance à l'Apo A-I mature, suite à la libération du côté N-terminal de 6 acides aminés sous l'action d'une enzyme de clivage métallo-dépendante qui serait sécrétée par le foie.

L'Apo A-I mature est un monomère de 243 acides aminés, sa masse moléculaire est de 28331 Da. L'étude de sa structure quaternaire met en évidence des unités répétitives de 22 acides aminés qui confèrent à l'Apo A-I des domaines α -hélicoïdaux. Ces structures sont des hélices amphiphiles qui jouent un rôle important dans l'association de l'Apo A-I aux lipides.

La population d'Apo A-I est composée d'une série d'isoprotéines notées le plus couramment Apo A-I₁ à Apo A-I₅. Ces molécules ont le même poids moléculaire mais possèdent des points isoélectriques différents (Nestruck et al., 1980). Cette propriété permet leur différenciation par isoélectrofocalisation. La pro-Apo A-I correspondrait à l'isoforme A-I₁. Les différentes isoformes matures présentes dans le plasma seraient les Apo A-I₃, Apo A-I₄, Apo A-I₅ et représenteraient 95% de l'Apo A-I circulante, dont 80% pour l'Apo A-I₃. Un concept de processus non-enzymatique de déamidation au niveau de l'Apo A-I₃ à l'origine de

la formation d'isoprotéines matures plus acides (Apo A-I₄ et Apo A-I₅) a été développée (Ghiselli G. et al., 1985).

➤ **Polymorphisme de l'Apo A-I**

L'Apo A-I est codée par le gène cluster Apo A-I – C-III – Apo A-IV (15 Kb) situé sur le bras long du chromosome 11 (région 23q24) ; ce gène est exprimé au niveau du foie et de l'intestin ce qui conduit à une double synthèse distincte de l'Apo A-I d'origine hépatique et intestinale (Calandra S. et Tarugi P., 1993). Le gène C-III est transcrit dans le sens opposé des deux autres. Le gène de l'Apo A-I (1.8 Kb) présente des polymorphismes qui sont corrélés aux taux plasmatiques des lipides (triglycérides et cholestérol) et aux lipoprotéines (HDL) (Groenendijk M. et al., 2001). On dénombre quatre polymorphismes différents : Msp I, Xmn I, Pst I et Sst I (figure 4).

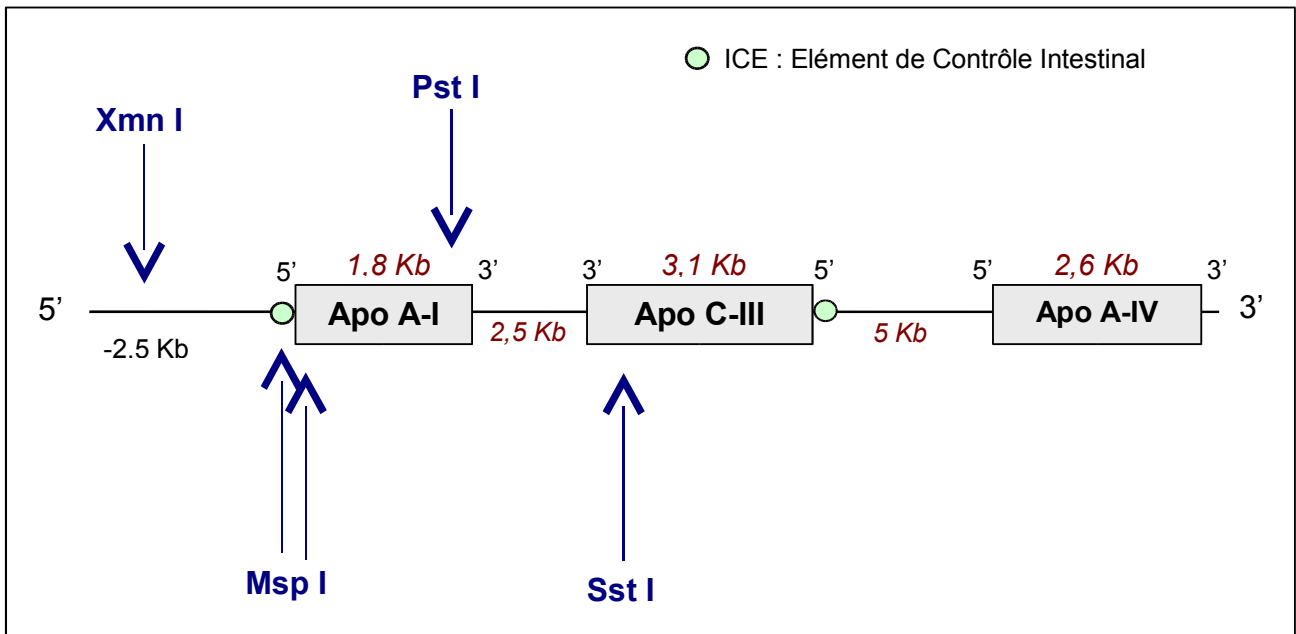


Figure 4: Gène cluster Apo A-I – C-III – A-IV
Localisation des différents polymorphismes du gène de l'Apo A-I

Pour Msp I, deux substitutions sont décrites. La première M1 (G en A, -75 pb) se situe dans la région promotrice du gène de l'Apo A-I et apparaît à une fréquence de 20%. Il semblerait que cet A-allèle induisent une augmentation de la synthèse de l'Apo A-I par un effet direct sur la transcription du gène (Kamboh M.I. et al., 1996). Ensuite une double substitution M2 en + 83 pb (C en T) et à + 84 pb (G en A) peut se produire en même temps ou indépendamment. Cette situation beaucoup plus rare (4%) semble pourtant avoir un effet bénéfique plus important sur les taux en HDL-C (Wang X.L. et al., 1996).

Le site de restriction Xmn I est situé à 2.5 Kb en amont du gène de l'Apo A-I et est caractérisé par une substitution C en T. L'allèle X1 est cité en absence du site et l'allèle X2 en sa présence. Ce dernier, rare, est significativement associé à des taux plasmatiques en triglycérides élevés (Durack-Brown I. et al., 1994).

Pour Pst I, le site de restriction est localisé à la fin du gène de l'Apo A-I. On parle de P1 et P2 en présence ou en absence du site, respectivement. La présence du site Pst I a été décrite comme étant associée aux maladies cardiovasculaires et aux hypertriglycéridémies.

Le polymorphisme Sst I est situé dans la région non codante de l'exon 4 du gène de l'Apo C-III. Les allèles sont définis par S1 et S2, respectivement en absence et en présence du site de restriction. L'allèle S2, rare, est associé avec une hypertriglycéridémie, une élévation du taux d'Apo C-III et une réduction du taux d'HDL-C (Oppert JM. et al., 1992; Dallinge-Thie G.M. et al., 1996).

➤ Régulation de l'expression de l'Apo A-I

Le taux plasmatique de HDL est positivement corrélé avec la concentration plasmatique en Apo A-I. Des stimuli physiologiques, pharmacologiques et nutritionnels peuvent moduler les concentrations en Apo A-I et par conséquent celles en HDL. Leur action sur l'expression du gène de l'Apo A-I a été démontrée aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, les quelques exemples qui suivent permettent de l'illustrer.

Un excès d'hormones thyroïdiennes est associé à une augmentation de la concentration plasmatique en Apo A-I qui est elle-même en relation avec un taux d'ARNm élevé, conséquence d'une augmentation de la stabilité de ces ARNm (Vandenbrouck et al., 1995). A l'inverse, des rats, qui ont subi une thyroïdectomie, présentent une réduction de l'Apo A-I (~23%) suite à une baisse accrue de son taux de synthèse (Hesca-Gomez C. et al., 2002).

L'administration d'estrogènes conduit à une augmentation de la concentration en Apo A-I. Ces hormones permettent l'activation du promoteur de l'Apo A-I entraînant une augmentation

du taux d'ARNm et de la sécrétion de la protéine (Zhang X. et al., 2001; Lamon-Fava S. et Micherone D., 2004).

Les glucocorticoïdes modulent le taux des HDL *in vivo* et *in vitro*. La stimulation de la concentration de l'Apo A-I par ces hormones passe par une augmentation du taux des ARNm suggérant une possible régulation transcriptionnelle (O'Kane M.J. et al., 1992).

Des études sur les souris *ob/ob*, qui présentent une mutation anti-sens du gène de la leptine, sont caractérisées par une réduction du taux d'ARNm de l'Apo A-I. Un traitement avec des faibles doses de leptine restaure le taux d'ARNm tout en stimulant le turnover des HDL (Silver D.L. et al., 1999).

Les fibrates et les rétinoïdes ont une action commune au niveau de l'activation de la synthèse de l'Apo A-I en se fixant chacun sur des facteurs de transcription les PPAR (récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes) et RXR (récepteur aux rétinoïdes), respectivement (Staels B. et Auwerx J., 1998).

I-2-3 Les autres apolipoprotéines

➤ L'apolipoprotéine A-II

L'Apo A-II est la seconde protéine majeure des HDL, représentant 25% de la masse protéique. Sa concentration plasmatique moyenne est de 0.3 à 0.5 g/l. L'Apo A-II mature, d'environ 17000 Da de masse moléculaire, est un dimère composé de deux chaîne polypeptidique de 77 résidus chacune, liées par des ponts disulfure entre les résidus cystéine situés en position 6. Cette dimérisation pourrait jouer un rôle essentiel dans sa fonction. L'Apo A-II possède une grande affinité pour les lipides grâce à sa structure amphiphile. Chez l'homme l'Apo A-II est synthétisée par le foie sous la forme d'une pré-pro-Apo A-II de 100 acides aminés. Un peptide de 18 acides aminés du côté N-terminal est clivé de façon co-translationnelle pour donner la pro-Apo A-II. Puis un segment de 5 acides aminés du côté N-terminal est ensuite clivé dans le plasma pour libérer l'Apo A-II mature.

Le Tableau 2 récapitule les principales apolipoprotéines ainsi que leur caractéristique et fonction.

Nom	PM (Da)	Concentration plasmatique (g/l)	Expression tissulaire	Distribution plasmatique	Fonction
Apo A-I	28	0,8-1,6	Foie, intestin	HDL, Chylomicrons	Structurelle ; activateur de la LCAT ; efflux du cholestérol
Apo A-II	17	0,3-0,5	Foie (intestin)	HDL	Structurelle ; activateur / inhibiteur de la HL ; efflux du cholestérol
Apo A-IV	46	0,13-0,23	Foie, intestin	HDL, Chylomicrons	Activateur de la LCAT ; métabolisme des lipoprotéines riches en TG
Apo A-V	-	-	Foie		Métabolisme des triglycérides
Apo B100	549	0,6-1,2	Foie	VLDL, IDL, LDL	Structurelle ; synthèse et sécrétion des VLDL, ligand du LDL-récepteur
Apo B48	265	<0.05	Intestin	chylomicrons	Structurelle ; synthèse et sécrétion des chylomicrons, ligand du récepteur à l'Apo B48
Apo C-I	6,6	0,03-0,11	Foie (intestin)	HDL	Inhibiteur de la CETP ; activateur de la LCAT ; inhibiteur de la liaison aux LDL- R, LRP et VLDL-R
Apo C-II	8,9	0,01-0,07	Foie (intestin)	Chylomicrons, VLDL, HDL	Activateur de la LPL
Apo C-III	8,8	0,03-0,23	Foie (intestin)	Chylomicrons, VLDL, HDL	Inhibiteur de la LPL ; inhibiteur de la captation hépatique des lipoprotéines riches en TG
Apo D	19	0,06-0,07	Foie, intestin, rate, pancréas, cerveau, surrénales, rein	HDL, LDL, VLDL	Transport reverse du cholestérol (?)
Apo E	34,1	0,03-0,06	Foie, macrophage, cerveau	Chylomicrons, VLDL, IDL, HDL	Ligand des récepteurs LDL-R et LRP
Apo F	70	< 0,05	Foie	LDL (VLDL, HDL)	Inhibiteur de la CETP

Tableau 2 : Identité, expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines humaines

I-2-4 Les enzymes et protéines de transfert intervenant dans le métabolisme des HDL

Les HDL subissent des modifications physiologiques dans la circulation sanguines. Ces phénomènes de maturation sont induits par l'action de protéines assurant le transfert de lipides entre les lipoparticules ou par l'action d'enzymes agissant là aussi au niveau des lipides. Leurs caractéristiques ainsi que leurs fonctions sont décrites ci-dessous.

➤ *La LCAT : « Lecithin : Cholesterol Acyl Transferase »*

La lecithin : cholesterol acyl transferase (LCAT) est une glycoprotéine plasmatique de 416 acides aminés dont la masse moléculaire est de 47 kDa. Principalement synthétisée au niveau du foie, sa concentration plasmatique est de 6 mg/l et son gène est localisé au niveau du chromosome 16 (région 16q22) (Jonas A., 2000). Cette protéine majeure est responsable de l'estérification du cholestérol libre présent dans les lipoprotéines plasmatiques. Cette enzyme catalyse le transfert d'un groupement acyl de la phosphatidylcholine (lécithine) vers le cholestérol, générant du cholestérol estérifié et de la lysolécithine. Cette protéine est une enzyme clé dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol et la régulation de son transport dans le sang, la plupart du cholestérol circulant sous forme d'esters est générée par la LCAT.

Cette réaction a lieu à la surface des HDL, son meilleur substrat lipoprotéique. La LCAT s'associe de manière réversible aux HDL circulantes, dont l'Apo A-I est le co-facteur. Son action peut aussi être stimulée par les apo E, A-IV et C-I mais avec une efficacité moindre que l'Apo A-I. Les HDL discoïdales ou pré β_1 HDL représentent un substrat privilégié par rapport aux HDL sphériques ou α HDL et les petites HDL sphériques sont elles même des substrats privilégiés par rapport aux HDL sphériques plus larges. Son activité participe à la constitution du noyau lipidique hydrophobe, riche en esters de cholestérol, transformant les pré β HDL en α HDL (Schmitz G. et al., 1981).

Ainsi la LCAT participe activement au remodelage des HDL et à leur maturation. L'importance de cette enzyme dans la génération des α HDL a été mise en évidence grâce aux mutations de son gène, comme c'est le cas lors d'une déficience familiale en LCAT ou lors de la maladie des yeux de poissons (Fish-eye disease). Sous ces deux conditions, un défaut d'estérification du cholestérol des HDL et une absence des HDL matures sont observées.

Comme pour ces patients, les souris LCAT-KO sont caractérisées par une réduction de la concentration en HDL et en Apo A-I et par une augmentation du taux de triglycérides. Le profil des HDL révèle une diminution des α HDL et une augmentation des pré β HDL (Santamarina-Fojo S. et al., 2000). A l'inverse, la surexpression du gène dans des modèles animaux élève des HDL, riches en cholestérol estérifié mais très mal épurées du fait de leur modification de structure (Peelman F. et al., 2000; Santamarina-Fojo S. et al., 2000).

➤ ***La HL : « Hepatic Lipase »***

La HL est une glycoprotéine de 65 kDa synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique. La HL présente 4 sites de glycosylation. Son gène de 60 kb est localisé au niveau du bras long du chromosome 15 (15q22) et comporte 8 introns et 9 exons de 1,6 kb codant pour un peptide signal de 23 acides aminés (perdu lors de son passage au travers la membrane du réticulum endoplasmique) et une protéine de 476 acides aminés (Thuren T., 2000). La HL est liée fortement aux cellules endothéliales hépatiques grâce aux héparanes sulfates des protéoglycanes membranaires. Cette fixation protège l'enzyme d'une dégradation rapide. Cette enzyme est aussi présente au niveau des surrénales et des ovaires où elle permet la distribution du cholestérol pour la stéroïdogénèse.

Du point de vue fonctionnel, la HL hydrolyse les triglycérides et les phospholipides de toutes les lipoprotéines. La HL hydrolyse les triglycérides des chylomicrons remnants et des IDL, ce qui conduit à leur recaptage plus efficace et à la génération des LDL. La HL permet aussi de générer à partir des LDL circulantes des LDL plus petites et plus denses. En ce qui concerne les HDL, la HL hydrolyse les triglycérides et les phospholipides essentiellement au niveau des HDL₂. La HL induit ainsi la formation des pré β ₁ HDL à partir des HDL₂ riches en triglycérides (Barrans A. et al., 1994). Les effets de la HL sur le métabolisme des HDL semblent être partiellement inhibés par l'Apo A II (Calabresi L. et al., 1996).

Pour sa régulation, l'activité de la HL est plus basse chez les femmes pré-ménopausées que chez les hommes, mais est augmentée après la ménopause. Les estrogènes inhibent l'activité de la HL alors que les androgènes l'activent. De plus, l'activité de la HL est stimulée de manière spectaculaire par l'héparine qui permet le relargage de l'enzyme à la surface cellulaire, mais aussi après une incubation prolongée, en stimulant 5 à 8 fois son activité.

L'héparine semble stabiliser l'enzyme, qui va donc échapper à une endocytose puis à une dégradation rapide (Perret B. et al., 2002).

Chez l'homme, une déficience en HL se caractérise par une hypercholestérolémie et une hypertriglycéridémie avec une accumulation de VLDL remnants et une augmentation du cholestérol et de phospholipides dans le plasma. Mais il a été montré récemment que les patients atteints par cette déficience complète en HL présentent des taux de pré β HDL et d'efflux du cholestérol normaux (Ruel I.L. et al., 2004). Chez les souris, cette déficience s'accompagne aussi d'une réduction de la captation sélective du cholestérol estérifié par le foie (Lambert G. et al., 2000). A l'inverse une surexpression de la HL humaine chez la souris s'accompagne d'une réduction de la cholestérolémie et la triglycéridémie, en diminuant d'une part la taille des HDL et d'autre part les concentrations des IDL et des LDL dans la circulation (Santamarina-Fojo S. et al., 1998).

➤ ***La CETP : « Cholesteryl Ester Transfer Protein »***

La CETP est une glycoprotéine plasmatique de 74 kDa comprenant 476 acides aminés dont le gène est localisé au niveau du bras long du chromosome 16 (12q21) (Agellon L.B. et al., 1990) et qui est synthétisée dans divers tissus tels que les tissus hépatique, adipeux, intestinal, splénique, rénal et surrénal. Cette protéine redistribue le cholestérol estérifié et les triglycérides entre les différentes lipoprotéines. L'effet net de ce transfert est que le cholestérol estérifié synthétisé dans les HDL par la LCAT est transféré aux VLDL et LDL, et les triglycérides sont transférés dans le sens opposé, des VLDL vers les HDL (Inazu A. et al., 2000). La plupart de la CETP dans le plasma est liée à la surface des HDL et est responsable du remodelage des HDL.

Le taux de CETP est augmenté lors d'état de dyslipidémie caractérisée par des faible taux de HDL plasmatique, comme le diabète de type II, l'hypercholestérolémie et l'hyperlipémie familiale recombinée.

Une stimulation de l'activité de la CETP induit une diminution du rapport cholestérol/triglycérides des HDL. L'activité de la CETP est modulée par la composition lipidique des particules et est inhibée par la LTIP, « Lipid transfer inhibitor protein », présente sur les LDL. Cette dernière permettrait d'orienter préférentiellement l'action de la CETP entre les VLDL et les HDL (Morton R.E., 1999).

➤ ***La PLTP « Phospholipid Transfer Protein »***

La PLTP est synthétisée sous la forme d'une préprotéine de 493 acides aminés. La forme protéique glycosylée mature de 81 kDa. Le gène de la PLTP est localisé sur le chromosome 20 (Lagrost L. et al., 1998). Cette glycoprotéine permet le transfert de phospholipides entre les HDL et les autres lipoprotéines. Elle permettrait aussi le transfert de cholestérol estérifié entre les lipoprotéines plasmatiques.

Deux fonctions importantes sont décrites pour cette enzyme. Dans un premier temps, la PLTP est à l'origine du transfert de phospholipides des lipoprotéines riches en triglycérides vers les pré β HDL, accepteurs initiaux de cholestérol et les HDL2 riches en esters de cholestérol (Huuskonen J. et al., 2000). De plus, la PLTP joue un rôle important au niveau du remodelage des HDL. En effet la PLTP permet la formation, à partir de deux α HDL fusionnées, de deux lipoprotéines distinctes une particule α HDL large riche en cholestérol estérifié et une particule pré β ₁ HDL (Von Eckardstein A. et al., 1996).

L'activité de la PLTP semble être positivement liée au BMI et semble être augmentée chez les patients atteints d'un diabète de type II (Riemens et al., 1998).

La surexpression de cette protéine s'accompagne d'une baisse des HDL liée à une augmentation de la clearance des phospholipides et du cholestérol estérifié des HDL et de l'Apo A-I et à une augmentation de la formation des pré β ₁ HDL prêtes à capter le cholestérol des cellules et à amorcer son efflux lors du transport reverse du cholestérol.

➤ ***La LPL : « Lipoprotein Lipase »***

La LPL est d'une glycoprotéine de 65 kDa, dont le gène de 30 Kb (10 exons) est localisé sur le chromosome 8 et code pour une protéine de 475 acides aminés incluant un peptide signal de 27 acides aminés (Merkel M. et al., 2002). Cette protéine est synthétisée par les adipocytes et les cellules musculaires cardiaques et squelettiques. Cette enzyme est présente à la surface des cellules endothéliales où, liée aux héparanes sulfates des protéoglycanes, elle exerce son action lipolytique. On peut la retrouver substantiellement au niveau du cerveau, du placenta, des poumons, de la rate, des cellules β pancréatiques et des tissus stéroïdogènes (Preiss-Landl K. et al., 2002).

La LPL catalyse l'hydrolyse des triglycérides (et avec moins d'affinité celle des phospholipides) dans les chylomicrons et les VLDL. Cette action s'accompagne de la conversion de ces lipoprotéines riches en triglycérides en chylomicrons remnants, en IDL et en LDL. Cette hydrolyse résulte en la réduction de la taille des particules par conséquent en la

perte de composants de surface (phospholipides et apolipoprotéines) qui peuvent être transférés aux HDL (Santamarina-Fojo et Dugi, 1994). La LPL est l'enzyme majeure responsable de l'hydrolyse des triglycérides circulants libérant ainsi des acides gras destinés à être réestérifiés pour être stockés dans les cellules adipeuses ou à fournir l'énergie aux cellules musculaires ou cardiaques. Cette hydrolyse est activée par l'Apo CII et est inhibée par l'Apo CIII (Ginsberg et al., 1986).

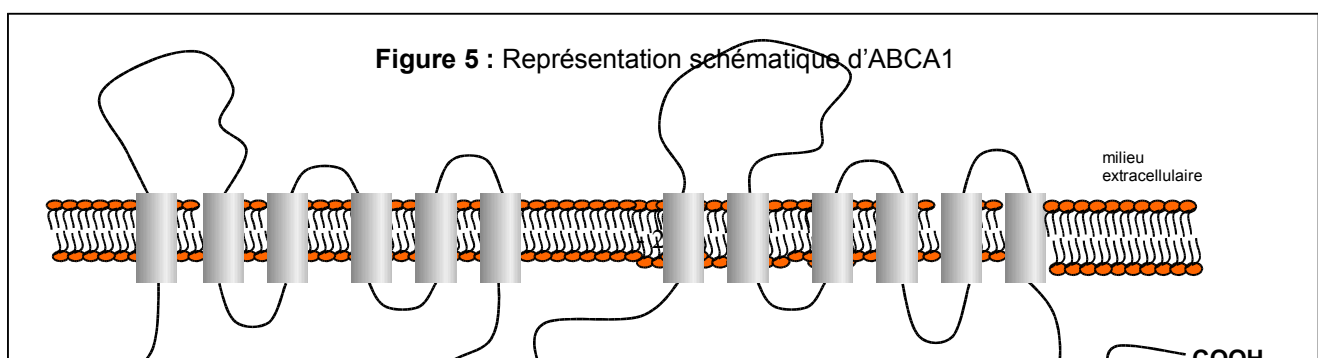
Un paradoxe existe au sujet de l'expression de la LPL et du développement de l'athérosclérose. La LPL pourrait avoir un rôle protecteur contre l'athérosclérose. En effet, la réduction d'activité de la LPL serait en relation avec une augmentation de la triglycéridémie ; en effet l'hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycérides en remnants captés par le foie permet de diminuer la concentration plasmatique en triglycérides. Cependant, la LPL transformerait ces particules en LDL, lipoprotéines athérogènes, susceptibles de s'oxyder (Mead J.R. et Ramji D.P., 2002).

I-2-5 les récepteurs et transporteurs cellulaires intervenant dans le métabolisme des HDL

➤ L'ABCA1 «ATP Binding Cassette class A 1»

L'ABCA1 est une protéine appartenant à la superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). Ces transporteurs permettent un transport transmembranaire unidirectionnel de substrats spécifiques, ce transport étant ATP-dépendant. Les ABCs sont divisés en 8 sous familles selon leur composition en acides aminés.

L'ABCA1 appartient à la sous famille A des protéine ABCs. Cette protéine est exprimée dans beaucoup d'organes et à de hautes concentrations dans le placenta, le foie, les poumons, les glandes surrénales et les tissus fœtaux. Son gène est localisé sur le chromosome 9q31 (50 exons – 70 kb) et code pour un polypeptide de 2201 acides aminés de 220-240 kDa. Cette protéine est constituée de 2 domaines transmembranaires, chacun constitué de 6 hélices transmembranaires. Après chaque domaine transmembranaire, des domaines de liaison nucléotidique sont retrouvés. Ces domaines permettent la fixation de l'ATP et son utilisation comme source d'énergie nécessaire au transport de substrat au travers de la membrane (Figure 5) (Schmitz G. et al., 2000)(Oram J.F et Vaughan A.M, 2000).



A ce jour, une vingtaine de mutations du gène de l'ABCA1 sont liées à la maladie de Tangier ou à d'autres déficiences en HDL. Ces mutations incluent des délétions, des insertions et des substitutions et sont retrouvées tout au long de la chaîne polypeptidique de l'ABCA1. Ces mutations ont permis de mettre en évidence le rôle majeur de l'ABCA1 dans l'efflux des lipides des cellules et dans la régulation du métabolisme des HDL. En effet, l'ABCA1 permet un transfert actif de lipides (cholestérol et phospholipides) des cellules endothéliales (en particulier les macrophages) vers les HDL naissantes ; cette absence d'efflux a pour conséquence un défaut de maturation des pré-β HDL précurseurs en αHDL matures (von Eckardstein et al., 1998).

➤ ***SR-BI : « Scavenger Recepteur Class B Type I »***

SR-BI est un récepteur de 82 kDa, comprenant 509 acides aminés, très bien conservé parmi les espèces telles que l'homme, la souris, le rat ou encore le hamster. Cette protéine contient un court domaine N-terminal cytoplasmique (9 résidus), un domaine transmembranaire (22 résidus), un large domaine extracellulaire (408 résidus), un second domaine transmembranaire (23 résidus) et un domaine C-terminal cytoplasmique (47 résidus) (Williams D.L. et al., 1999). SR-BI est fortement exprimé au niveau du foie, des ovaires et des glandes surrénales. Son expression est beaucoup moins importante au niveau des testicules et des glandes mammaires, des traces sont aussi retrouvées au niveau du cœur (Rigotti A. et al., 1997a).

SR-BI porte le nom de récepteur éboueur en raison de ses propriétés à reconnaître une grande variété de ligands tels que les HDL, LDL et VLDL, les lipoprotéines modifiées (acétylées ou oxydées), l'albumine, les phospholipides ou encore les cellules apoptotiques.

Beaucoup d'études se sont intéressées à SR-BI pour sa fonction de récepteur cellulaire des HDL. La captation des esters de cholestérol des HDL par le foie constitue l'étape finale de la voie du transport reverse. La captation sélective désigne un processus par lequel les esters de cholestérol des HDL pénètrent à l'intérieur de la cellule sans endocytose. Ce processus requiert la liaison directe des HDL au récepteur SR-BI, par l'intermédiaire d'interactions de type protéine-protéine, impliquant les hélices amphipathiques d'apolipoprotéines. En effet, SR-BI lie les HDL par l'intermédiaire de l'Apo A-I, qui représente un ligand clé, et permet la captation sélective du cholestérol estérifié au travers la membrane au niveau du foie et des cellules stéroïdiennes. D'autres apolipoprotéines des HDL comme l'Apo A-II et l'Apo C-III ont été décrites comme pouvant lier le récepteur (Xu S. et al., 1997). SR-BI ne permet pas l'endocytose et la dégradation de la lipoprotéine liée. En effet, une fois le cholestérol transféré

dans la cellule, les HDL dépourvues en cholestérol sont relarguées. Donc, SR-BI permet la captation sélective des lipides des lipoprotéines. Cette première étape serait suivie de la formation d'un canal hydrophobe le long duquel les molécules de cholestérol estérifié diffuseraient des HDL vers la cellule le long d'un gradient de concentration (Figure 6). Ces phénomènes interviendraient au niveau de région spécialisées de la membrane plasmique : les calvéoles.

Les α HDL larges, sphériques et riches en cholestérol estérifié ont une plus forte affinité pour récepteur SR-BI que les pré β_1 HDL (De Beer M.C. et al., 2001).

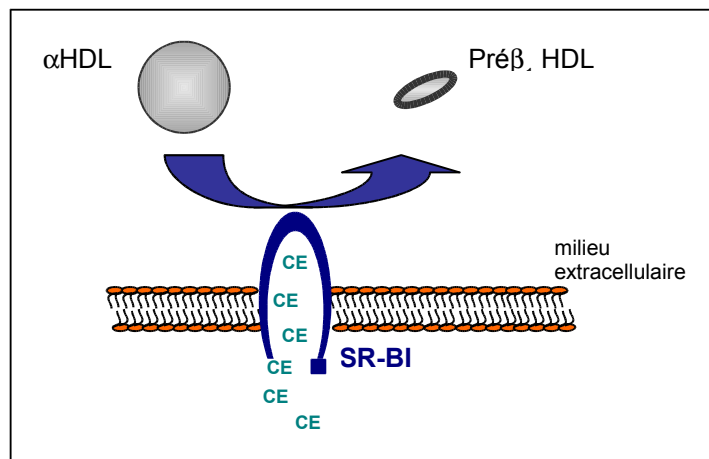


Figure 6 : Représentation schématique du mode d'action de SR-BI

Le récepteur SR-BI semble jouer un rôle de protection contre l'athérosclérose en médiant la captation sélective de cholestérol estérifié et donc en stimulant l'ensemble du transport reverse du cholestérol et aussi en prévenant l'accumulation des lipoprotéines athérogènes dans le plasma (Trigatti B. et al., 1999).

La surexpression hépatique de SR-BI est associée avec une diminution plasmatique du taux de HDL-C, une augmentation de la clearance sélective de cholestérol estérifié, une augmentation du contenu biliaire en cholestérol et du transport du cholestérol du foie vers la bile. Les souris KO SR-BI présentent une élévation du HDL-C, une réduction de la clearance sélective du cholestérol estérifié et une réduction de la concentration en cholestérol au niveau de la bile et de sa sécrétion (Rigotti A. et al., 1997b).

L'expression hépatique de SR-BI est régulée par des régimes variés, des hormones et des produits pharmacologiques. L'administration d'acide cholique, un activateur de FXR (Farnesoid X Receptor), chez la souris augmente le taux d'ARNm et de la protéine hépatiques. De plus, LXR (Liver X Receptor), PPAR γ (Peroxisome Proliferatory Activated Receptor γ), HNF $_{4\alpha}$ (Hepatocyte Nuclear Factor 4 α) ont aussi été reportés pour stimuler

l'expression hépatique du gène de SR-BI. Un traitement aux fibrates inhibe la protéine SR-BI sans variation du taux d'ARNm (Trigatti B. et al., 2003).

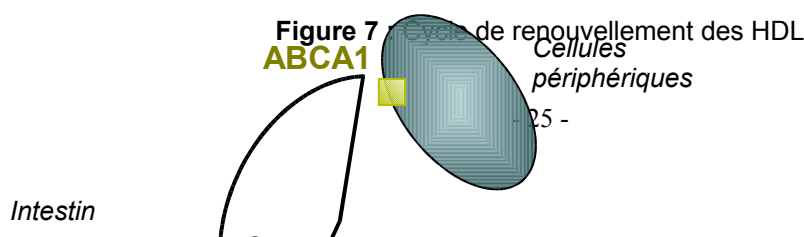
I-3 Le transport reverse du cholestérol

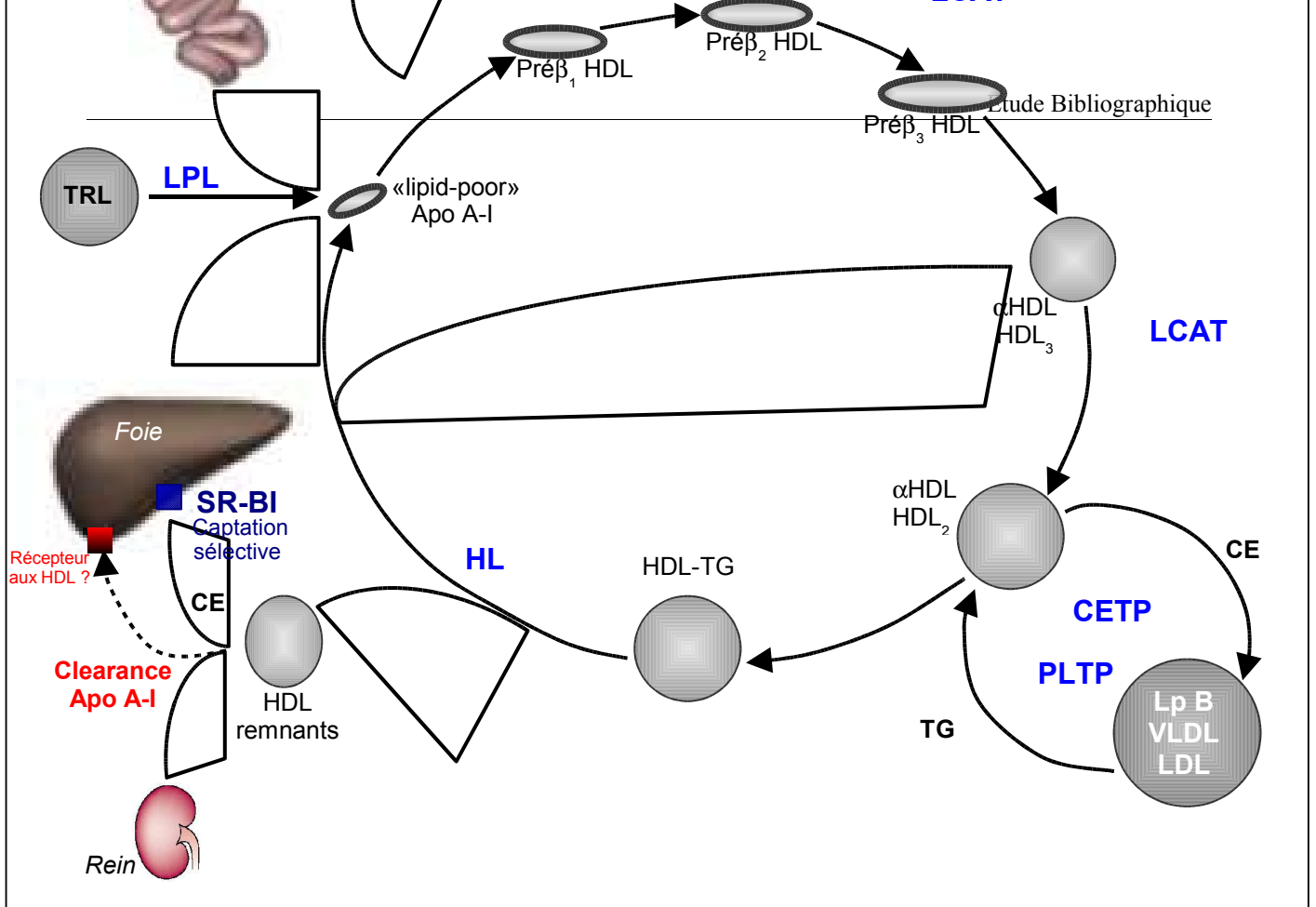
L'Apo A-I existe sous trois formes potentielles au sein du plasma. Plus de 90% de cette protéine est retrouvée dans les α HDL, particules matures et sphériques. L'Apo A-I peut aussi exister en tant que composant des pré β HDL, particules discoïdales qui, tout en s'enrichissant de lipides, sont converties en α HDL par la LCAT. Ces particules précurseurs sont naturellement présentes dans le plasma en faible concentration. Enfin, l'Apo A-I peut exister dans le plasma sous la forme de particules pauvres en lipides (« lipid-poor Apo A-I »).

En réalité, les HDL discoïdales et les particules Apo A-I pauvres en lipides ont toutes les deux une mobilité électrophorétique en position pré β . Les pré β_1 HDL contiennent au moins deux molécules d'Apo A-I et les particules pauvres en lipides existe sous une forme mono-moléculaire d'Apo A-I ; mais beaucoup de méthodes de séparation n'ont pas la capacité de différencier ces deux sous formes. Il est possible que les particules Apo A-I pauvres en lipides existent seulement à l'état transitoire *in vivo*, et soient relipidées ou épurées à des taux trop importants limitant ainsi leur accumulation et leur détection dans le plasma (Rye K-A. et al., 1999).

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence les différentes étapes du cycle de renouvellement des HDL illustrées sur la figure 7 :

- La génération de particules mono-moléculaires, migrant en position pré β et pauvres en lipides
- L'acquisition par ces molécules de phospholipides et de cholestérol libre des cellules et des lipoprotéines plasmatiques formant des pré β_1 HDL
- La conversion des pré β_1 HDL en α HDL, particules matures et sphériques
- La maturation des α HDL, de particules petites en particules plus larges
- Le remodelage de ces particules larges par des enzymes et protéines plasmatiques conduisant à la formation de particules Apo A-I pauvres en lipides

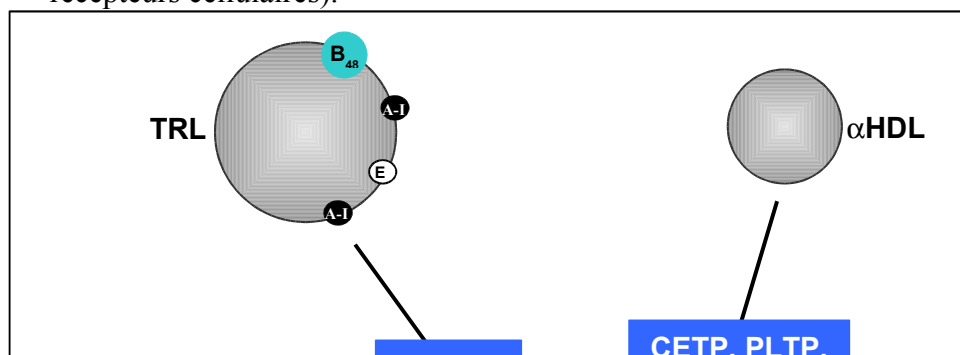




I-3-1 Origine des particules Apo A-I pauvres en lipides

Les particules Apo A-I pauvres en lipides sont considérées comme des particules préβ HDL primitives et peuvent avoir plusieurs origines métaboliques distinctes, essentiellement de trois types (Figure 8) (Rye K-A. et Barter P.J., 2004):

1. La synthèse directe par le foie ou l'intestin.
2. L'hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycérides (notamment des chylomicrons) en période postprandiale. Cette origine semble requérir l'action de la LPL et de la PLTP.
3. Le remodelage des αHDL matures au cours de leur transit intravasculaire et sous l'action de diverses protéines (enzymes lipolytiques, protéines de transfert, récepteurs cellulaires).



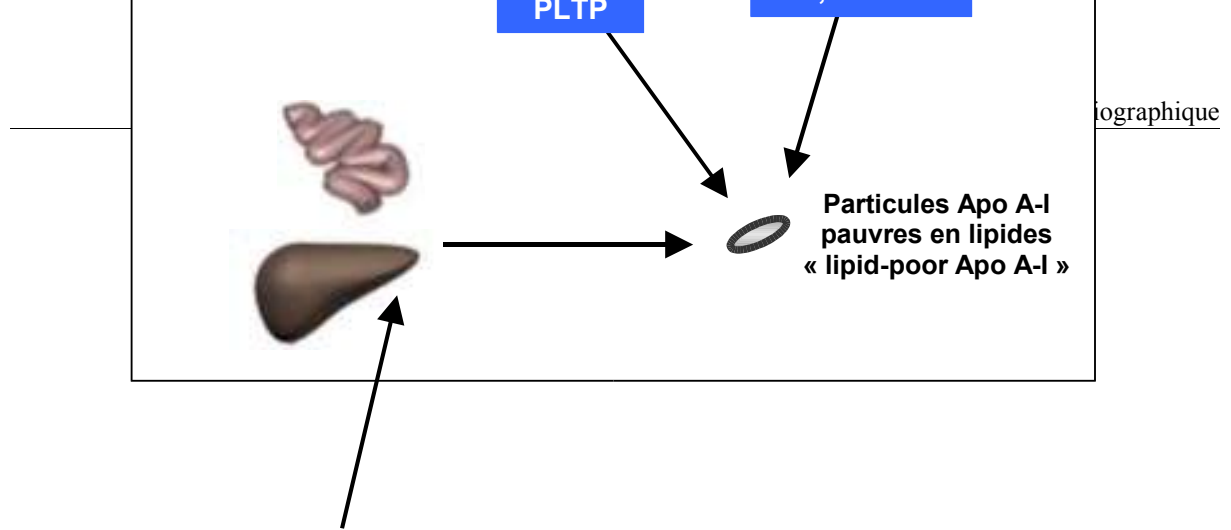


Figure 8 : Origine des particules Apo A-I pauvres en lipides

I-3-2 Formation des pré β HDL

Les particules Apo A-I pauvres en lipides vont rapidement acquérir des membranes cellulaires des lipides grâce à un processus médié par l'ABCA1. Le mouvement de cholestérol libre via l'ABCA1 est unidirectionnel et l'efflux net de ce cholestérol cellulaire semble toujours avoir lieu grâce à ce mécanisme. Les particules Apo A-I pauvres en lipides vont s'enrichir en lipides et induire la formation de pré β ₁ HDL. Ces lipoparticules seront ensuite capables d'acquérir du cholestérol grâce à d'autres mécanismes membranaires.

L'efflux de cholestérol se ferait par diffusion au niveau de microdomaines membranaires spécialisés : les calvéoles. Ce transfert est passif et dépend du gradient de concentration (Fielding C.J. et Fielding P.E., 2001; Gillotte K.L. et al., 1998). De plus le transfert de cholestérol libre au travers la membrane peut aussi être médié par SR-BI. Ce transfert est bidirectionnel et dépend aussi du gradient de concentration du cholestérol. Le récepteur SR-BI faciliterait l'interaction de la particule pré β avec la membrane plasmique essentielle à un transfert optimal (Yancey P.G. et al., 2003) (Figure 9).

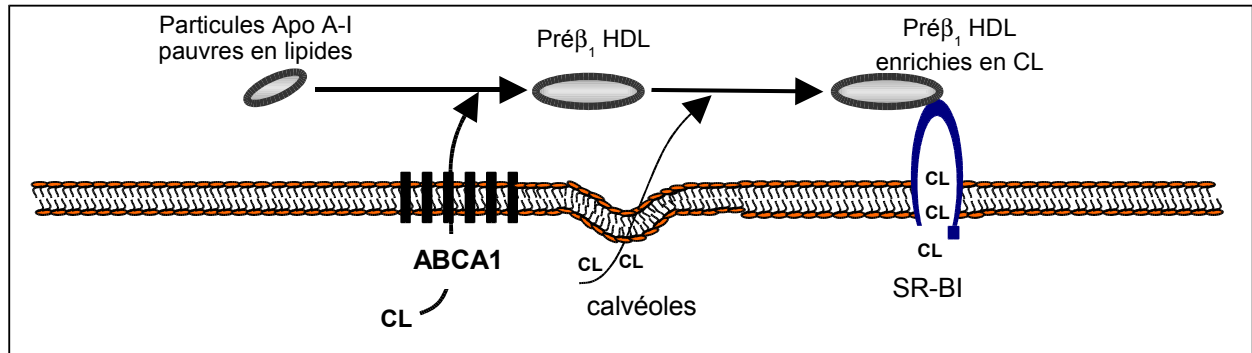


Figure 9 : Mécanismes moléculaires de l'efflux du cholestérol cellulaire

L'injection intraveineuse de disques d'Apo A-I/Phospholipides (assimilables à des « lipid-poor » Apo A-I) a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de ces particules dans la génération des pré β_1 HDL et dans la stimulation du transport reverse du cholestérol. En effet, cette injection est suivie d'une augmentation de la concentration des pré β_1 HDL dans le plasma avec aussi d'une augmentation du taux d'estérification du cholestérol et d'augmentation de l'excrétion des acides biliaires dans les fécès (Nanjee M.N. et al., 2001).

➤ Propriétés, régulations et expression des pré β HDL

Dans le plasma, l'Apo A-I des pré β_1 HDL représente 4 à 14% de l'Apo A-I total. Les pré β HDL sont aussi présentes dans le plasma d'autres mammifères comme le singe, les chiens et la souris. Au niveau de la lymphe, l'Apo A-I représente 20% de la concentration plasmatique. L'ensemble des sous fractions pré β HDL représente 14% de l'Apo A-I lymphatique.

Les pré β_1 et pré β_2 HDL humaines ont des masses moléculaires de 70 KDa et 325 KDa respectivement. Après ultracentrifugation, ces particules sont retrouvées à des densités supérieures à 1,21 g/ml, indiquant leur perte de la masse des HDL (Kunitake S.T. et Kane J.P., 1982). Les pré β_3 HDL sont retrouvées à des concentrations très faibles dans le plasma ce qui explique le peu d'informations physico-chimiques à leur sujet.

Les pré β_1 HDL sont composés d'une à deux molécules d'Apo A-I par particules et de lipides surtout retrouvés sous formes de phospholipides (Barrans A. et al., 1996). La stabilité des pré β_1 HDL a été étudiée dans le plasma. Ces particules disparaissent rapidement quand le plasma est incubé à 37°C, malgré la présence d'antiprotéases. Le stockage du plasma à -80°C prévient tout phénomènes d'interconversion des HDL et n'affectent pas la concentration en pré β_1 HDL (Santamarina-Fojo S. et al., 1998).

La concentration en pré β_1 HDL est positivement corrélée avec le taux de LDL-C et la masse en CETP (Miida T. et al., 2000a) ; toutefois la concentration en pré β_1 HDL semble changer avec le LDL-C mais indépendamment de la CETP.

Chez la femme des taux plus faibles de pré β_1 HDL sont retrouvés par rapport aux valeurs observées chez l'homme. Un ajustement du taux de cette lipoprotéine chez les femmes post-ménopausées ne recevant pas de traitement d'estrogènes de substitution suggère un effet des hormones stéroïdiennes. Ceci pourrait refléter l'effet de régulation négative des estrogènes sur SR-BI ainsi que les taux faibles de la HL chez les femmes, là aussi liée à une régulation hormonale.

Par contre outre ce lien avec le sexe, une corrélation entre le taux de pré β_1 HDL et le BMI ou l'âge n'est pas flagrante (O'Connor P.M. et al., 1998; Miida T. et al., 2000a). L'exercice physique semble augmenter la concentration des pré β_1 HDL bien que cette réponse soit assez hétérogène en fonction de l'individu (Jafari M. et al., 2003).

Du point de vue physiopathologiques, des concentrations élevées significatives en pré β_1 HDL sont retrouvées chez des patients atteints une hypercholestérolémie familiale, une déficience en LCAT ou encore une hypertriglycéridémie primaire ou secondaire suite à un diabète de type II ou à une déficience en Apo C-II (Ishida B.Y. et al., 1987 ; Xu Y. et al., 2003). De même, les patients, qui présentent des maladies coronaires, ont une concentration en pré β_1 HDL 1.5 fois supérieure par rapport à des sujets contrôles (Miida T. et al., 1996) et est corrélée à la faible activité en LCAT. Une augmentation du taux des pré β_1 HDL dans le plasma est trouvée chez des patients avec une insuffisance rénale chronique qui retrouve des taux normaux après transplantation (Barrans A. et al., 1996). Les sujets obèses se caractérisent aussi par une augmentation du taux des pré β_1 HDL (Sasahara T. et al., 1997).

I-3-3 Conversion des pré β HDL en α HDL petites

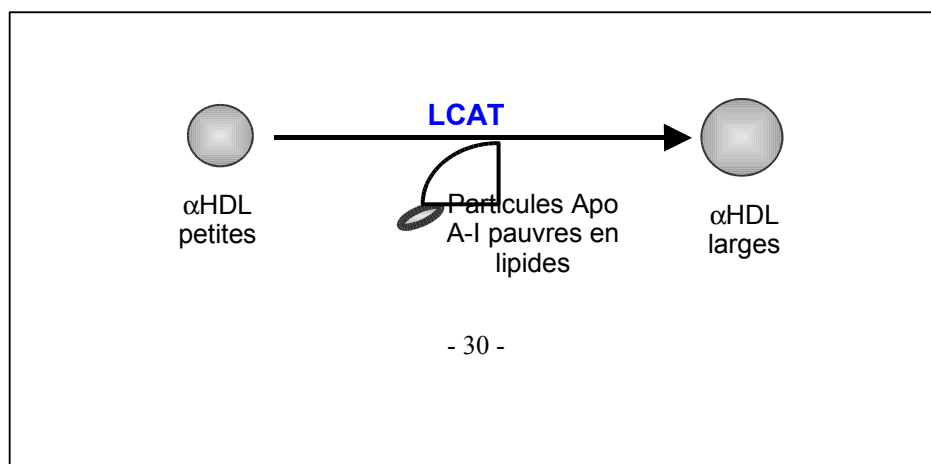
Les pré β_1 HDL s'enrichissent progressivement en cholestérol libre pour donner des pré β_2 et pré β_3 HDL dont la teneur en lipides augmente avec la fixation de la LCAT. Les pré β_2 HDL sont des particules plus larges considérées comme de bons substrats de la LCAT. Les pré β_2 et

pré β_3 HDL ne résultent pas de la fusion des pré β_1 HDL mais jouent un rôle d'intermédiaire au niveau de la conversion des pré β_1 en α HDL.

La LCAT, dont le cofacteur est l'Apo A-I, permet l'estérification du cholestérol localisée à l'interface lipide/eau ; les esters de cholestérol migrent vers le cœur hydrophobe de la particule. Ainsi, la LCAT influe considérablement sur les HDL, son action participe à la constitution d'un noyau lipidique hydrophobe, riche en esters de cholestérol, transformant les particules pré β HDL petites et discoïdales en α HDL sphériques. La réaction de transestérification, en consommant des phospholipides et du cholestérol libre de la surface des HDL, va en outre permettre de restaurer une certaine avidité des particules pour le cholestérol cellulaire, entretenant le mouvement du cholestérol libre des tissus périphériques vers les HDL. La LCAT maintient donc un gradient de cholestérol libre permettant ainsi un efflux accru.

I-3-4 Conversion des α HDL petites en α HDL larges

L'action de la LCAT sur les pré β HDL aboutie à la formation de α HDL petites d'un diamètre d'environ 7.7 nm et ne comprenant qu'une monocouche de phospholipides de surface et 2 molécules d'Apo A-I. Ces lipoparticules vont être remodelées à leur tour au niveau de leur composition et leur taille. La LCAT joue là aussi un rôle essentiel et plusieurs mécanismes d'actions ont été décrits (Liang HQ. et al., 1995) (Liang HQ. et al., 1996) représentés sur la figure 10 : **(1)** parallèlement à l'estérification du cholestérol par la LCAT, les α HDL petites acquièrent de l'Apo A-I via les particules pauvres en lipides et forment les α HDL larges ; **(2)** les α HDL larges vont être formées à la suite d'un processus de fusion des 2 particules plus petites, au cours de ce phénomène un intermédiaire instable est formé et rapidement dissocié de manière spontanée libérant au passage des particules d'Apo A-I pauvres en lipides ; **(3)** les deux processus peuvent se produire de manière concomitante.



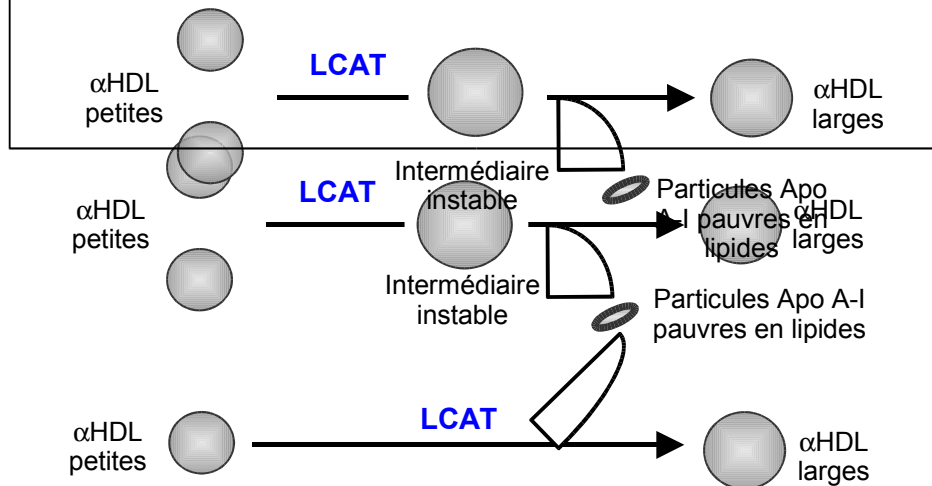
(2) Mécanisme de fusion**(3) Combinaison des 2 mécanismes**

Figure 10: Conversion des α HDL petites en α HDL larges sous l'action de la LCAT

I-3-5 Conversion des α HDL en pré β HDL

Les esters de cholestérol, générés par la LCAT et localisés au cœur des particules α HDL, vont être transférés aux lipoparticules contenant l'Apo B sous l'action de la CETP. En effet, la CETP catalyse le transfert net de cholestérol estérifié des α HDL vers les lipoprotéines à Apo B riches en triglycérides (essentiellement les VLDL) contre un transfert de triglycérides dans l'autre direction. Les α HDL vont alors s'appauvrir en cholestérol estérifié et s'enrichir en triglycérides, composés hydrolysables par la HL. La CETP permet donc la formation de HDL larges dont le corps lipidique est composé de plus de 30% de triglycérides et appelées HDL-TG. Ces particules représentent des substrats de choix pour la HL. Suite à cette hydrolyse de lipides (notamment les triglycérides), il apparaît une certaine instabilité des HDL-TG qui permet la formation d'une part d'une particule α HDL de petite taille et pauvre en lipides neutres appelée HDL remnant et d'autre part de pré β HDL résultant de la dissociation des composants de surface.

En effet, après incubation avec la HL, les HDL-TG (327 kDa) sont converties en pré β HDL (60 kDa) et en HDL lipolysées (274 kDa) ou HDL remnants. Comparé aux HDL-TG, ces HDL remnants ont perdu une molécule d'Apo A-I, 60% de triglycérides et 15% de phospholipides, par contre le taux de cholestérol libre et estérifié est conservé (Barrans A. et al., 1994). Ces modifications s'accompagnent d'une réduction de la taille des particules.

Les particules pré β HDL ainsi générées peuvent de nouveau accepter du cholestérol libre issu des cellules périphériques et réamorcer le transport reverse du cholestérol.

Dans le compartiment plasmatique, les HDL peuvent également connaître une étape supplémentaire de maturation sous l'influence de la PLTP (Figure 11). En effet, deux particules α HDL de taille intermédiaire peuvent fusionner, conduisant à la régénération de pré β HDL et de particules α HDL de grandes tailles, susceptibles de ramener de grandes quantités d'esters de cholestérol au foie (Lagrost L. et al., 1998).

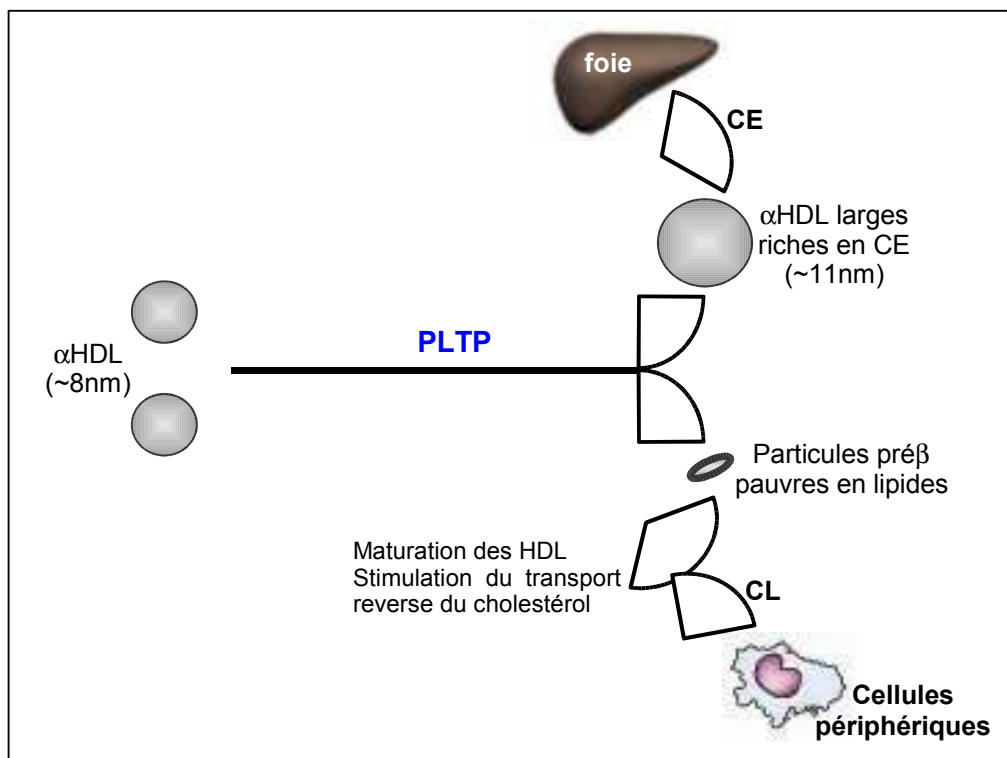


Figure 11 : Rôle de la PLTP dans le remodelage des HDL et le transport reverse du cholestérol

L'importance de la PLTP au niveau du transport reverse du cholestérol a été mise en évidence grâce à l'utilisation de souris transgéniques. En effet, les souris surexprimant la PLTP humaine et les souris surexprimant à la fois la PLTP et CETP humaines génèrent trois

fois plus de pré β_1 HDL que les souris témoins ou les souris surexprimant uniquement la CETP humaine (Lie J. et al., 2001).

De plus on peut supposer une action synergique de la PLTP avec la CETP. En effet, l'enrichissement en triglycérides au niveau des HDL stimule le remodelage de ces particules par la PLTP en augmentant la conversion des α HDL de taille intermédiaire en particules larges et plus petites (Rye K-A. et al., 1998).

I-3-6 Catabolisme des HDL

En raison de la grande hétérogénéité des HDL plasmatiques, les mécanismes régissant les interactions HDL-hépatocytes sont encore peu connus, mais font vraisemblablement intervenir l'Apo A-I.

➤ L'action de CETP, HL, SR-BI

La captation sélective du cholestérol estérifié des HDL remnants par le foie constitue l'étape finale du transport reverse du cholestérol. Le récepteur SR-BI joue un rôle majeur lors de cette étape en réalisant une captation sélective des esters de cholestérol ; les autres composants des HDL étant recyclés. Des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que le remodelage des HDL par la CETP suivi de l'action de la HL stimulaient la captation sélective du cholestérol estérifié par SR-BI (Collet X. et al., 1999; Lambert G. et al., 2000).

La modification lipolytique des HDL-TG par la HL est associée à une augmentation significative de la perte de l'Apo A-I au niveau de la fraction HDL et de sa captation par le rein (Clay M.A. et al., 1991). De plus, Horowitz *et al.* ont montré que les individus avec des taux en HDL-C réduits présentent de l'Apo A-I peu liée et facilement dissociable de la lipoparticule et que cette Apo A-I est rapidement épurée par le rein (Horowitz B.S. et al., 1993). Plus récemment, il a été décrit que l'Apo A-I des HDL enrichies en triglycérides sous l'action de la HL est épurée plus rapidement que l'Apo A-I des HDL à jeun (pauvres en triglycérides) sous l'action de la HL (26%) et que l'Apo A-I des HDL-TG avec une inactivation de la HL (22%) (Rashid S. et al., 2002). En d'autres termes, les HDL-TG et la lipolyse de la HL activent la clearance de l'Apo A-I, mais ni les HDL-TG seuls ni la lipolyse de la HL seule est nécessaire pour stimuler le catabolisme de l'Apo A-I.

➤ Mégaline/Cubuline

Bien que le foie constitue l'organe principal permettant de capter de manière sélective de la circulation les esters de cholestérol des HDL, le rein contribue aussi au catabolisme de ces particules : le mécanisme mis en jeu est une endocytose récepteur-dépendante de la particule HDL toute entière. Ce récepteur de haute affinité pour l'Apo A-I et les HDL est la cubiline (Kozyraki et al., 1999).

La cubiline est une protéine de 460 KDa exprimée au niveau de la membrane apicale du rein, de l'intestin, du corps jaune et du placenta. Cette protéine est composée d'une courte queue N-terminale suivie de 8 modules EGF-like et de 27 modules CUB (environ 120 acides aminés chaque) (Barth J.L. et Argraves W.S., 2001). La cubiline est parfaitement connue pour son rôle dans l'endocytose de la vitamine B12 (Hammad S.M. et al., 1999).

La cubiline est co-exprimée avec la mégaline, protéine de 600 KDa appartenant à la famille des LDL-récepteurs. Compte tenu de sa dépendance à la mégaline, la cubiline est exprimée dans tous les tissus où est exprimé la mégaline. Ces deux protéines semblent aussi co-régulées. L'utilisation d'anticorps anti-mégaline inhibe partiellement la captation des HDL médiée par la cubiline. La mégaline pourrait donc jouer un rôle direct au niveau du métabolisme des HDL. De plus, les Apo E, J et H sont des ligands de la mégaline et sont connues pour être aussi associées aux HDL (Hammad S.M. et al., 2000).

Au niveau de la clearance rénale, Braschi *et al.* ont montré que la forme discoïdale et la charge positive sont corrélées avec une augmentation de la clearance des particules Apo A-I/HDL (Braschi S. et al., 1999). La taille n'est pas le seul élément qui favorise la filtration rénale des HDL, la dissociation de l'Apo A-I, facilement filtrable, joue aussi un rôle important. En effet la captation semble être une endocytose de l'Apo A-I dissociée des HDL. L'altération de la composition des HDL circulantes en particules de petites tailles accompagnée souvent de la dissociation de l'Apo A-I résulte de l'action biologique de plusieurs protéines incluant les lipases, protéines de transfert ou encore SR-BI. En effet des facteurs comme la captation sélective du cholestérol estérifié par SR-BI et la lipolyse de la HDL conduisent à la réduction de la taille des HDL et tendraient à accélérer la clearance des HDL par le rein. Des souris transgéniques surexprimant SR-BI dans le foie n'ont pas seulement une réduction du HDL-C mais aussi une réduction de la concentration en Apo A-I.

➤ ATP synthase

Récemment, un récepteur de haute affinité pour l'Apo A-I, situé à la surface des hépatocytes, a été purifié et caractérisé *in vitro* (Martinez L. et al., 2003a). Ce récepteur a été identifié comme étant la chaîne β de l'ATP synthase. Sa présence est associée à une activité ATP hydrolase à la surface cellulaire. De plus, l'Apo A-I semble stimuler fortement l'endocytose des HDL qui apparaît comme étant strictement dépendante de l'ADP produit après la stimulation de l'ATP synthase de surface par l'Apo A-I. L'utilisation, sur des foies de rats perfusés, d'un inhibiteur de l'activité de l'ATP synthase induit une diminution importante de l'internalisation des HDL par le foie.

L'endocytose des HDL serait la conséquence d'une cascade de régulation (Martinez L. et al., 2003b). En effet, l'activation de l'ATP synthase par l'Apo A-I permet la régulation de récepteurs purinergiques qui induisent eux-mêmes l'endocytose des HDL (figure 12).

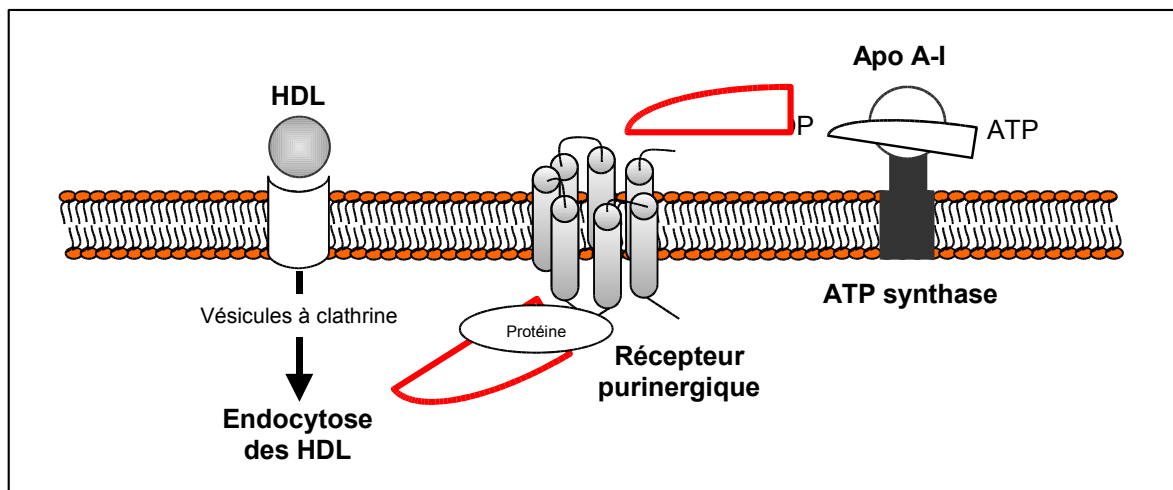


Figure 12 : Rôle de l'ATP synthase dans l'endocytose des HDL

Le rôle de l'ATP synthase dans l'endocytose des HDL a été décrite que dans cette étude et son implication *in vivo* chez l'homme est encore à élucider.

II. Exploration cinétique du métabolisme des HDL

Etudier les cinétiques de renouvellement de l'Apo A-I revient à explorer le métabolisme des HDL, dans la mesure où cette apolipoprotéine est considérée comme le marqueur des lipoprotéines de haute densité. Ainsi, dans le cadre de notre étude, le marquage de l'Apo A-I et le suivi du traceur *in vivo* nous ont permis d'identifier et de quantifier les différents

processus rendant compte du métabolisme des HDL. Ces différents paramètres cinétiques sont dans un premier temps définis par les taux de synthèse et de catabolisme d'une protéine. La synthèse d'une protéine est caractérisée par son taux de synthèse ou de production (FSR ou FPR - Fractional Synthetic (Production) Rate) et par son débit de synthèse (APR - Absolute Production Rate). Son catabolisme est caractérisé par son taux de catabolisme (FCR - Fractional Catabolic Rate). D'autre part des taux d'échange ou d'interconversion entre différentes sous classes de lipoprotéines peuvent aussi être estimés.

L'étude du métabolisme des protéines *in vivo* peut être réalisée en les marquant, c'est-à-dire en les enrichissant par un traceur métabolique. Ce traceur peut être un isotope radioactif ou stable. Le marquage réalisé peut être d'origine exogène ou endogène. Les radio-isotopes ont été très largement utilisés pour effectuer des marquages exogènes, alors que les isotopes stables sont utilisés pour effectuer des marquages endogènes des protéines.

II-1 Méthode de marquage de l'Apo A-I

II-1-1 Marquage exogène par des radiotraceurs

Jusqu'aux années 1990, le mode de marquage protéique ou lipidique couramment utilisé était le marquage exogène essentiellement fait par des radiotraceurs. Il consistait dans le cas d'un marquage protéique à isoler les lipoprotéines d'un sujet pour en marquer la partie apolipoprotéique *in vitro* par un marqueur radioactif (le plus souvent de l'iode ^{125}I ou ^{131}I), puis à les réinjecter dans l'organisme par voie intraveineuse. La méthode de McFarlane constitue la méthode de référence (McFarlane et al., 1958). L'utilisation de ces traceurs radioactifs permet surtout d'étudier le catabolisme d'une protéine à travers sa décroissance radioactive. Sa production est alors déduite par utilisation d'un modèle mathématique.

Mais ce mode de marquage exogène présentait des limites d'ordre éthique d'une part, du fait de l'utilisation de radioisotopes et d'autre part, d'ordre méthodologique, en raison de la variabilité des caractéristiques physico-chimiques que revêtaient les protéines lors de leur marquage. Cependant, les paramètres cinétiques obtenus par cette méthode servent toujours de référence aux études effectuées avec des isotopes stables.

II-1-2 Marquage endogène

➤ Marquage endogène par des radioisotopes

Le marquage endogène des lipoprotéines par radioisotopes a été réalisé en utilisant de l'iode (Shepherd et al., 1978a), du tritium (Phair 1975, Fisher 1995) ou de la 75-Sélénométhionine (Eaton 1982). Facilement identifiables et quantifiables par des compteurs de radioactivité, les radioisotopes ne posent pas de problème de recyclage. Dans le cas de l'iode par exemple, les résidus de radiomarqués provenant de la dégradation des protéines sont rapidement éliminés dans les urines. Toutefois l'utilisation des radioisotopes a des limitations d'ordre éthiques évidentes.

➤ ***Marquage endogène par des isotopes stables***

Depuis les années 90, des techniques de marquage endogène des protéines ou des lipides par isotopes stables ont été développées et de ce fait ont relancé les investigations cliniques. Le marquage endogène des protéines est réalisé en utilisant la voie de leur biosynthèse : un acide aminé judicieusement choisi, marqué par un isotope stable, est administré dans l'organisme par voie intraveineuse et s'intègre aux protéines au fur et à mesure de leur synthèse. Cette intégration se fait de la même façon pour les acides aminés marqués que les non marqués, puisqu'ils ont le même métabolisme.

L'utilisation de ce type de marquage permet surtout d'étudier la production de la protéine étudiée à travers son enrichissement en isotope en utilisant des propriétés particulières des courbes de marquage (pente à l'origine, plateau d'enrichissement). Son catabolisme est déterminé par utilisation d'un modèle mathématique simple ou nécessitant l'emploi de logiciels plus performants pour étudier des protéines ayant un métabolisme complexe.

Les isotopes stables sont issus d'éléments communs de la classification périodique des éléments et sont présents à l'état naturel en faible quantité par rapport à leurs éléments respectifs. Par exemple, le deutérium (*d* ou ^2H) représente 0,015 % de l'hydrogène total, tandis que le ^{13}C représente 1,080 % du carbone total. Les isotopes diffèrent de leurs éléments respectifs par leurs masses moléculaires, cependant très proches. La séparation des acides aminés enrichis en ces isotopes stables ou non (de masses moléculaires très proches) peut aujourd'hui être réalisée grâce à l'évolution des techniques et, en particulier, celle de la spectrométrie de masse.

Le marquage endogène aux isotopes stables présente des avantages multiples :

- Le marquage n'altère pas la structure ou la fonction de la protéine ; de plus les isotopes stables ne présentent pas d'appauvrissement spontané de l'enrichissement au cours du temps, ni d'équivalents radioactifs (^{15}N , ^{17}O ou ^{18}O) de demi-vie assez longue pour des études de plusieurs heures.

- Il permet d'étudier le métabolisme de multiples protéines lors de la même expérience chez un même individu et/ou de quantifier les cinétiques de plusieurs substrats en administrant simultanément plusieurs traceurs isotopiques.
- Il permet des études répétées chez un même sujet, y compris chez l'enfant et la femme enceinte, les isotopes stables étant administrés à des doses non toxiques.
- Il ne présente pas de problème d'ordre éthique chez l'homme, certains isotopes stables étant présents dans la nature en quantité non négligeable.

Cependant, l'étude cinétique et l'analyse des enrichissements isotopiques sont plus complexes. L'utilisation d'un isotope stable implique :

- La sélection du traceur et celle de la voie d'administration.
- Une mesure fiable de l'enrichissement isotopique du pool d'acides aminés précurseurs de la synthèse protéique.
- La prise en compte d'un possible recyclage de la molécule marquée sur des études de longue durée.
- Des méthodes fiables de purification de l'apolipoprotéine considérée et de détection de l'enrichissement (la sensibilité de détection des isotopes stables étant plus faible que celles des radioisotopes).

II-1-3 Choix du traceur

Une entité tracée est une substance naturellement présente dans le système. Un traceur est un fac-similé de cette substance tracée qui est identifiable par l'expérimentateur, qui possède un devenir métabolique identique à la substance tracée (l'organisme ne faisant pas la différence entre les molécules traceur et tracée) et dont l'introduction dans le système étudié ne perturbe pas l'équilibre (étant introduit en faible quantité, il ne modifie pas la taille du compartiment).

Plusieurs acides aminés marqués aux isotopes stables peuvent être utilisés. Quelques études de marquage endogène de l'Apo A-I utilisant différents isotopes stables comme la d₃-leucine, la d₃-valine, la d₂-lysine, la ¹³C-leucine, la ¹³C-phénylalanine ont été réalisées et n'ont pas montré de différence au niveau du taux de renouvellement de l'Apo A-I en fonction du traceur utilisé (Lichtenstein A.H. et al., 1990; Schaefer J.R. et al., 1992). Cependant, le marquage endogène le plus couramment utilisé pour l'étude du métabolisme des

apolipoprotéines est le marquage à la leucine trideutérée ou marquée au carbone 13. La [$^2\text{H}_3$]-leucine (d_3 -leucine) ou la ^{13}C -leucine présentent de multiples avantages:

- La leucine est un acide aminé essentiel. Elle n'est pas synthétisée par l'homme donc l'enrichissement du pool plasmatique de leucine n'est pas affecté par une synthèse endogène.
- Contrairement à d'autres acides aminés, elle est catabolisée pour une large part dans le muscle, réduisant ainsi la possibilité d'un recyclage par le foie.
- Elle est convertie en acide α -cétoisocaproïque (KIC) et non en un autre acide aminé, ce qui évite tout effet sur un autre pool d'acides aminés.
- Elle est commercialement disponible et l'apport de quantité suffisante pour obtenir des enrichissements mesurables par les méthodes classiques de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est possible.
- Elle est abondante dans de nombreuses apolipoprotéines (par exemple: 14% pour l'Apo AI) ce qui assure une quantité suffisante de substrat pour la mesure des enrichissements isotopiques.

II-1-4 Administration du traceur

L'administration du traceur peut être réalisé soit par une large dose charge (bolus) intraveineuse de traceur soit par une légère dose charge suivie d'une perfusion constante intraveineuse de ce même traceur (Schaefer J.R. et al., 1992).

La méthode d'administration du traceur par bolus résulte en un marquage de la protéine par « pulse » conduisant à des courbes d'enrichissement isotopique qui atteignent un pic et qui décroît progressivement. Pour les avantages, cette méthode ne nécessite pas d'avoir un pool précurseur à l'état stationnaire et le mode d'administration est très simple. Par contre, des problèmes de recyclage du traceur se posent. En effet, à la suite d'un bolus – où la dose est par définition importante – le phénomène de recyclage du traceur dans le pool précurseur et sa réincorporation dans la synthèse de nouvelles protéines causent des problèmes d'analyse des cinétiques des protéines à faible renouvellement, comme l'Apo A-I ; les paramètres cinétiques se retrouvant ainsi biaisés (Fisher W.R. et al., 1997). Le bolus est donc un mode d'administration du traceur préférable pour le marquage de protéines à renouvellement rapide.

La perfusion constante de traceur permet pour le marquage des protéines à renouvellement rapide d'atteindre un état stationnaire, la courbe d'enrichissement augmentant progressivement pour atteindre un plateau. Pour les protéines à renouvellement lent, la courbe

d'enrichissement en traceur augmente linéairement au cours de la perfusion et la pente est directement proportionnelle à l'enrichissement du précurseur et au taux de catabolisme de la protéine. La limite de cette méthode est qu'il est nécessaire de connaître l'enrichissement isotopique du pool précurseur intracellulaire en acides aminés. L'avantage majeur de la perfusion continue de traceur est que le problème de réutilisation du traceur est largement minimisé. De nombreux auteurs réalisent maintenant des perfusions cassées, ce terme signifie que des prélèvements sanguins sont effectués jusqu'à plusieurs jours après l'arrêt de la perfusion. Cette technique permet d'avoir accès à la disparition du traceur.

II-1-5 Choix du pool précurseur

La validité de la détermination du taux de renouvellement d'une protéine dépend étroitement du pool précurseur considéré. C'est l'enrichissement au plateau isotopique du précurseur qui est utilisé pour la détermination des paramètres cinétiques d'une protéine. Pour les protéines ayant un taux de renouvellement rapide (durée de vie de quelques heures), la perfusion du traceur sur un laps de temps suffisamment long, pour que leur enrichissement atteigne un plateau, permet à ces protéines de se renseigner sur l'enrichissement de leur propre précurseur. On peut citer comme exemple, l'Apo B100 des VLDL qui atteint un plateau d'enrichissement isotopique au bout de 6 à 8h de perfusion.

Cependant dans la majorité des cas, ce pool précurseur n'est pas accessible car la plupart des protéines ont un renouvellement lent et n'atteignent pas le plateau isotopique dans les temps de la perfusion. Il se pose alors le problème de la dilution isotopique entre les enrichissements du pool où le traceur est administré (plasma) et du pool intracellulaire, lieu de la synthèse protéique. L'enrichissement isotopique du traceur au niveau du plasma ne saurait donc constituer l'enrichissement idéal du pool précurseur de la synthèse protéique hépatique, par exemple.

La méthode la plus rigoureuse est de mesurer au niveau des tissus l'enrichissement de l'ARN de transfert codant pour les acides aminés qui constitueront les protéines d'intérêt. Il représente en effet l'enrichissement immédiat du pool précurseur chargé de la synthèse protéique (Matsushima T. et al., 1989). Toutefois, cette méthode invasive, outre les difficultés techniques qu'elle représente, est proscrite pour la plupart des tissus chez l'homme.

Une méthode indirecte consiste à mesurer l'enrichissement d'un métabolite plasmatique du traceur. Par exemple, un traceur de leucine est administré et l'enrichissement plasmatique de son analogue dérivé de transamination, l'acide α -cetoisocaproïque (KIC), est considéré à

l'équilibre avec l'enrichissement de la leucine intracellulaire, mais sans être spécifique d'un organe.

L'Apo A-I montre un taux de renouvellement lent et le rapport traceur/tracé n'atteint pas le plateau sur une période classique de perfusion. On peut alors considérer comme pool précurseur le rapport traceur/tracé de la proApo A-I, précurseur direct de l'Apo A-I (Batal R. et al., 1998).

Mais l'enrichissement au plateau de l'Apo B100 des VLDL, protéine de synthèse hépatique, est le pool précurseur de l'Apo A-I le plus couramment utilisé. Cependant, l'Apo AI est synthétisée par le foie ainsi que par l'intestin et l'enrichissement du pool précurseur intracellulaire ne peut donc pas être considéré comme le même. Le plateau d'enrichissement de l'Apo B48 reflète l'enrichissement du précurseur intracellulaire de l'entérocyte, car cette protéine est sécrétée uniquement dans l'intestin chez l'homme. Cet enrichissement au plateau de l'Apo B48 représentent ~50% du plateau de l'Apo B100 sécrétée dans le foie (Welty F.K. et al., 1999; Vélez-Carrasco W. et al., 1999a). La contribution relative du foie et de l'intestin dans la synthèse d'Apo AI chez l'homme n'a pas encore été déterminée. De façon discutable, Green et al. ont estimé la contribution intestinale comme étant approximativement égale à 50% chez deux sujets chylurique (Green P.H.R. et al., 1979), alors que Ikewaki et al., en testant des hypothèses sur la contribution de l'intestin et du foie et en comparant le FCR de l'Apo AI ainsi calculé à celui obtenu par un marquage exogène ont suggéré que l'intestin ne synthétisait que 10% de l'Apo AI (Ikewaki K. et al., 1993).

Notre groupe a depuis plusieurs années travaillé sur la cinétique de l'Apo A-I en se mettant volontairement en période post-absorptive afin de limiter au maximum la synthèse d'Apo A-I intestinale. Cependant, même si cette hypothèse de travail semble acceptable, d'autres recherches sont nécessaires afin de résoudre ce problème de précurseur et il apparaît important de pouvoir vérifier la part respective de synthèse intestinale ou hépatique dans l'objectif de stimuler préférentiellement l'Apo A-I d'origine intestinale par des nutriments ou des médicaments qui représenteraient ainsi une cible thérapeutique.

II-2 Méthode d'analyse cinétique par modélisation

L'incorporation du traceur dans les protéines se fait au cours du temps. En réalisant des prélèvements réguliers au cours d'une épreuve isotopique et en étudiant, dans chaque prélèvement, l'enrichissement en isotope stable de la protéine purifiée, des courbes

d'enrichissement sont obtenues. L'analyse cinétique et mathématique de ces courbes d'enrichissement constitue une étape essentielle permettant d'extrapoler des informations sur son métabolisme : il s'agit de l'étape de modélisation.

Dans cette étape de modélisation, le métabolisme de la protéine étudiée est représenté par un modèle. La caractérisation de ce modèle consiste en la définition de sa structure, c'est-à-dire en la détermination de son nombre de compartiments et en la mise en évidence des processus d'échanges qui existent entre ces compartiments. Les modèles peuvent être simples ou complexes.

Pour étudier et modéliser le métabolisme d'une protéine, il est donc nécessaire de déterminer l'acide aminé marqué (ou traceur) le mieux approprié, le modèle correspondant le mieux au métabolisme déjà connu de la protéine étudiée et le pool précurseur le plus représentatif.

II-2-1 Définitions et nomenclature

➤ Système, compartiments et échanges entre compartiments

Un système représente un ensemble d'éléments d'une nature particulière (l'Apo A-I, par exemple) composés de différentes parties (l'Apo A-I des pré β_1 et des α HDL, par exemple). La cinétique de l'Apo A-I illustre sa distribution dans l'espace et dans le temps.

La modélisation consiste en l'élaboration d'un modèle rendant compte d'un système subdivisé en compartiments ayant de nombreuses relations entre eux. Chaque compartiment correspond à un sous-ensemble d'éléments ayant le même comportement et possédant une homogénéité cinétique.

Un compartiment peut réaliser des échanges avec d'autres compartiments ou avec le milieu extérieur. Ces échanges correspondent à des processus physiologiques (flux de matière d'un organe à l'autre, transformation d'une particule en une autre, dégradation d'un élément..) et sont définis par des flux. Par exemple, les échanges entre deux compartiments i et j sont définis par un flux (F_{ji}), exprimé en quantité de matière Q_i transféré du compartiment i au compartiment j par unité de temps.

$$F_{ji} = k_{ji} \cdot Q_i$$

Où Q_i désigne la quantité de substance dans le compartiment i et k_{ji} un coefficient de transfert égal à la fraction de Q_i empruntant le processus F_{ji} par unité de temps. En d'autres termes, k_{ji} correspond à la probabilité qu'a une particule du compartiment i d'emprunter le processus F_{ji} .

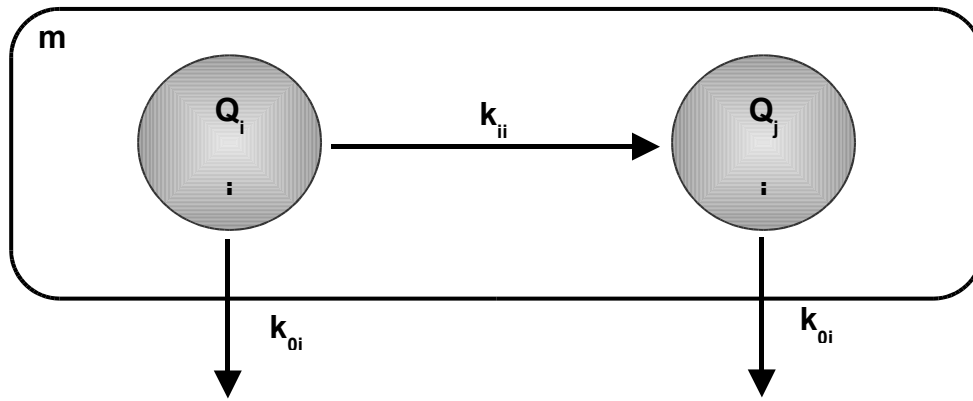


Figure 13 : Représentation graphique d'un modèle

➤ Les équations différentielles

Un compartiment i subit des entrées et des sorties modifiant ainsi Q_i . Il peut alors être associé à une équation différentielle du premier ordre dQ_i/dt . La somme des flux entrant dans le système est égale à la somme des flux qui en sortent. Dans ce cas, l'équation différentielle illustrant le bilan massique du compartiment i est :

$$dQ_i/dt = F_{im} - F_{in} = k_{im} \cdot Q_m - k_{ni} \cdot Q_i$$

Avec F_{im} et F_{in} représentant les flux d'entrée et de sortie du système, respectivement.

A l'équilibre massique, les masses de tous les compartiments sont constantes, ainsi que les flux massiques de l'ensemble des processus. Ceci se traduit par :

$$dQ_i/dt = 0 \quad \text{et} \quad F_{im} = F_{in} = k_{in} \cdot Q_i$$

La masse Q_i du compartiment i est donc déterminée par deux facteurs : le flux d'entrée (F_{im}) et le paramètre de sortie (F_{in}). Une augmentation de la masse Q_i peut ainsi être la conséquence de deux phénomènes : une diminution du paramètre de sortie k_{in} sans changement du débit d'entrée (F_{im}), ou une augmentation du débit d'entrée (F_{im}) sans changement du paramètre de sortie (k_{ni}).

➤ **Le FCR**

Les coefficients de transferts (k) entre compartiments sont exprimés en unité de temps à la puissance -1 (h^{-1} , j^{-1}) ou encore en pool/h ou pool/j. Si l'on considère, par exemple, que $k_{ni} = 0.20 j^{-1}$, cela signifie que 20% de Q_i emprunte le processus F_{ni} par jour.

Le taux de catabolisme (FCR), encore dénommé taux de renouvellement du compartiment, correspond à la proportion de la masse d'un compartiment qui est renouvelé par unité de temps. Dans la figure, le FCR du compartiment i équivaut la somme des coefficients de transfert quittant le compartiment i ($k_{ji} + k_{oi}$). Le temps de résidence moyen d'une particule dans un compartiment, exprimé en unité de temps, correspond à l'inverse du FCR soit $1/\text{FCR}$.

Ces paramètres cinétiques peuvent être évalués pour un ensemble de compartiments. Le taux de renouvellement de cet ensemble sera ainsi obtenu par le rapport des flux sortants de l'ensemble sur la masse totale des compartiments de l'ensemble. Dans la figure, le FCR de l'ensemble m sera $\text{FCR}_m = (k_{oi} \cdot Q_i + k_{oj} \cdot Q_j) / (Q_i + Q_j)$.

II-2-2 Modélisation élémentaire du métabolisme de l'Apolipoprotéine A-I

➤ *Principe*

La modélisation élémentaire ne permet que l'étude de systèmes très simples. Le taux de catabolisme (FCR) d'un modèle monocompartmental est déterminé par une régression monoexponentielle. La modélisation élémentaire permet d'analyser un compartiment représentant un sous-système simple sans traiter le modèle dans sa totalité.

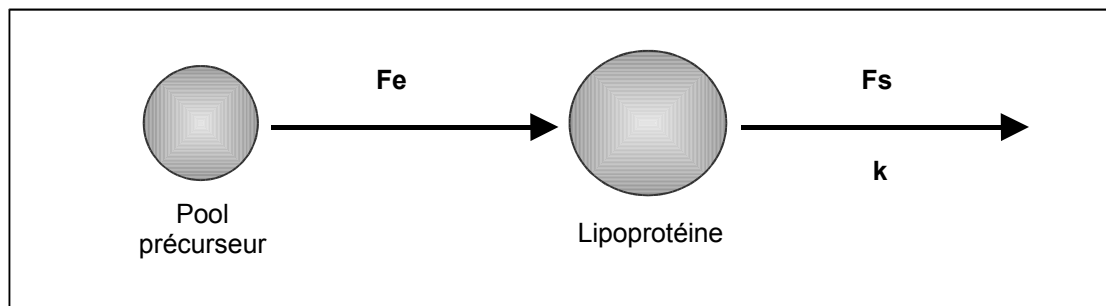


Figure 14 : Représentation monocompartmentale du compartiment d'une classe de lipoprotéines synthétisées à partir d'un pool précurseur dont le rapport traceur/tracé Z_p est constant au cours du temps. F_e est le flux d'entrée de cette lipoprotéine dans le plasma et F_s son flux de disparition du plasma. k est le FCR du compartiment lipoprotéique.

Pour le marquage endogène des apolipoprotéines, un acide aminé marqué par isotopie stable, correspondant au traceur, est administré et son incorporation dans la protéine est mesuré par rapport à l'acide aminé naturel correspondant au tracé. L'évolution du rapport traceur/tracé $z_i(t)$ dans le compartiment est telle que :

$$dz_i(t)/dt = k \cdot (z_p - z_i(t))$$

Où k représente le FCR du compartiment et z_p , le rapport traceur/tracé du précurseur au plateau isotopique. L'intégration de cette équation conduit à une équation différentielle qui décrit l'évolution du rapport traceur/tracé dans le compartiment en fonction du temps (t) :

$$z(t) = z_p \cdot (1 - e^{-kt})$$

L'apparition du traceur dans le compartiment requiert un laps de temps, appelé délai (d). Ce délai est variable selon l'individu et aussi surtout selon les lipoprotéines étudiées. Il est donc nécessaire d'introduire cette variable dans l'équation différentielle qui devient alors :

$$z(t) = z_p \cdot (1 - e^{-k(t-d)})$$

Le suivi de l'évolution du rapport traceur/tracé permet d'évaluer le FCR de la lipoprotéine.

➤ Métabolisme de l'Apo A-I

La méthode de régression monoexponentielle consiste à ajuster l'équation précédente aux valeurs expérimentales du rapport traceur/tracé de l'Apo A-I des HDL obtenues pendant la perfusion du traceur. Cette méthode permet d'évaluer le taux de production FPR de l'Apo A-I des HDL, qui est équivalent au taux de catabolisme FCR puisque le système étudié est en équilibre de masse (la fraction du entrant dans le système est égale à celle qui en sort). Pour les protéines à renouvellement lent, comme l'Apo A-I, la courbe d'enrichissement en traceur au cours du temps de l'infusion continue est linéaire et donc l'analyse par régression linéaire semble être une méthode raisonnable pour estimer les différents paramètres cinétiques.

L'étude du taux de renouvellement des HDL a été réalisée pour la première fois dans les années 50 (Gitlin et al. 1958). Lors de cette étude, les HDL étaient radiomarquées par l'iode. Les HDL étaient alors considérées comme un compartiment unique. Le suivi de l'évolution de la radioactivité spécifique (r.a.s.) des HDL permettait d'évaluer le FCR. Dans les dix années qui suivirent, d'autres études utilisant les radioisotopes ont étudié la cinétique des HDL, représentant un pool unique et homogène (Scanu et al. 1962 ; Furman et al. 1964). Toutefois, ces études ne prenaient pas en compte l'hétérogénéité de la partie protéique des HDL. Cette méthode, présentant néanmoins l'avantage de considérer l'intégralité de la courbe a été retenue par la suite dans des études cinétiques de l'apo AI chez l'homme sain utilisant les isotopes stables (Ikewaki et al., 1993; Vélez-Carrasco W. et al., 1999a; Vélez-Carrasco W. et al., 2000; Schaefer J.R. et al., 1999). Par la suite, de nombreuses études isotopiques l'ont utilisée pour mettre en évidence des variations des paramètres cinétiques de l'apo AI lors

d'affections comme l'hypertriglycéridémie, d'un taux réduit de HDL-C (Frenais R. et al., 1997; Pietzsch J. et al., 1998; Frenais R. et al., 1999).

Ainsi, la modélisation élémentaire peut être considérée comme une première étape nécessaire à l'établissement de modèles plus complexes. Elle permet d'analyser un compartiment représentant un sous-système simple sans traiter le modèle dans sa totalité. Cette modélisation parcellaire a souvent été utilisée comme nous venons de le voir pour l'étude du métabolisme de l'Apo A-I des HDL mais aussi pour l'étude du métabolisme des VLDL, du catabolisme des LDL, ainsi que pour la conversion des VLDL en LDL. Néanmoins, cette méthode ne permet pas de prendre en compte les interdépendances des différents processus du métabolisme des lipoprotéines.

II-2-3 Méthodes évoluées de modélisation du métabolisme de l'Apo A-I

Pour l'étude de systèmes plus complexes, les méthodes de modélisation élémentaire et auxiliaire ne conviennent plus. Il est par contre possible de faire appel à des méthodes évoluées de modélisation, capables de simuler tout système pluricompartimental, donc a priori sans limite de complexité.

- Les études précédentes ne prenaient pas en compte l'hétérogénéité de la partie protéique des HDL. Bien que la disparition de la protéine marquée dans sa globalité ait été suivie dans chaque cas, l'éventualité d'une disparité de catabolisme pour les apolipoprotéines majeures des HDL n'a pas été considérée. Partant du principe que les Apo A-I et Apo A-II ont des structures primaires et fonctions différentes, Blum *et al.*, ont étudié par un marquage exogène des HDL les devenir métaboliques de l'Apo A-I et de l'Apo A-II, émettant ainsi l'hypothèse qu'ils étaient différents (Blum et al., 1977). Cependant après avoir observé une décroissance de l'activité spécifique similaire entre l'Apo A-I et l'Apo A-II des HDL marquées à l'iode ^{125}I au niveau du plasma ainsi que l'apparition du traceur dans les urines, ils en ont conclu que ces apolipoprotéines avaient un taux de catabolisme identique suggérant ainsi que l'Apo A-I et l'Apo A-II ne formaient qu'un seul pool dans le plasma en équilibre avec un pool non plasmatique (Figure 15).

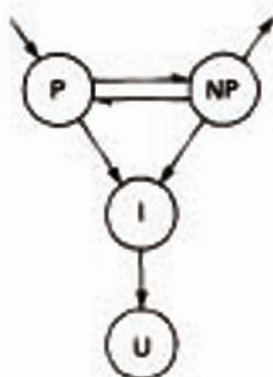


Figure 15 : Modèle représentant le métabolisme de l'Apo A-I des HDL selon Blum *et al.* : un pool plasmatique homogène de HDL (P) en équilibre avec un pool non plasmatique (NP), I : iode urinaire, U : urine (Blum *et al.*, 1977).

- Ce modèle a été repris par de nombreuses études qui ont utilisé comme méthode de marquage l'injection de HDL marquées à l'iode radioactive pour évaluer l'activité spécifique de l'Apo A-I et/ou de l'Apo A-II au sein des HDL chez l'homme (Ginsberg H.N. et al., 1986; Horowitz B.S. et al., 1993; Schaefer et al., 1982). En 1978, Shepherd *et al.* ont comparé deux marquages, l'un étant exogène qui consistait à une incorporation *in vitro* d'Apo A-I et A-II pré-marquées dans les HDL, et un marquage endogène des Apo-HDL (Shepherd et al., 1978a). Les courbes de radioactivité spécifique des apolipoprotéines ont été analysées en utilisant les analyses multiexponentielles de Matthews (Matthews, 1957). Il est ressorti de cette étude, qu'à la différence de l'Apo A-II, les taux de catabolisme de l'Apo A-I marquée de manière exogène était plus rapide que celui de l'Apo A-I marquée de manière endogène. De plus, les Apo A-I et Apo A-II ne présentaient pas le même taux de catabolisme lors du marquage exogène. Ceci serait dû à une recombinaison de l'Apo A-I aux HDL *in vitro*. Fidge et al. (1980) ont eux aussi montré que l'Apo A-I et l'Apo A-II étaient renouvelées à des vitesses différentes (Fidge et al., 1980) et qu'elles devaient donc probablement être sujettes à un mode de catabolisme distinct. Il est également possible que les principales fractions de HDL chez l'homme (HDL₂ et HDL₃) dont le rapport Apo A-I/Apo A-II diffère, soient dissemblables d'un point de vue métabolique. Zech *et al.*, en se basant sur les données de Schaefer *et al.* (Schaefer et al., 1982), ont alors développé deux modèles séparés pour rendre compte des cinétiques du métabolisme des majeures apolipoprotéines des HDL (Zech L.A. et al., 1983). L'Apo A-I était représentée par deux compartiments, l'un présentant un taux de renouvellement plus rapide que l'autre qui réalise des échanges avec deux compartiments extravasculaires (Figure 16), à l'inverse l'Apo A-II était représentée par un seul compartiment et

boliques de délai différent.

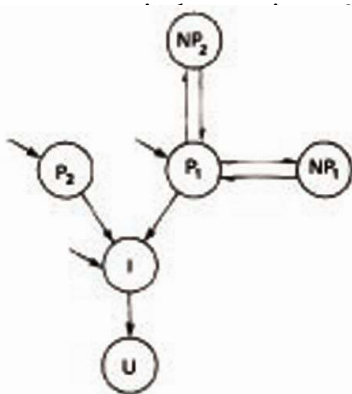


Figure 16 : Modèle du métabolisme de l'Apo A-I selon Zech *et al.* : P₂ pool d'Apo A-I à renouvellement rapide, P₁ pool d'Apo A-I à renouvellement lent qui réalise des échanges avec deux pools non plasmatiques (NP₁ et NP₂), I : iode urinaire, U : urine (Zech *et al.*, 1983).

- En reprenant le modèle de Zech qu'ils modifièrent pour incorporer la leucine plasmatique comme précurseur de la synthèse de l'Apo A-I, Fisher *et al.* ont mis en évidence deux voies de sécrétion de l'Apo A-I, une rapide et une lente, testées grâce à deux modèles distincts (figure 17) (Fisher W.R. et al., 1997; Fisher et al., 1995).

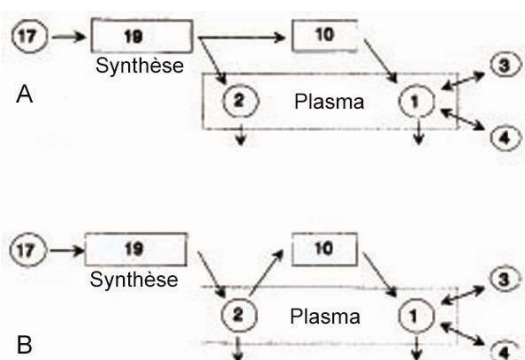


Figure 17 : Modèles du métabolisme de l'Apo A-I selon Fisher *et al.* : C(17) correspond à la leucine plasmatique et est utilisé comme pool précurseur de la biosynthèse d'Apo A-I C(19) ; l'Apo A-I apparaît dans le plasma au niveau d'un pool à renouvellement rapide C(2) et après un délai C (10), au niveau d'un pool avec un temps de résidence plus long C(1) ; ce dernier s'échange avec l'espace extravasculaire (Fischer *et al.*, 1995).

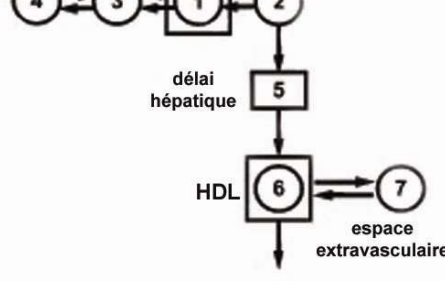
A : sécrétion indépendante de l'Apo A-I dans les deux pools plasmatiques

B : le pool à renouvellement rapide C(2) est précurseur du pool C(1)

Alors que le pool lent apparaissait dans le plasma après un délai compris entre 8 et 21h et qu'il contenait la plus grande partie de l'Apo A-I, le second pool avait un turnover rapide, un temps de résidence plasmatique inférieur à un jour et transportait 2 à 4 fois plus d'Apo A-I que le pool lent. La relation précurseur-produit entre le pool rapide et le pool lent n'a pas pu être montrée ; cette relation précurseur-produit signifie que le pool lent est un produit métabolique du pool rapide considéré alors comme précurseur.

En effet, les deux modèles A et B ont été testés et les auteurs supposent qu'il n'existe pas d'échange d'apolipoprotéine entre les deux pools mais ne l'excluent pas. Toutefois, même si une faible proportion de l'Apo A-I initialement sécrétée dans le pool rapide réapparaît dans le plasma, c'est le pool à renouvellement lent qui est le déterminant principal du temps de résidence de l'Apo A-I et donc de son catabolisme.

- Deux équipes utilisent à ce jour un modèle similaire (Figure 18) (Bilz S. et al., 2004; Watts G.F. et al., 2003). Dans ce modèle, les HDL sont étudiées selon un compartiment unique. Une hétérogénéité est créée au niveau du pool précurseur, cet artifice permet de



compartiment 1 C(1), reçoit le traceur et le distribue à des pools extravasculaires C(2), C(3) et C(4) ; C(5) est assimilé au pool intrahépatique et au délai de synthèse, assemblage et sécrétion de l'Apo A-I-HDL ; l'Apo A-I du pool des HDL C(6) peut subir une clearance directe ou un échange, avec un pool de HDL de l'espace extravasculaire (Watts *et al.*, 2003)(Bilz *et al.*, 2004).

donnée n'est rapportée dans ces études sur les taux d'échange.

- Les particules Lp A-I et Lp A-I/A-II ont aussi été analysées. Deux études peuvent être citées. La première, en utilisant l'injection de Lp A-I et LpA-I/A-II avec de l'Apo A-I marquée à l'iode ¹³¹I et ¹²⁵I respectivement, a permis de démontrer que l'Apo A-I des Lp A-I était catabolisée à des taux plus rapides que l'Apo A-I des Lp A-I/A-II (Rader *et al.*, 1991).

Plus récemment, Colvin *et al.* ont utilisé une technique similaire en injectant des petites particules Lp A-I dont l'Apo A-I était marquée avec de l'iode ¹³¹I (Colvin P.L. *et al.*, 1999).

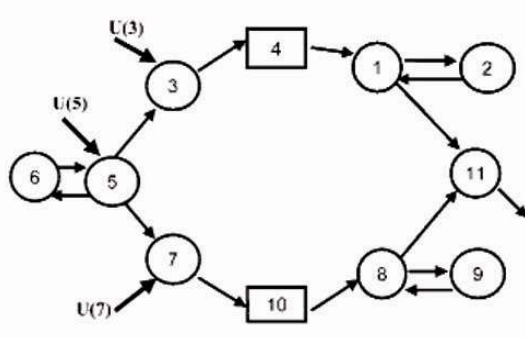


Figure 19 : Modèle du métabolisme de l'Apo A-I selon Colvin *et al.* au niveau des HDL petites C(5), HDL moyennes C(8) et HDL larges C(1). L'Apo A-I des HDL peut subir des échanges avec des compartiments extravasculaires (C(6), C(9) et C(2)). Ce modèle inclue des compartiments non circulants de HDL moyennes C(7) et de HDL larges C(3). Le pool d'iode urinaire est représenté par le compartiment C(11).

La décroissance radioactive était étudiée au niveau des Lp A-I petites (7.2 - 8.2nm), moyennes (8.2 - 9.8nm) et larges (9.2 - 12.2nm). Grâce à la mise en place d'un modèle multicompartimental (Figure 19), cette équipe a mis en évidence que les Lp A-I (que l'on pourrait assimiler à des particules préβ) sont bien *in vivo* les particules précurseurs des HDL moyennes et larges (assimilables aux lipoprotéines matures).

L'ensemble de ces études indique ainsi que l'estimation des paramètres cinétiques du renouvellement des HDL est étroitement associée à la définition d'un ensemble de facteurs :

le traceur (isotopes radioactifs ou stables), la particule tracée, le mode d'administration du traceur (bolus ou perfusion constante), le mode de marquage (exogène ou endogène) ou encore le type de modélisation (mono ou multi-compartimentale).

A ce jour, la plupart de ces études sont réalisées à partir de HDL isolées par ultracentrifugation, méthode standard d'isolation des lipoprotéines. Du point de vue hétérogénéité, cette technique permet uniquement la séparation des HDL₂ et des HDL₃ au sein du plasma. Les différentes investigations qui se sont intéressées à ces deux sous classes de HDL ont décrit des courbes d'enrichissement isotopiques similaires, suggérant des taux d'interconversion très rapides, et ont ainsi pu les associer à un seul et unique compartiment.

L'exploration cinétique des autres sous classes de HDL reste encore à être réalisée.

III. Physiopathologie du métabolisme des HDL

III-1 HDL et athérosclérose

III-1-1 Les mécanismes généraux de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie dont l'évolution lente se caractérise par l'accumulation de lipides et d'éléments fibreux dans la paroi des artères. Les lésions précoces d'athérosclérose correspondent à l'accumulation dans l'intima des macrophages gorgés de cholestérol qui correspondent aux cellules spumeuses et forment des stries lipidiques.

Les stries lipidiques sont sans conséquence clinique mais peuvent évoluer vers des lésions avancées qui se caractérisent par l'accumulation de débris nécrotiques cellulaires riches en lipides et en cellules musculaires lisses. Ces lésions fibreuses sont recouvertes d'une chape fibreuse constituée de cellules musculaires lisses et d'une matrice extracellulaire. Ces plaques peuvent évoluer soit en se calcifiant et/ou en s'ulcérant. Les complications cliniques majeures correspondent à des occlusions artérielles brutales provoquées par la formation d'un thrombus. Ces occlusions sont à l'origine à la fois des infarctus cérébraux et myocardiques. Ces thromboses sont généralement déclenchées par la rupture d'une plaque ou l'érosion d'une lésion (Tedgui A. et Chapman J., 2003).

Les phases successives de développement de la plaque d'athérome ont été largement analysées à ce jour (Figure 20). La première étape dans le développement d'une future plaque d'athérome correspond à l'accumulation de LDL ou de leurs agrégats dans l'intima de l'artère. D'autres lipoprotéines telles que les remnants de VLDL ou les IDL peuvent s'accumuler dans

cet espace sous-endothélial. Suite à ce phénomène, les monocytes adhèrent à l'endothélium puis migrent vers l'intima où ils se différencient en macrophages puis prolifèrent et captent les LDL (devenues oxydées : LDLox) pour former des cellules spumeuses. La modification des composants lipidiques et protéiques des LDL est une étape essentielle du processus athéroscléreux et passe par des oxydations, lipolyses, protéolyses ou encore agrégations. Pour se transformer en cellules spumeuses, les macrophages internalisent de grandes quantités de LDLox par l'intermédiaire de récepteurs éboueurs (scavengers) (SR-AI, SR-AII, CD 36, CD 68) qui, à l'inverse du récepteur des LDL normales, ne sont pas sous le contrôle négatif du contenu intracellulaire en cholestérol (Fruchart J-C. et Duriez P., 2001).

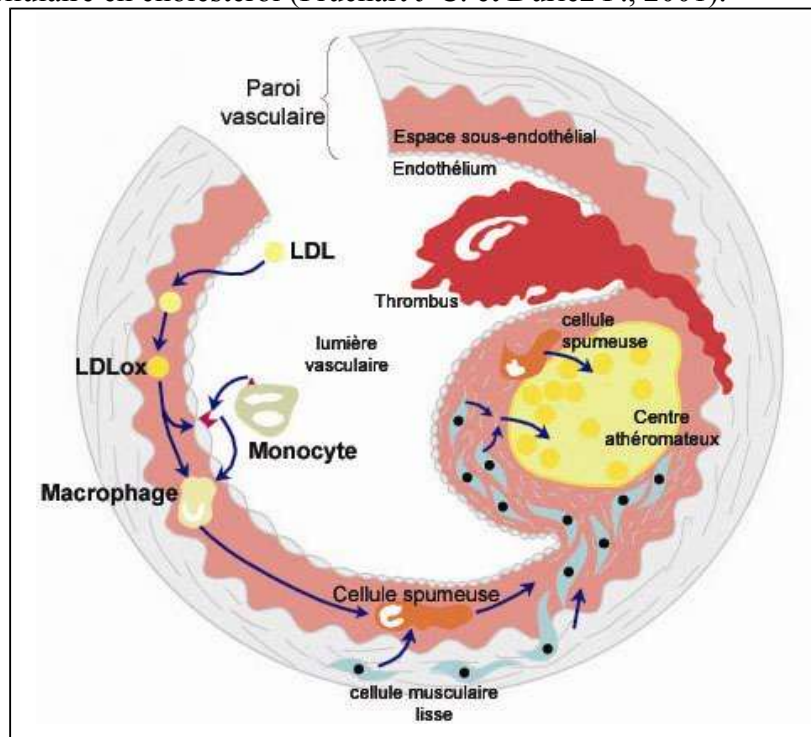


Figure 20 : Formation de la plaque athéromateuse

Les macrophages finissent par subir une mort cellulaire en libérant leur contenu lipidique pour former le cœur nécrotique de la plaque d'athérome. Des cellules musculaires lisses envahissent l'intima et sécrètent des éléments fibreux qui constituent la chape fibreuse et participent à l'augmentation de volume de la plaque d'athérome et à la progression de son caractère occlusif. La lésion commence en général à progresser vers l'adventice puis vers la lumière artérielle. Elle continue de croître en incorporant des nouveaux monocytes et en accumulant des lipides.

III-1-2 Le rôle anti-athérogène des HDL

La concentration plasmatique en HDL-C constitue un des nombreux facteurs protecteurs cardiovasculaire. Les études épidémiologiques indiquent une relation inverse significative entre le HDL-C et le risque d'athérosclérose (Gordon et al., 1977). Bien que la mesure du HDL-C ait amélioré la définition du risque coronaire, le contenu des lipoprotéines en apolipoprotéines doit également être considéré. L'analyse biologique des hypoHDLémies d'origine génétique ainsi que les travaux menés chez les souris dont le gène de l'Apo A-I a été invalidé ont confirmé qu'une réduction des concentrations du cholestérol véhiculé par les HDL et de l'Apo A-I accélère le développement de l'athérosclérose. Cette propriété protectrice des HDL leur doit au rôle qu'elles assurent au niveau du retour du cholestérol tissulaire vers le foie pour sa dégradation sous forme d'acides biliaires.

➤ ***HDL et paraoxonase***

La famille des paraoxonases est constituée de trois membres (PON1, PON2 et PON3) qui ont 65% d'homologie dans leur composition en acides aminés, dont les gènes sont localisés chez l'homme en tandem sur le chromosome 7 et qui possèdent tous des propriétés antioxydantes notamment en hydrolysant les lipides oxydés des LDL. PON1 est le membre le plus étudié ; c'est une glycoprotéine de 45 kDa et de 354 acides aminés (Ruel I.L. et al., 2004). Son taux d'expression peut être influencé par des statines et des cytokines. PON1 est associé préférentiellement aux HDL. L'Apo A-I n'est pas nécessaire à cette association, mais l'activité de PON1 est stabilisée en présence de l'apolipoprotéine (Cabana V.G. et al., 2003). En plus de l'action sur les LDLox, la paraoxonase peut aussi altérer l'état oxydation des macrophages.

➤ ***HDL et PAF-AH***

Le PAF (facteur d'activation plaquettaire) est un phospholipide capable de jouer divers rôles puissants en particulier celui de médiateur de l'inflammation. Une dégradation rapide du PAF par la PAF-AH (PAF-Acetylhydrolase) est un des moyens de réguler le niveau du PAF. La PAF-AH est un polypeptide monomérique de 45kDa capable d'hydrolyser, non seulement le PAF, mais aussi les acides gras à chaîne courte et oxydés qui estérifient les phospholipides en position 2 du glycérol et qui sont des produits formés lors de l'oxydation des lipoprotéines (Karasawa K. et al., 2003). La PAF-AH est étroitement associée aux HDL et aux LDL. L'augmentation du taux de PAF-AH plasmatique associée aux HDL peut contribuer au potentiel anti-inflammatoire et antioxydant des HDL. Le ratio PAF-AH/HDL par rapport au taux de PAF-AH total du plasma est significativement diminué en cas

d'hypercholestérolémie, parallèlement à une augmentation des PAF-AH/LDL. Le ratio PAF-AH/HDL est aussi augmenté chez les patients traités à l'atorvastatine (Tselepis A.D. et Chapman J.M., 2002).

➤ *HDL et le NO*

Des études de culture cellulaire ou sur des souris ont permis de montrer que les HDL activent la eNOS - enzyme endothéliale qui permet la synthèse du monoxyde d'azote (NO) – et que cet effet est médié par SR-BI grâce à un processus qui requière la liaison de l'Apo A-I. Le NO est un médiateur clé de la vasodilatation et une molécule athéroprotectrice importante qui module l'adhérence des plaquettes et des leucocytes à l'endothélium et la migration et la croissance des cellules vasculaires (Shaul P.W. et Mineo C., 2004). La liaison de l'apo A-I-HDL à SR-BI conduit à l'activation d'une tyrosine kinase qui elle-même permet l'activation de la PI3 kinase (PhosphoInositol 3 Kinase). La PI3 Kinase induit l'activation indépendante de 2 voies conduisant à la stimulation de eNOS conduisant à la synthèse de NO (Figure 21) (Mineo C. et Shaul P.W., 2003).

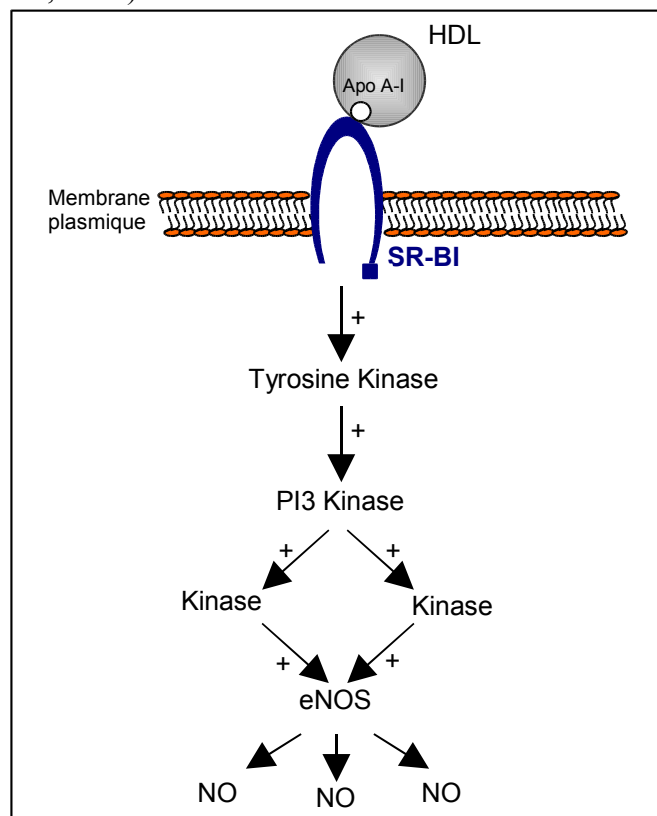


Figure 20 : Voies de signalisation de l'activation de eNOS par les HDL

III-2 Variations cinétiques du métabolisme des HDL au cours de pathologies

Les observations des données cliniques chez l'homme présentant certaines hypoHDLémies sont également un argument fort en faveur du rôle anti-athérogène des HDL. Toutefois, le risque cardiovasculaire est variable, même dans les pathologies avec effondrement des HDL. Une hypoalphalipoprotéïnémie peut être la résultante de différents défauts métaboliques : diminution du taux de synthèse, augmentation du taux de catabolisme, défaut d'activité enzymatique, synthèse de variants d'Apo A-I.

III-2-1 Diabète de type II

Le diabète est un ensemble de maladies qui se définissent par « la présence d'une hyperglycémie chronique de degré variable, due à une insuffisance de l'insulinosécrétion et, dans de nombreux cas, de l'action de l'insuline, pouvant entraîner à long terme des complications atteignant les petits et les gros vaisseaux » (Slama G. et Sélam JL., 2001).

On peut distinguer 2 types majeurs de diabète : le diabète de type I - qui est une maladie auto-immune liée à une destruction des îlots de Langerhans qui conduit en quelques années à un état d'insulinopénie absolue - et le diabète de type II ou non insulinodépendant (DNID).

Le diabète de type II représente 80 à 85 % des diabètes et sa prévalence est en France de 2.7%. Il s'agit d'une affection 10 fois plus fréquente que le diabète de type I ; elle est due à une insuffisance de la capacité du pancréas endocrine à faire face à l'état d'insulinorésistance, le plus souvent en rapport à un surpoids.

Les facteurs de risque sont la surcharge graisseuse, surtout abdominale et périviscérale, les antécédents familiaux, la sédentarité, le faible degré d'activité physique, le tabagisme. La fréquence du diabète de type II augmente aussi généralement avec l'âge – la prévalence atteint 10% après 70 ans. Les diabétiques de type II sont des patients à haut risque cardiovasculaire avec une dyslipidémie fréquemment observée : élévation des triglycérides, baisse du HDL-C avec du LDL-C normal ou modérément augmenté avec prédominance des LDL petites et denses, très athérogènes.

Plusieurs études cinétiques ont permis de mesurer les variations des paramètres cinétiques de l'Apo A-I des HDL au cours d'un diabète de type II. Golay *et al.* ont réalisé une étude de marquage endogène par des radioisotopes en injectant des HDL contenant de l'Apo A-I tritiée chez des patients diabétiques et des sujets contrôles (Golay A. et al., 1987). Cette première

étude a permis de mettre en évidence que la réduction de la concentration plasmatique de l'Apo A-I était due à une augmentation de son catabolisme ; son taux de production ne pouvant compenser cette perte.

Le marquage endogène de l'Apo A-I des HDL chez des patients atteints d'un diabète de type II par des isotopes stables a été réalisé pour la première fois par Frénais *et al.* (Frenais R. et al., 1997). Cette étude a confirmé l'augmentation dramatique du catabolisme de l'Apo A-I lors de cette pathologie (~80%) ; ce catabolisme étant corrélé positivement à la concentration des triglycérides dans le plasma et dans les HDL et négativement au taux du HDL-C.

Le traitement à l'insuline n'a pas d'effets significatifs sur les paramètres cinétiques de l'Apo A-I : concentration, taux de synthèse et taux de catabolisme (Duvillard L. et al., 2000).

III-2-2 Syndrome X plurimétabolique

Comme tout syndrome, le syndrome plurimétabolique (ou syndrome X) est une agrégation de symptômes chez un même individu. Reaven *et al.* ont mis en évidence la coexistence fréquente chez un même individu de résistance à l'insuline, d'hyperinsulinémie, de troubles de la tolérance au glucose, d'obésité, de dyslipidémie, de troubles de la tolérance au glucose, d'hypertension artérielle et d'une élévation modérée des protéines d'inflammation (Reaven G.M., 1988). La dyslipidémie se caractérise par une hypertriglycémie, une baisse du HDL-C et l'existence de particules LDL petites et denses. La liste des anomalies, rattachées à ce syndrome, est indiquée dans la figure 22.

Les patients obèses présentant une insulino-résistance sont caractérisés aussi par une diminution de la concentration en Apo A-I directement liée à une augmentation de son catabolisme (~50%) et aux taux de triglycérides (Pont F. et al., 2002).

Les patients, qui présentent une intolérance au glucose, sont caractérisés là aussi par une diminution de la concentration plasmatique en Apo A-I due à une augmentation de leur catabolisme, le taux de production de la protéine étant inchangé (Pietzsch J. et al., 1998).

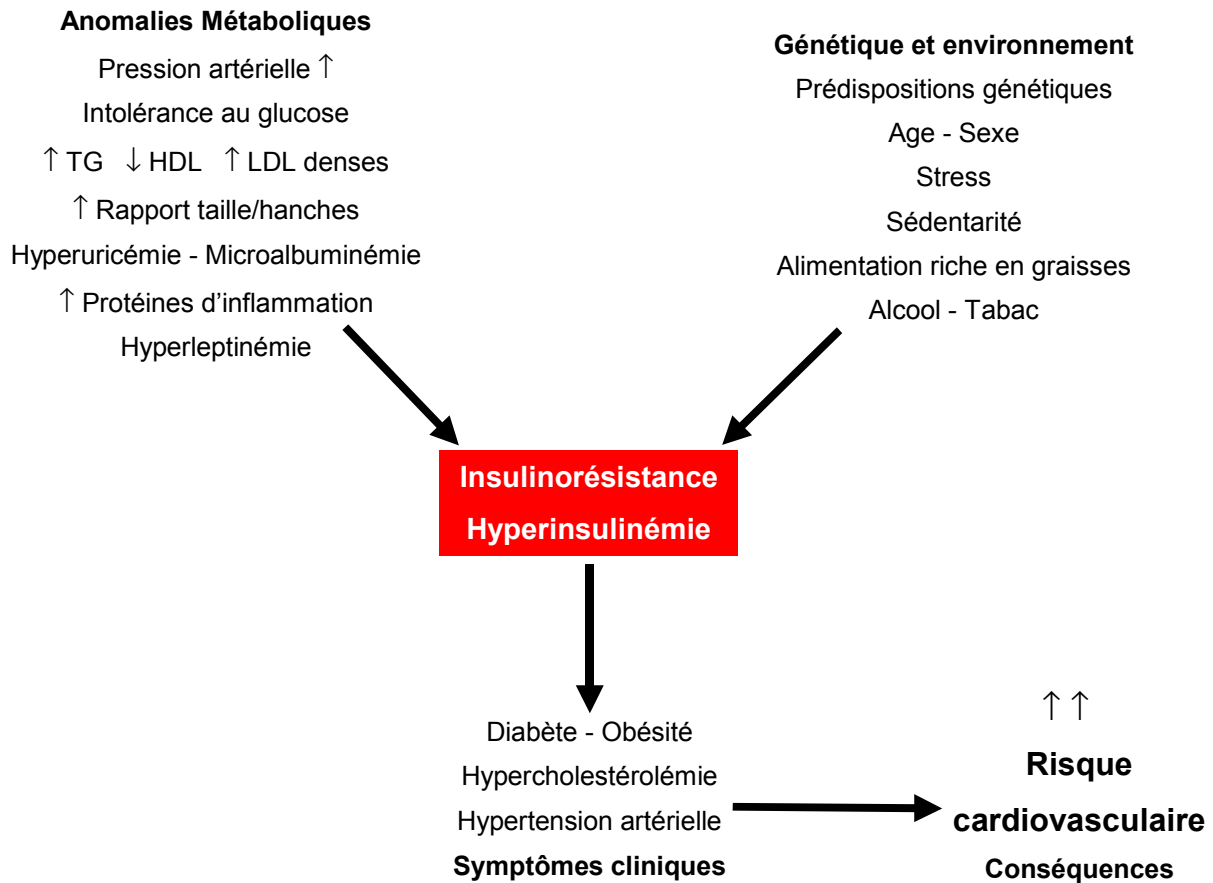


Figure 22 : Le syndrome X plurimétabolique

III-2-3 Hypercholestérolémies familiales

L'hypercholestérolémie familiale est associée à une augmentation importante du cholestérol plasmatique et du niveau d'Apo B100 lié à une déficience de l'activité du LDL-récepteur (LDL-R). Le LDL-R assure la clearance plasmatique de 68% du cholestérol circulant, plus de 700 mutations différentes ont été décrites comme responsable de l'hypercholestérolémie familiale dont le symptôme majeur est l'augmentation permanente du LDL-cholestérol. Les manifestations cliniques de cette pathologie sont des troubles cardiovasculaires, des dépôts extravasculaires de cholestérol (comme des xanthes cérébraux tendineux) ou encore l'infarctus du myocarde. Les anomalies fonctionnelles peuvent différer selon le domaine protéique concerné. L'hypercholestérolémie peut en effet résulter d'un défaut d'association du ligand (LDL) avec son récepteur ou encore d'un ralentissement d'endocytose des LDL suite à un défaut de recyclage et donc à une diminution du nombre des récepteurs en surface cellulaire (Benlian P., 2003).

Une étude cinétique par marquage endogène de l'Apo A-I par des isotopes stables sur un patient atteint d'une hypercholestérolémie familiale homozygote a permis de mettre en évidence que cette pathologie est caractérisée par une baisse de la concentration plasmatique en Apo A-I résultant d'une augmentation de son catabolisme (~35%) et d'une réduction de son taux de production (~38%) par rapport à des sujets sains (Schaefer et al., 1992).

Frénais et al. ont réalisé sur des patients atteints d'une hypercholestérolémie familiale hétérozygote le même type d'investigation cinétique (Frénais R. et al., 1999). Ces patients sont caractérisés par une hypercholestérolémie évidente couplée à une augmentation du taux des triglycérides au niveau du plasma et des HDL. Contrairement au patient homozygote de l'étude précédente, les patients hétérozygotes ne présentent pas de variations au niveau de la concentration plasmatique en Apo A-I par rapport à des sujets sains ; par contre les taux de synthèse et de catabolisme réalisent la même augmentation (~60%).

Les mêmes auteurs ont par la suite étudié, sur ces mêmes patients, les effets d'une LDL aphasie – technique qui permet d'épurer le plasma des LDL et à moindre degré des VLDL et IDL (Frénais et al., 2001a). Le turnover de l'Apo A-I des HDL se trouve réduit après traitement. En effet l'augmentation du taux de synthèse et de catabolisme est moins importante (~20%) à la suite de la LDL-aphasie, par conséquent la concentration plasmatique en Apo A-I reste inchangée. Il en est de même pour les concentrations en HDL-C et en triglycérides.

III-2-4 Hypertriglycéridémie

L'hypertriglycéridémie est une dyslipidémie résultant d'un excès de triglycérides plasmatiques et de leur défaut de catabolisme. Elle peut être d'origine endogène (causée par un déficit en LPL) ou induite (absorption d'un régime riche en graisses saturées).

Lamarche *et al.* ont émis l'hypothèse que l'enrichissement intrinsèque des HDL en triglycérides pouvait induire la transformation lipolytique des HDL et par conséquent leur catabolisme dans un état d'hypertriglycéridémie (Lamarche B. et al., 1999). Pour cette étude, un marquage exogène de HDL, isolées chez des patients normolipidémiques placés à jeun ou après une perfusion d'émulsion synthétique de triglycérides (Intralipid), a été réalisé. L'Intralipide permettait un doublement de la concentration des HDL-TG. L'Apo A-I des HDL enrichies en triglycérides était épurée plus rapidement que l'Apo A-I des HDL à jeun (~26%). Cette même équipe avait déjà effectué précédemment des études sur modèle animal grâce

auxquelles ils avaient pu montrer que le catabolisme des HDL larges riches en lipides étaient plus important que celui des HDL petites (Lewis G.F. et al., 1997; Lamarche B. et al., 1998). Donc, le catabolisme de l'Apo A-I est corrélé positivement avec l'hypertriglycéridémie et le HDL-TG.

Les principaux mécanismes qui aboutissent à la réduction des HDL plasmatiques lors d'une hypertriglycéridémie sont (figure 23) :

1. Les HDL-TG sont plus instables dans la circulation et l'Apo A-I peu liée est facilement dissociable.
2. Les HDL remnants, qui sont le produit de la lipolyse intravasculaire des HDL-TG, semblent être épurées plus rapidement.
3. L'hydrolyse de la HL cause aussi la perte de l'Apo A-I.

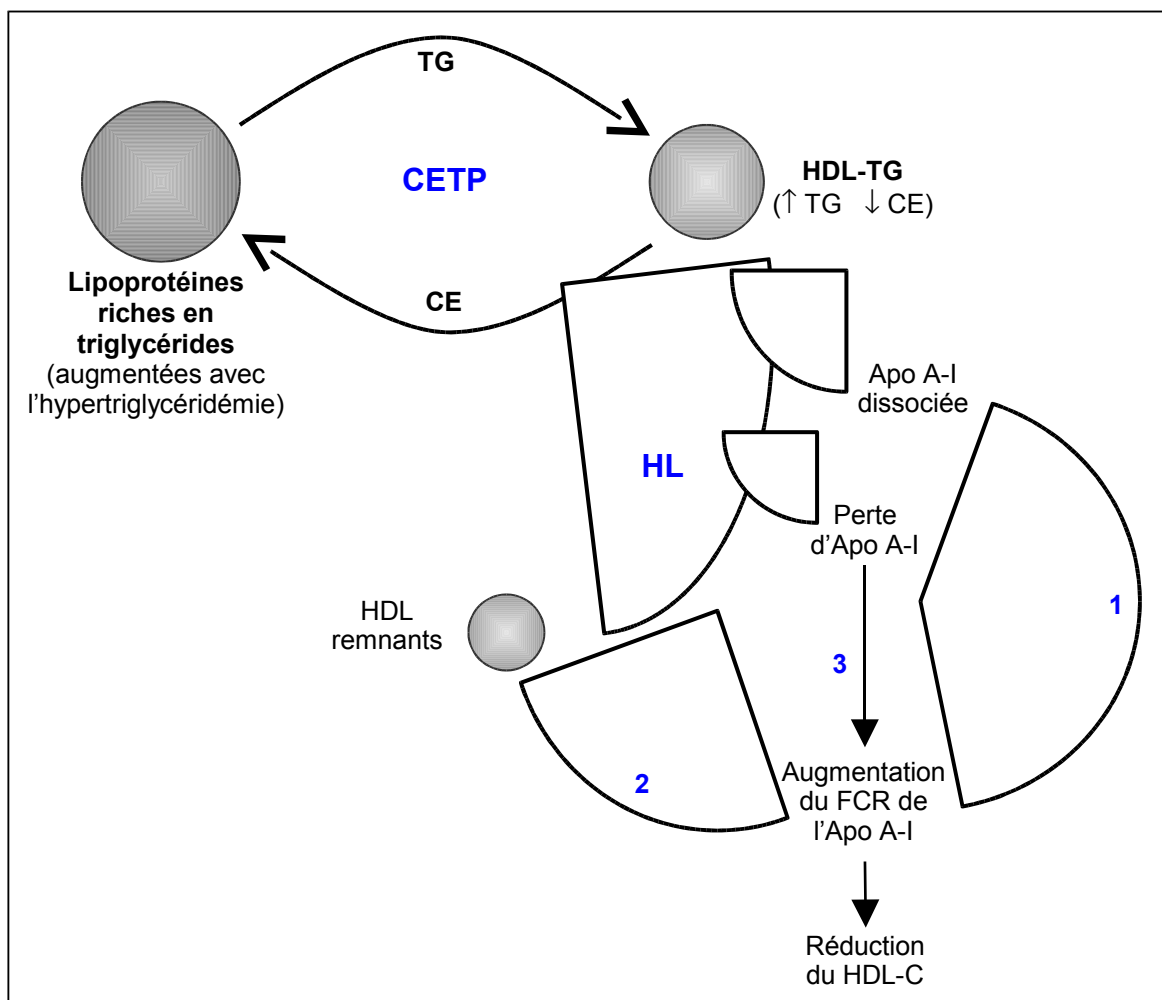


Figure 23 : Hypertriglycéridémie et métabolisme des HDL
(d'après Lamarche et al. 1999)

Les sujets hypertriglycéridémiques présentent des HDL appauvries en cholestérol estérifié et riches en triglycérides. Ces particules sont instables dans la circulation et l'Apo A-I se trouve facilement dissociée de ces complexes lipoprotéiques et peut être catabolisée par le rein qui contribue à la baisse de la concentration en Apo A-I retrouvée lors de cette pathologie (Lamarche et al., 1999). Les HDL-TG subissent aussi l'hydrolyse de la HL permettant la formation de HDL remnants entraînant là aussi une perte d'Apo A-I. En effet l'Apo A-I de ces HDL modifiées par l'hydrolyse est catabolisée plus rapidement que l'Apo A-I issue des HDL post prandiales riches en triglycérides (Rashid S. et al., 2002). Ces résultats montrent que le remodelage lipolytique des HDL-TG par la HL permet la formation de remnants de HDL qui ont un plus grand impact sur le catabolisme de l'Apo A-I.

L'ensemble de ces données souligne l'influence des activités lipasiques ainsi que de la taille et de la composition des HDL dans le contrôle de leur métabolisme.

III-2-5 Affectation de la LCAT

Deux formes de déficience génétique en LCAT ont été identifiées : la « Fish-Eye Disease » (FED) et la déficience familiale en LCAT (FLD) :

➤ *La maladie de l'œil de poisson (Fish-Eye Disease)*

La « Fish-Eye Disease » (FED) est une maladie génétique rare à transmission autosomique récessive, caractérisée dès l'enfance chez les homozygotes d'une opacification de la cornée par dépôt de cholestérol. Biologiquement, la FED se caractérise par une réduction de l'activité plasmatique de la LCAT, en particulier avec les HDL comme substrats (Kuivenhoven J.A. et al., 1997). Ces patients présentent une hypoalphalipoprotéïnémie profonde, due à une sévère diminution des concentrations plasmatiques en HDL-C et en Apo A-I et à une hypertriglycéridémie. Excepté l'opacité de la cornée, il n'y a pas de manifestations cliniques majeures observées.

➤ *La déficience familiale en LCAT (FLD)*

La déficience familiale en LCAT (FLD) se caractérise par un taux et/ou une activité plasmatique en LCAT faible ou indétectable, par le taux des esters de cholestérol des lipoprotéines réduits, par des lipoprotéines à la composition anormale et par des érythrocytes atypiques et riches en cholestérol. Les manifestations cliniques des FLD sont une opacité de la cornée, une anémie, une insuffisance rénale (Jonas A., 2000).

Rader *et al.* ont réalisé une étude cinétique sur le métabolisme des HDL chez des patients présentant une déficience en LCAT (4 patients avec une FED et 1 patient avec une FLD) (Rader D.J. et al., 1994). Ces patients sont caractérisés par une diminution de la concentration plasmatiques en Apo A-I (~30%), résultant d'une augmentation du catabolisme de cette protéine par rapport aux sujets contrôles (~2.3 fois plus important) et d'une stabilité du taux de production de l'Apo A-I. L'efflux du cholestérol n'est pas altéré et ce phénomène pourrait participer à l'absence de maladies coronaires prématurées caractéristiques des patients FED malgré leur taux en HDL-C abaissé (Elkhalil L. et al., 1997).

III-2-6 Affectation de l'ABCA1 : la maladie de Tangier

La maladie de Tangier est due la conséquence d'une mutation du gène de l'ABCA1 localisé au niveau du chromosome 9q31 (Lawn R.M. et al., 1999). Cette maladie génétique autosomale récessive est caractérisée par une absence presque complète de HDL et d'Apo A-I circulantes et par des dépôts de cholestérol estérifié dans de nombreux tissus incluant les amygdales, les ganglions lymphatiques, le foie, le rate, le thymus, l'intestin, les cellules de Schwann entraînant (splénomégalie, neuropathie, amygdales hypertrophiques orangées et hypertrophies des ganglions lymphatiques) (Oram J.F, 2002). Ces patients présentent aussi des taux plasmatiques de LDL faibles (~ 40% de la normale) et une hypertriglycémie (>300 mg/dl). Un sous groupes de patients atteints de la maladie de Tangier développe de l'athérosclérose spontanée (Hobbs H.H. et Rader D.J., 1999) ; pour les autres cas, le faible risque cardiovasculaire pourrait s'expliquer par la concentration en LDL-C réduite.

Une dégradation rapide de l'Apo A-I est responsable de cette déficience en HDL des patients Tangier. La structure de l'Apo A-I et son taux de synthèse sont normaux chez ces sujets. Donc, l'Apo A-I a une incapacité à capter le cholestérol et les phospholipides des cellules et conduit à cette défaillance en HDL et aux dépôts de cholestérol estérifié dans les tissus (Figure 24).

L'hypercatabolisme de l'Apo A-I des HDL chez des sujets homozygotes comparés à des témoins a été mis en évidence par Schaefer *et al.*, par marquage exogène des Apo A-I et A-II à l'iode ¹²⁵I (Schaefer et al., 1978). La production n'étant quant à elle pas aussi sévèrement altérée, bien que diminuée.

Les patients Tangier hétérozygotes présentent une réduction de l'Apo A-I (~30%), du HDL-C (~45%) et de l'Apo A-II (~55%). Contrairement aux patients homozygotes pour la maladie de Tangier qui ne présentent que de l'Apo A-I au niveau des pré β_1 HDL, les patients hétérozygotes ont une déplétion des HDL larges (notamment les α_1 et α_2 HDL) ; leur HDL sont donc petites, pauvres en lipides mais proportionnellement relativement enrichies en Apo A-I. Ces anomalies pourraient induire un risque cardiovasculaire élevé chez les patients hétérozygotes pour la maladie de Tangier (Asztalos B.F. et al., 2001).

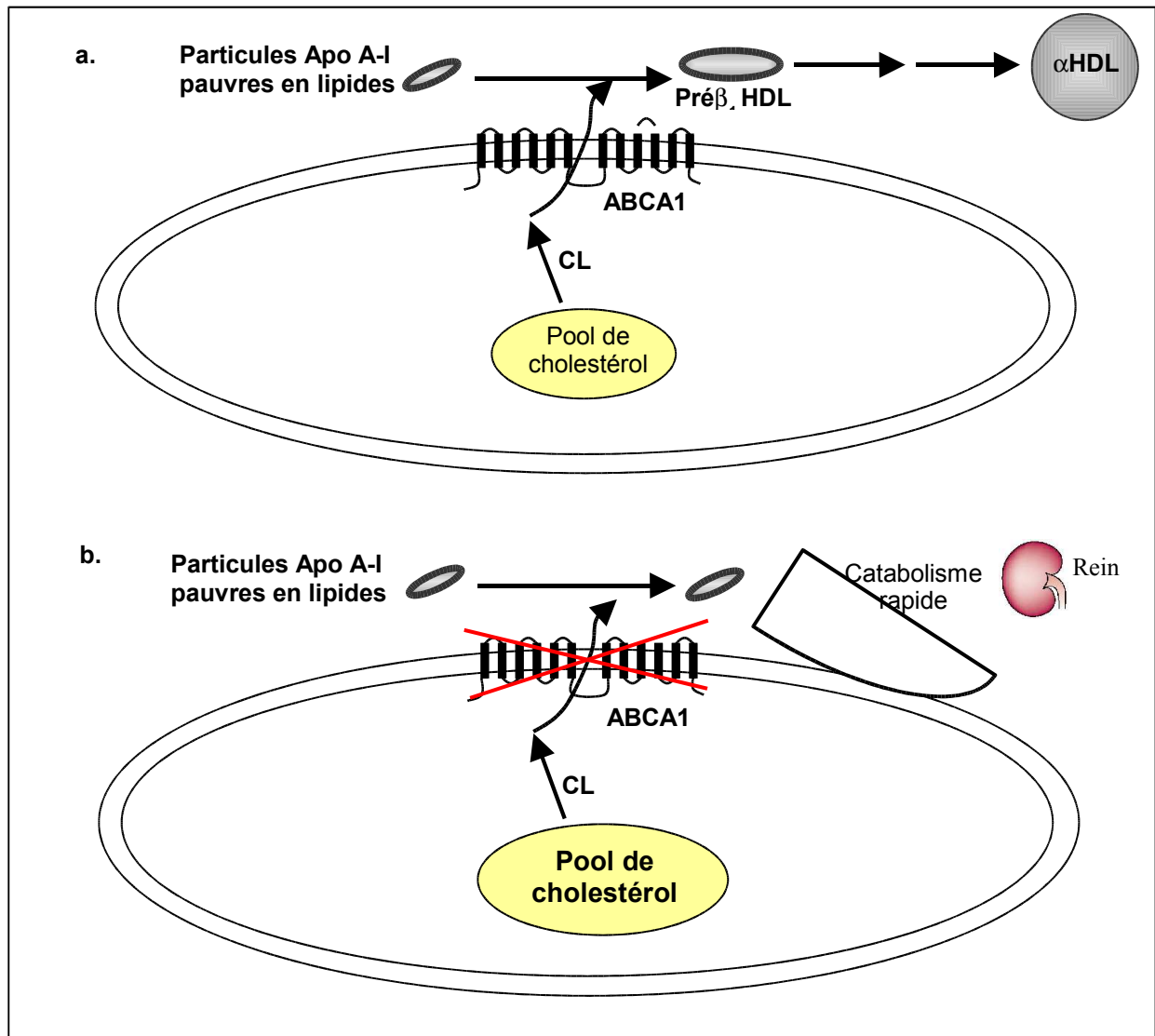


Figure 24 : Représentation schématique du métabolisme des HDL en présence (a) et en absence (b) d'efflux de cholestérol régulé par l'ABCA1

III-2-7 Affectation de la CETP

Les déficiences en CETP, fréquentes au Japon, sont caractérisées par une hyperalphalipoprotéinémie majeure. Les sujets présentant une déficience hétérozygote pour la CETP ont une réduction de 30% de la masse de l'enzyme et une augmentation de 64% du HDL-C, parallèlement les patients homozygotes ont une atténuation de 90% de la masse de la CETP et une augmentation de 200% du HDL-C et de 75% de l'Apo A-I (Asztalos B.F. et al., 2004). Ces augmentations résulteraient de l'incapacité des HDL à transférer leurs esters de cholestérol sur les lipoprotéines à Apo B. On observe de ce fait une diminution du LDL-C.

Ikewaki et al. ont réalisé une investigation cinétique chez des patients présentant une déficience en CETP hétérozygote et homozygote par marquage exogène et endogène de l'Apo A-I des HDL (Ikewaki et al., 1993). Les patients hétérozygotes ne présentent pas de variations au niveau de la concentration en Apo A-I ni au niveau de ses taux de synthèse au de catabolisme par rapport à des patients sains. Par contre, les patients homozygotes présentent une augmentation de la concentration en Apo A-I due à un défaut de catabolisme et à un taux de production inchangé par rapport aux sujets contrôles. Ce défaut de catabolisme peut s'expliquer par une accumulation de HDL riches en cholestérol estérifié mais qui sont très mal épurées du fait de leur modification de structure.

A ce jour, la CETP est une nouvelle cible thérapeutique. En effet, des inhibiteurs de l'enzyme ont été développés. Une étude récente a montré que l'utilisation de la Torcetrapid (inhibition partielle - ~33% - de l'activité de la CETP à une dose de 120mg/j) augmente les taux de HDL-C (~50%) et de l'Apo A-I (~10%) et diminue le taux de LDL-C (~17%) et de l'Apo B (~14%). La taille des lipoprotéines (HDL et LDL) se trouve aussi augmentée. L'effet de la Torcetrapid est accentué avec une prescription parallèle d'atorvastatine (Brousseau M.E. et al., 2004).

III-2-8 Hyperalphalipoprotéinémie familiale

L'hyperalphalipoprotéinémie familiale (HALF) est une affection génétique à transmission autosomale dominante, cliniquement peu expressive, mais caractérisée par une augmentation importante du HDL-C et de l'Apo A-I. Ces caractéristiques semblent conférer aux patients un véritable statut de longévité et protéger contre l'athérosclérose.

La plupart des sujets présentant une HALF ont une activité CETP normale. Afin de préciser l'étiologie de cette affection génétique, caractérisée par des signes cliniques similaires à ceux observés dans un déficit en CETP, Rader et al. ont étudié les aspects cinétiques du métabolisme de l'Apo A-I chez un patient HALF présentant une activité CETP normale

(Rader D.J. et al., 1993). Le débit de synthèse de l'Apo A-I est très significativement augmenté, son taux de catabolisme étant quant à lui peu altéré. Ces résultats suggèrent que la régulation de la production de l'Apo A-I semble être la cause principale de l'hyperalphalipoprotéïnémie. Seules des hypothèses de mutations génétiques portant sur des éléments transcriptionnels du gène de l'Apo A-I ou des éléments post-traductionnels tentent d'expliquer cette hyperproduction. Cependant la séquence primaire du gène de l'Apo A-I de ce sujet étudié n'était pas modifiée.

III-2-9 Mutation de l'Apo A-I

Plus de 40 mutations du gène de l'Apo A-I ont été décrites, correspondant à des substitutions spécifiques d'acides aminés. On distingue l'Apo A-I Milano, Marburg, Münster, Giessen, Paris ou encore l'Apo A-I Zaragoza, dénommées ainsi en fonction de la ville où elles ont été découvertes. La plupart de ces mutations ne sont pas corrélées avec un taux de HDL-C bas. Néanmoins, quelques mutations sont associées à une hypoalphalipoprotéïnémie due à une déficience en Apo A-I. Pour ne pas faire un inventaire, nous présenterons les données métaboliques obtenues suites à des études cinétiques sur des patients présentant deux de ces déficiences.

L'Apo A-I Milano est une mutation du gène de l'Apo A-I suite à une substitution de l'arginine par la cystéine, acide aminé en position 173. Cette forme mutante constitue 75 à 84% de l'Apo A-I totale chez des patients porteurs (Chiesa G. et Sirtori C.R., 2003). Tous les sujets sont hétérozygotes et sont caractérisés par des concentrations en Apo A-I et en HDL-C effondrées, et une hypertriglycémie modérée ; conditions qui sont généralement associées à un haut risque cardiovasculaire. Cependant, il ne semble pas y avoir de risque accru de la maladie coronaire. L'Apo A-I Milano a été décrite comme ayant les propriétés d'inhiber la formation des plaques d'athéromes chez les lapins (Ameli S. et al., 1994). Récemment, une étude en double-aveugle chez l'homme a confirmé cette propriété. En effet, un traitement par infusion d'un complexe d'Apo A-I Milano/phospholipides (5 doses à une semaine d'intervalle chacune) chez des sujets présentant des syndromes coronaires aigus permet une réduction significative du volume de la plaque d'athérome (~4.2%) (Nissen S.E. et al., 2003).

Roma *et al.* ont mis en évidence les perturbations cinétiques du métabolisme des HDL chez 2 sujets atteints de cette hypoalphalipoprotéïnémie comparés à 2 sujets sains, par marquage exogène des apolipoprotéines normales et mutées à l'iode ^{125}I et ^{131}I (Roma et al., 1993). Chez les sujets sains, l'Apo A-I Milano est catabolisée plus rapidement que l'Apo A-I

normale. Chez les sujets présentant la mutation, les deux formes d'Apo A-I sont catabolisées plus rapidement qu'à la normale. Dans les deux groupes, la production d'Apo A-I n'est pas altérée. De ce fait, le catabolisme est directement responsable de la faible concentration en Apo A-I chez ces patients présentant la mutation.

De plus, une étude cinétique par marquage endogène des apolipoprotéines a été réalisée sur des patients atteints d'une autre mutation de l'Apo A-I : l'Apo A-I Zaragoza caractérisée par une substitution d'une leucine par une arginine en position 144 (Recalde D. et al., 2001). Ces patients, tous hétérozygotes, présentent une réduction du HDL-C (~40%) et de l'Apo A-I (~60%), sans signes de maladies coronaires. Comme précédemment, ces patients ont un catabolisme de l'Apo A-I qui est accru et ne présentent pas de défaut au niveau de l'activité de la LCAT ou du taux d'estérification du cholestérol.

III-2-10 Conditions physiologiques

Différentes études cinétiques ont été réalisées afin de mettre en évidence les variations du métabolisme des HDL en fonction de divers conditions physiologiques telles que le sexe, les régimes alimentaires, l'exercice... ; les principaux résultats sont résumés dans le tableau 3.

Références	Patients Conditions expérimentales	Taux de catabolisme (j ⁻¹)	Taux de sécrétion (mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹)	Remarques
<u>Effet du sexe</u>				
(Brinton et al., 1994)	Hommes	0.28 ± 0.07	12.1 ± 2.8	[Apo A-I] supérieure chez les femmes.
	Femmes (~40 ans)	0.25 ± 0.08	12.0 ± 1.6	Taux de catabolisme tend à augmenter chez les hommes mais pas significativement.
(Tilly-Kiesi et al., 1997)	Hommes	0.14 ± 0.04	8.5 ± 2.7	[Apo A-I] supérieure chez les femmes. - Taille du pool identique (correction par le poids)
	femmes (~60 ans)	0.16 ± 0.04	10.9 ± 2.8	Augmentation de la sécrétion de l'Apo A-I chez les femmes (~22%)
(Vélez-Carrasco W. et al., 2000)	Hommes	0.22 ± 0.06	12.2 ± 3.6	[Apo A-I] supérieure chez les femmes.
	femmes (~60 ans)	0.20 ± 0.04	11.9 ± 2.9	Taille du pool d'Apo A-I identique (correction par le poids) - Pas de différence significative du taux de catabolisme et de sécrétion

<u>Effet de l'alimentation</u>				
	Régimes riches en			Réduction du HDL-C (~33%) et de la [Apo A-I] (~21%) due à une diminution du taux de synthèse (~26%), le taux de catabolisme étant inchangé (I)
(Shepherd et al., 1978b)	graisses saturées (S) et en graisses polyinsaturées (I)	0.31 ± 0.05 (S)	15.0 ± 1.7 (S)	
	Régimes riche (R) et pauvre (P) en graisses et en cholestérol	0.28 ± 0.03 (I)	11.1 ± 0.6 (I)	Réduction du HDL-C et de l'Apo A-I corrélée uniquement avec la baisse de la synthèse et non avec l'augmentation du catabolisme (P)
(Brinton et al., 1990)		0.23 ± 0.05 (R)	12.0 ± 2.7 (R)	
	à jeun	0.25 ± 0.06 (P)	10.3 ± 3.4 (P)	Pas de variations des paramètres cinétiques de l'Apo A-I
(Cohn J.S. et al., 1990) *	nourri	0.22 ± 0.02	11.7 ± 1.1	
		0.18 ± 0.02	10.1 ± 1.2	
(Vélez-Carrasco W. et al., 1999b) *	Régime pauvre en graisses saturées et cholestérol	0.22 ± 0.05 (av.)	12.3 ± 3.1 (av.)	Réduction du HDL-C et de la [Apo A-I] due à un défaut de synthèse
(Frenais et al., 2001b)	Régime d'AG ω3 maxEPA® – diabète de type II	0.22 ± 0.04 (ap.)	10.8 ± 2.1 (ap.)	[Apo A-I] similaire après un traitement aux ω3 - Réduction des TG plasmatiques (~23%)
		0.37 ± 0.08 (av.)	16.1 ± 3.3 (av.)	
		0.27 ± 0.09 (ap.)	12.1 ± 2.8 (ap.)	
<u>Effet de l'exercice</u>				
	Hommes en surpoids (BMI = 28 kg/m ²) - 1 an de training sans perte de poids			[Apo A-I] augmentée après 1 an d'exercice (~9%) suite à une diminution de son catabolisme et à une augmentation de son taux de synthèse - La perte de poids n'est pas nécessaire, mais sans, un effet modéré sur le HDL-C est observé
(Thompson P.D. et al., 1997)		0.23 ± 0.03 (av.)	9.0 ± 1.5 (av.)	
		0.21 ± 0.03 (ap.)	10.1 ± 1.5 (ap.)	

Tableau 3 : Variations des paramètres cinétiques du métabolisme de l'Apo A-I des HDL en fonction du sexe, de l'alimentation ou de l'exercice

* Pour les études de l'effet de l'alimentation, les auteurs ont utilisé l'enrichissement de l'Apo B100 des VLDL au plateau comme valeur d'enrichissement du pool précurseur de l'Apo A-I des HDL. Cette méthode est valide si on admet que l'Apo A-I est de synthèse exclusivement hépatique. Or, ceci n'est pas vérifié en situation post-prandiale et les taux de synthèse ou de production doivent donc être considérés avec précaution.

III-3 les hypocholestérolémiants et hypotriglycéridémiants

III-3-1 Les statines

➤ *Mécanismes d'action des statines*

Les statines présentent une structure chimique qui a en commun une séquence β -hydroxyacide avec l'HMG-CoA (Hydroxyméthyl-glutaryl Co-A), le substrat de l'HMG-CoA réductase, qui est chargée de catalyser la réaction de transformation de l'HMG-CoA en mévalonate dans l'enchaînement des réactions biochimiques responsables de la synthèse du cholestérol. Ainsi les statines inhibent de façon compétitive l'activité de l'HMG-CoA réductase en mimant la structure chimique de son substrat.

Les statines inhibent la synthèse du cholestérol dans toutes les cellules et particulièrement dans les hépatocytes. Elles entraînent ainsi la diminution de la concentration de cholestérol intracellulaire ; cette concentration régulant l'expression des gènes codant pour des protéines qui permettent d'approvisionner les cellules en cholestérol. Les cellules disposent de deux voies d'enrichissement en cholestérol : une voie endogène permettant une synthèse de novo de cholestérol à partir de l'acétyl CoA (où l'HMG-CoA réductase intervient en convertissant l'HMG-CoA en mévalonate) et une voie exogène utilisant l'apport de cholestérol extracellulaire dans la cellule par la capture, l'internalisation et la dégradation des LDL. En diminuant les concentrations de cholestérol intracellulaire, les statines entraînent l'augmentation de l'expression des gènes qui codent pour certaines enzymes responsables de la synthèse du cholestérol (HMG-CoA synthase, HMG-CoA réductase), mais aussi du gène codant pour le LDL-récepteur (figure 25).

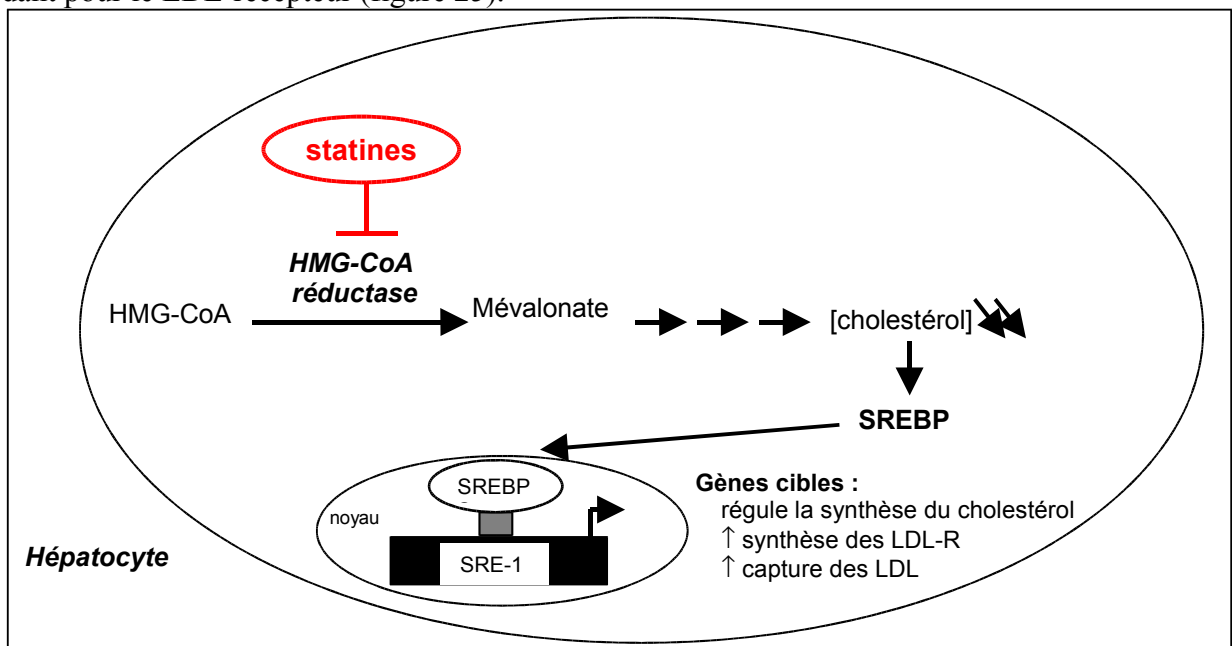


Figure 25 : Mécanisme d'action des statines

SREBP : Sterol regulatory element binding protein
SRE-1 : Sterol regulatory element - 1

L'augmentation du nombre de ces récepteurs à la surface des hépatocytes permet l'entrée de nombreuses LDL dans les cellules hépatiques et leur dégradation. Il en résulte une diminution du nombre des LDL circulantes et de la concentration du LDL-cholestérol. Ce cholestérol sera éliminé de l'organisme par les selles.

➤ *Effets des statines sur le métabolisme des HDL*

L'effet majeur des statines est, comme nous venons de le voir, de diminuer le LDL-cholestérol de 20 à 50% selon les molécules utilisées. Dans ces conditions, le cholestérol total diminue de 15 à 40% et les triglycérides de 5 à 30%. Les effets sur le HDL-cholestérol vont d'une légère réduction non-significative à une augmentation significative (~9%).

Plusieurs investigations cinétiques ont été mises en place pour étudier les effets des statines (atorvastatine ou pravastatine) sur les paramètres cinétiques de l'Apo A-I des HDL. La plupart de ces études ne montrent pas d'effets significatifs sur les paramètres cinétiques de l'Apo A-I (taux de synthèse, de catabolisme ou concentration) chez des patients sains ou présentant des dyslipidémies (Schaefer J.R. et al., 1999), (Watts G.F. et al., 2003), (Bilz S. et al., 2004).

III-3-2 Les fibrates

➤ *Mécanismes d'action des fibrates*

Les fibrates sont des activateurs des récepteurs nucléaires du type PPAR α . Les PPAR constituent une sous-famille de la grande famille des récepteurs nucléaires. Il existe trois types de PPAR : α , β , γ , chacun étant codé par un gène spécifique et distribué de façon différente chez l'homme. Lorsqu'ils sont activés, les PPARs s'hétérodimérisent avec un autre récepteur nucléaire, RXR qui a pour ligand l'acide 9-*cis* rétinoïque. L'hétérodimère PPAR α /RXR α modifie la transcription des gènes présentant dans leur promoteur une séquence de type PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element), correspondant à une répétition de deux motifs hexamériques de reconnaissance de l'ADN (AGGTCA) séparés par un ou deux nucléotides (Figure 26).

Les effets des fibrates sur le métabolisme des lipoprotéines sont en partie dus à 3 actions majeures :

- La stimulation des PPAR α par les fibrates conduit à une stimulation de gènes intervenant lors des différentes étapes du catabolisme oxydatif des acides gras, particulièrement au niveau du foie, et réduisant ainsi la quantité d'acides gras disponibles pour la synthèse et la sécrétion des triglycérides des VLDL.

- De plus, les fibrates stimulent l'hydrolyse intravasculaire des triglycérides des chylomicrons et des VLDL en modulant l'expression des gènes qui contrôlent la lipolyse : stimulation de l'expression de la LPL et inhibition de l'expression de l'Apo C-III.
- Finalement, les fibrates augmentent la concentration du HDL-C en activant la synthèse de l'Apo A-I et Apo A-II.

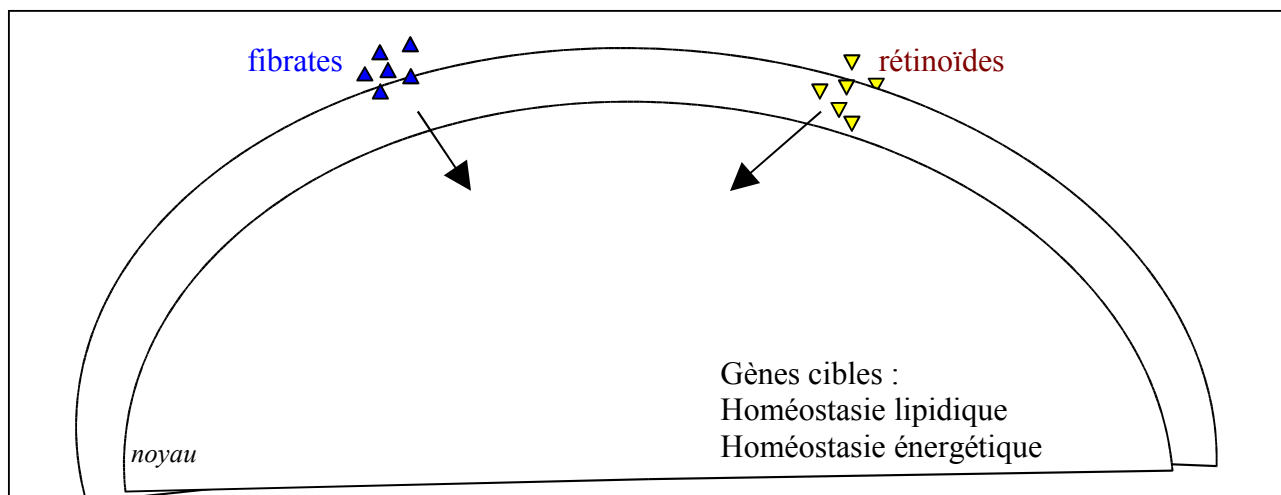


Figure 26 : Mécanisme d'action des fibrates

➤ Effets des fibrates sur le métabolisme des HDL

Les fibrates augmentent la synthèse de l'Apo A-I en se liant à PPAR α et en permettant la liaison de ce facteur nucléaire sur un PPRE localisé dans le site A de l'enhancer du promoteur (Staels B. et al., 1998). Le gène de l'Apo A-II présente une séquence PPRE dans son site J localisé dans le promoteur de son gène.

Des études cinétiques ont permis de mettre en évidence que, chez l'homme, l'action des fibrates augmente les concentrations plasmatiques du HDL-C (~10 à 15 %). Les effets du fénofibrate chez des patients présentant un syndrome métabolique (Watts G.F. et al., 2003) ou une hyperlipémie mixte (Bilz S. et al., 2004) ont montré une stimulation plus importante au niveau de la production de l'Apo A-I que de son catabolisme ; ce qui entraîne une augmentation de la concentration plasmatique de l'Apo A-I.

De plus, un traitement aux fibrates (bézafibrate) semblent augmenter la concentration des pré β_1 HDL au dépend de la concentration des HDL $_2$ (augmentation et réduction ~30%, respectivement). Ces variations de concentration s'accompagnent d'une augmentation de l'activité de la HL (~24%) (Miida T. et al., 2000b).

III-4 Conclusion

L'ensemble de ces études, dont les principaux résultats sont résumés dans le tableau 4, apporte un grand nombre d'informations relatives aux variations du métabolisme des HDL et leurs répercussions sur le développement de l'athérosclérose.

Référence	Patients	[Apo A-I]	Taux de catabolisme	Taux de synthèse	Remarques
<i>Golay 1987</i>					Corrélation FCR / TG
<i>Frenais 1997</i>	Diabète de type II	↓	↑	→	plasmatiques et HDL-TG
	Obèses				pas d'effet de l'insuline
<i>Pont 2002</i>	insulinorésistants	↓	↑	→	sur l'Apo A-I
<i>Pietsch</i>	Intolérance au glucose	↓	↑	→	-
<i>Shaefer 1992</i>	FH homozygote	↓	↑	↓	-
					Pas d'effets majeurs
<i>Fenais 1999</i>	FH hétérozygote	→	↑	↑	d'une LDL-aphérese sur l'Apo A-I
<i>Lamarche 1999</i>	Hypertriglycémie	↓	↑	→	-
<i>Rader 1994</i>					Pas d'altération de l'efflux
<i>Elkhalil 1997</i>	Fish-eye disease	↓	↑	→	du cholestérol
<i>Schaefer 1978</i>	Maladie de Tangier	↓	↑↑	↓	-
<i>Ikewaki 1993</i>	Déficiencia en CETP	↑	↓	→	≠ pour les homozygotes pas de variations pour les hétérozygotes

<i>Rader 1993</i>	Hyper- α lipoprotéïnémie	↑	↓	↑↑	Pas d'altération de la CETP
<i>Roma 1993</i>	Mutation de l'Apo A-I				
<i>Recalde 2001</i>	(Milano – Zaragoza)	↓	↑	→	-
<i>Schaefer 1999</i>					
<i>Watts 2003</i>	Effets des statines	→	→	→	-
<i>Bilz 2004</i>					
<i>Miida 2000</i>					Augmentation de la
<i>Watts 2003</i>	Effets des fibrates	↑	↑	↑↑	concentration des
<i>Bilz 2004</i>					pré β ¹ HDL

Tableau 4 : Variations des paramètres cinétiques du métabolisme de l'Apo A-I des HDL dans diverses situations pathologiques

Il est intéressant de noter que des faibles concentrations en HDL-C et Apo A-I ne sont pas systématiquement à l'origine de maladies cardio-vasculaires précoces, comme en attestent la *Fish-Eye Disease*, la maladie de Tangier ou encore les mutations de l'Apo A-I. Une explication potentielle à ce paradoxe pourrait être l'hypercatabolisme des HDL accompagnée d'une production normale ou légèrement diminuée de ces particules. Ainsi ces situations d'hypoalphalipoprotéïnémie suggère qu'une augmentation du taux de renouvellement des HDL a un effet protecteur contre l'athérosclérose, probablement par augmentation du transport reverse du cholestérol.

L'ensemble des paramètres cinétiques du renouvellement des HDL est sous le contrôle plus ou moins direct d'un certain nombre de facteurs tels que l'activité des enzymes et des transporteurs de lipides, le profil lipidique et physiologique des patients ou encore la taille et la composition des HDL. Toutefois, la totalité des investigations cinétiques sont réalisées à partir de HDL isolées par ultracentrifugation, technique standard d'isolation des lipoprotéines. Mais l'hétérogénéité des HDL est dramatiquement perturbée lors d'ultracentrifugations répétées. En effet, l'instabilité de ces lipoprotéines et la perte de molécules d'Apo A-I sont décrites durant ce processus de séparation. De plus des sous-fractions entières peuvent ne pas être récupérées avec le pool de HDL, comme c'est le cas des pré β_1 HDL.

L'utilisation de techniques plus douces de séparation qui respectent l'intégrité des lipoprotéines pourrait apporter plus d'informations sur le métabolisme des HDL *in vivo* lors d'approches utilisant les isotopes stables.

L'objectif de ce travail a été de mettre au point l'utilisation d'une méthode de gel filtration (système FPLC), en remplacement de l'ultracentrifugation, dans le but de mesurer des enrichissements isotopiques au sein des HDL en vue de la modélisation de leur métabolisme. Grâce à ces premiers travaux, des enrichissements distincts au niveau des pré β_1 HDL (précurseurs) et des α HDL (matures) ont pu être détectés et un nouveau modèle d'étude a pu être mis en place prenant en compte cette hétérogénéité. Ce modèle à deux compartiments distincts nous a permis d'étudier les taux d'interconversion entre les pré β_1 et les α HDL et donc le remodelage de ces lipoparticules.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à étayer les données cinétiques portant sur le métabolisme des HDL lors d'un diabète de type II. Ces patients sont caractérisés par une dérégulation du bilan lipidique (hypertriglycémie) associée à une concentration plasmatique de l'Apo A-I diminuée en réponse à un catabolisme accru. Les précédentes études cinétiques ont été réalisées sur un pool d'HDL total isolé par ultracentrifugation. Dans ce travail, nous avons étudié le métabolisme des pré β_1 et les α HDL lors de cette pathologie.

Lors d'un dernier travail, nous nous sommes intéressés au métabolisme des pré β_1 HDL et α HDL en période de jeun ou en situation post-prandiale. Cette étude avait pour but de d'estimer une possible contribution de l'intestin dans la synthèse de l'Apo A-I.

ETUDE 1 : The differential Apo A-I enrichment of pre β_1 and α HDL is detectable by gel filtration

M. Chétiveaux, H. Nazih, V. Ferchaud-Roucher, G. Lambert, Y. Zaïr, M. Masson, K. Ouguerram, D. Bouhours et M. Krempf

J.Lipid.Res. 2002, **43** : 1986-1993

L'objectif de notre étude a été de mettre au point une méthode utilisant la FPLC pour la purification des sous-populations de HDL et leur analyse lors d'exploration cinétique par traceurs stables. Le système FPLC était composé d'une colonne Superdex 200 (séparation optimale des protéines de 10 à 600 kDa). Des prélèvements plasmatiques horaires de 5 patients perfusés à la leucine trideutérée pendant 14 heures ont été analysés. Après séparation par électrophorèse et hydrolyse acide, l'enrichissement de l'Apo A-I en marqueur a été évalué par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Le système FPLC permettait la détection de deux sous-populations de HDL : les α HDL correspondant aux lipoprotéines matures (HDL₂ et HDL₃) et les pré β_1 HDL, précurseur des HDL. Parallèlement, les HDL totales étaient aussi séparées par ultracentrifugation (HDL-UC). Les pré β_1 HDL présentaient des valeurs d'enrichissement supérieures à celles des α HDL. Les enrichissements en leucine supérieurs retrouvés pour les HDL-UC par rapport aux α HDL suggèrent l'existence d'un mélange de sous classes d'Apo A-I-HDL après ultracentrifugation. Cette méthode de séparation permet de distinguer les enrichissements de l'Apo A-I des pré β_1 et des α HDL des HDL totales préalablement utilisées lors d'investigations cinétiques. Les analyses du métabolisme des HDL devraient dès lors être plus précises et approfondies.

Annexes

Grâce aux conditions douces de la FPLC, les lipoprotéines isolées peuvent être considérées comme natives. Par contre, l'ensemble des protéines plasmatiques sont elles aussi conservées et une autre protéine que l'Apo A-I avoisinant les 28 KDa pourraient être éluée au niveau des fractions FPLC des HDL et co-migrée avec l'Apo A-I sur le gel SDS-PAGE contribuant ainsi au marquage isotopique et faussant les résultats d'enrichissement. Il est donc nécessaire de mettre en évidence la pureté de la bande d'Apo A-I excisée du gel pour l'analyse. Nous avons donc réalisé pour cela plusieurs expériences.

(1) Immunoprécipitation de l'Apo A-I

Notre première expérience a été de tester une immunoprécipitation de l'Apo A-I des sous populations de HDL dans le but de vérifier qu'aucune autre protéine de 28 KDa, pouvant co-migrer avec l'Apo A-I, était présente dans les échantillons.

Pour l'immunoprécipitation, les α HDL et les pré β_1 HDL ont été incubées avec un anticorps anti-Apo A-I. Après cette première incubation, de la protéine A Agarose qui a la propriété de lier les immunoglobulines, est ajoutée aux échantillons. Le complexe protéine A Agarose - anticorps anti-A-I - Apo A-I est précipité par centrifugation et le surnageant, considéré sans Apo A-I, est analysé par gel SDS-PAGE et immunoblot.

Malheureusement avec ce procédé, l'Apo A-I ne peut pas être retirée de l'échantillon à 100% et l'anticorps primaire n'est pas précipité lui aussi dans sa totalité. Cette immunoprécipitation ne peut pas être réalisée en augmentant la quantité du premier anticorps et de la protéine A Agarose ; en effet le premier anticorps en excès pourrait se retrouver au niveau du surnageant et les chaînes légères d'immunoglobulines migrer aux environs de l'Apo A-I et interférer avec le résultat du gel SDS-PAGE et de l'immunoblot.

(2) Gel bidimensionnel en conditions dénaturantes

La technique de gel bidimensionnel en conditions dénaturantes permet la séparation des protéines selon deux dimensions : la première dimension qui est une isoélectrofocalisation permet la séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI). La deuxième dimension permet la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire sur un gel SDS-PAGE.

Cette technique a été réalisée pour déterminer si une autre protéine de 28 KDa avec un pI différent de l'Apo A-I pouvait contaminer les données d'enrichissement isotopique de l'Apo A-I.

Pour les fractions pré β_1 HDL et α HDL, aucune protéine a été observée avec le même poids moléculaire que l'Apo A-I et un pI différent.

Par contre, au niveau des α HDL, les chaînes légères d'immunoglobulines ont une migration assez proche de l'Apo A-I et pourraient interférer avec elle en cas de problème de migration sur les gels SDS-PAGE. Pour extraire les immunoglobulines des α HDL, l'échantillon est incubé avec la protéine A Agarose. Le complexe immunoglobuline – protéine A Agarose est précipité et le surnageant, sans immunoglobulines, est analysé. Même si l'extraction des immunoglobulines n'est pas totale, les valeurs d'enrichissement de l'Apo A-I en traceur devraient varier si contamination il y a. Des enrichissements isotopiques identiques sont retrouvés pour l'Apo A-I avec ou sans traitement à la protéine A Agarose. Donc, nous avons pu conclure que l'Apo A-I-HDL n'était pas contaminée par les chaînes légères d'immunoglobulines.

(3) Analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

Pour confirmer la pureté de la bande d'Apo A-I, nous avons analysé les sous populations de HDL en LC-MS, méthode combinée déjà décrite pour l'identification des protéines majoritaires des HDL (Watkins L.K. et al., 1999).

Pour le cas des pré β_1 HDL, le chromatogramme est caractérisé par quatre pics (Figure 27), correspondant à des spectres de masse de quatre molécules protonées. Grâce au rapport m/z des molécules, le poids moléculaire de chaque composé est estimé par à un système de déconvolution.

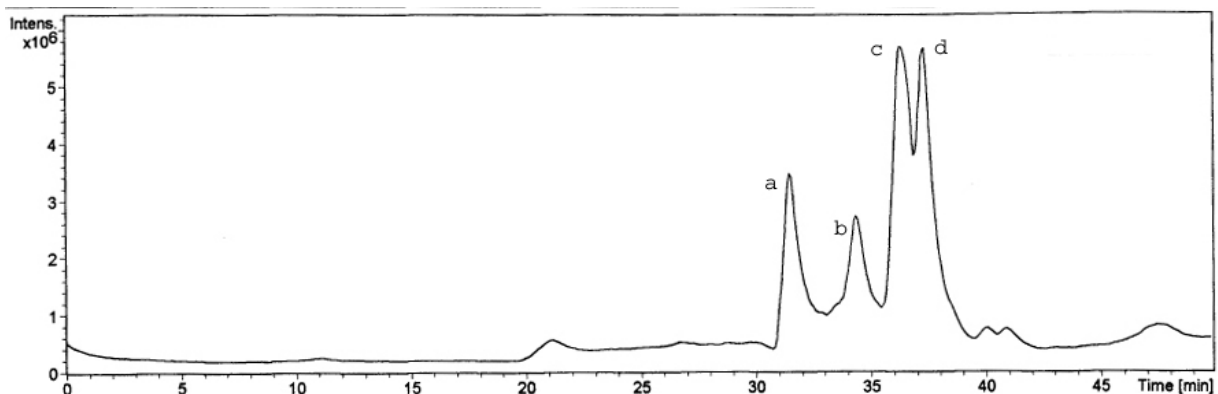


Figure 27 : Chromatogramme des pré β_1 HDL

Les quatre protéines majoritaires des pré β_1 HDL sont : l'albumine (66441 Da), la pro-albumine (13845 Da) et l'Apo A-I (28108 et 28088 Da) (Figure 28). Cette identification se base sur les spectres et les poids moléculaires des composés et a été confirmée grâce à des banques de données. Un standard d'Apo A-I a aussi été analysé dans les mêmes conditions que les sous-fractions de HDL. Là aussi deux spectres différents pour l'Apo A-I existent, probablement deux formes redox générées pendant la préparation des échantillons (Hughes T.A. et al., 1988).

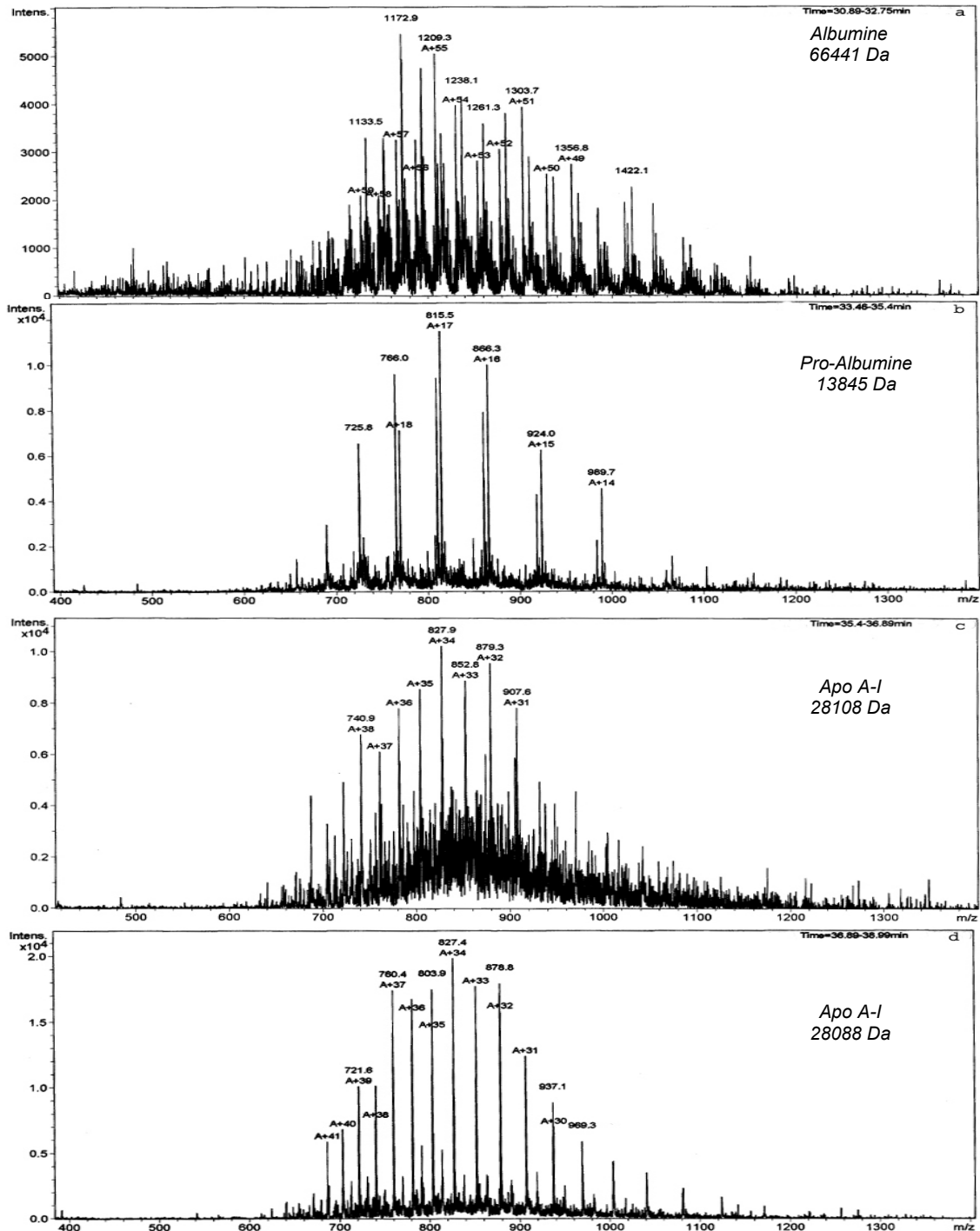


Figure 28 : Spectres de masse de l'albumine (a), la pro-albumine (b) et l'Apo A-I (c et d) présentes au sein des pré β_1 HDL

Discussion

Ce travail a permis de développer une nouvelle technique de séparation des HDL en vue de leur exploration cinétique : la FPLC. Les précédentes études cinétiques étaient réalisées à partir de HDL isolées par ultracentrifugation, du point de vue hétérogénéité cette méthode standard de séparation des lipoprotéines permet l'isolation des HDL₂ et des HDL₃. La FPLC, elle, peut conduire à la séparation des pré β_1 HDL et des α HDL (assimilables aux HDL matures ou HDL₂ et HDL₃) et permet la mesure distincte d'enrichissement isotopique pour ces deux sous classes de lipoparticules.

La linéarité, la reproductibilité et la sensibilité de la technique FPLC ont été largement décrites pour la séparation des lipoprotéines. Contrairement à l'ultracentrifugation, pendant la FPLC les échantillons ne sont pas soumis à de fortes forces centrifuges et concentrations de sels conduisant à l'isolation de HDL natives.

Des études sur les conditions extrêmes de l'ultracentrifugation ont été réalisées et ont permis de mettre en évidence qu'environ 35% de l'Apo A-I de surface pouvait être perdue à la suite d'ultracentrifugations répétées (Cheung M.C. et Wolf A.C., 1988; Kunitake S.T. et Kane J.P., 1982). La perte de l'Apo A-I de surface n'est pas le seul fait décrit. En effet, l'hétérogénéité des HDL est aussi altérée (Asztalos B.F. et al., 1993). Il semble donc que si l'ultracentrifugation modifie l'intégrité des lipoprotéines et la distribution de l'Apo A-I, cela pourrait avoir des conséquences directes sur les études métaboliques (Rudel L.L. et Kesäniemi A.A., 1999).

Dans notre étude nous avons émis l'hypothèse que l'Apo A-I analysée après ultracentrifugation pouvait ne pas provenir uniquement des HDL matures, mais prendre en compte aussi les molécules d'Apo A-I arrachées à la surface des particules pendant le processus de séparation. Ainsi, les valeurs d'enrichissement en traceur de l'Apo A-I des HDL-UC pourraient être surestimées.

L'analyse séparée des pré β_1 et des α HDL devrait permettre d'avoir accès à de nouveaux paramètres cinétiques du métabolisme des HDL tels que les flux d'interconversion entre les deux sous fractions reflétant le recyclage des HDL. Pour cela, un nouveau modèle prenant en compte cette hétérogénéité doit être créé.

ETUDE 2 : New model for kinetic studies of HDL metabolism in humans

III. M. Chétiveaux, K. Ouguerram, Y. Zair, P. Maugère, I. Falconi, H. Nazih et M. Krempf

Eur.J.Clin.Invest. 2004, **34** : 262-267

L'objectif de notre étude a été de développer un nouveau modèle pour les études cinétiques de l'Apo A-I des pré β_1 HDL et α HDL isolées par FPLC. Les paramètres cinétiques de l'Apo A-I-HDL, marquée par un isotope stable, ont été étudiés chez six sujets sains ayant reçu une perfusion continue de leucine trideutérée. L'analyse cinétique des valeurs d'enrichissement de l'Apo A-I a été réalisée grâce à un modèle multi-compartimental. Ce modèle, composé de deux compartiments distincts pour les pré β_1 HDL et les α HDL, permettait d'estimer les taux de synthèse, catabolisme et interconversion de ces deux sous classes de lipoparticules. Le taux de conversion des pré β_1 HDL en α HDL était 10 fois plus rapide que celui du remodelage des α HDL en pré β_1 HDL. Le FCR de l'Apo A-I des HDL totales isolées par ultracentrifugation estimé par un modèle mono-compartimental n'était pas significativement différent du FCR de l'Apo A-I des α HDL calculé à partir de ce nouveau modèle. Cette étude est la première à décrire un modèle permettant d'étudier le recyclage des HDL.

Discussion

Les différences d'enrichissement de l'Apo A-I des pré β_1 HDL et des α HDL ont permis le développement d'un model multi-compartimental basé sur les liens métaboliques existants entre ces lipoparticules décrits dans la littérature. Les pré β_1 HDL, lipoparticules précurseurs synthétisées par le foie, incorpore le cholestérol des cellules périphériques et sont maturées progressivement en α HDL. Ces lipoprotéines subissent à leur tour un phénomène de recyclage, sous la dépendance de différentes activités enzymatiques, pouvant redonner des pré β_1 HDL. Parallèlement à ce recyclage, l'Apo A-I peut subir un catabolisme plus ou moins important.

Du point de vue de la modélisation, l'évaluation des paramètres cinétiques de l'Apo A-I des pré β_1 HDL et des α HDL impose la connaissance de l'enrichissement à l'équilibre du pool d'acides aminés précurseurs de sa synthèse. Comme l'Apo A-I est une protéine à renouvellement lent, expérimentalement les valeurs d'enrichissement n'atteignent pas le plateau isotopique dans nos conditions de perfusion. En outre, la valeur du plateau d'enrichissement isotopique de la leucine dans le plasma n'a pas été retenue car elle ne constituait pas un bon reflet de l'enrichissement de la leucine intracellulaire. En effet, l'enrichissement isotopique du traceur au niveau du plasma ne peut constituer l'enrichissement idéal du pool précurseur de la synthèse protéique hépatique. En période de jeun (comme observé dans nos conditions expérimentales), il convient d'admettre que la synthèse d'Apo A-I est majoritairement hépatique. L'Apo B100 des VLDL semble donc être un bon choix pour estimer le pool précurseur de leucine de la synthèse de l'Apo A-I sous ces conditions. En effet, l'Apo B100 est une protéine de synthèse hépatique et au sein des VLDL a un renouvellement rapide. Ce précurseur est, à ce jour, largement utilisé pour l'estimation du taux de renouvellement des HDL.

Cependant, utilisé le plateau d'enrichissement de la proApo A-I à la place du plateau de l'Apo B100 des VLDL pour calculer les paramètres cinétiques de l'Apo A-I semble plus exact car la proApo A-I est bien le précurseur direct de l'Apo A-I mature. Batal *et al.* ont été les premiers et les seuls à utiliser la proApo A-I comme pool précurseur (Batal et al. 1999). Dans cette étude, les valeurs d'enrichissement de la proApo A-I atteignent un plateau durant une perfusion continue de traceur de 12h. Ce plateau est égal à 80% de celui de l'Apo B100 des VLDL et peut être assimilée à l'enrichissement du pool précurseur d'acides aminés intestinal et hépatique duquel la proApo A-I est dérivée. Dans le même sens que la valeur du plateau de l'Apo B100 des VLDL peut représenter l'enrichissement du pool précurseur d'acides aminés

hépatique. Depuis cette étude, aucun autre travail n'a utilisé la proApo A-I comme pool précurseur de la synthèse de l'Apo A-I, des techniques trop lourdes en sont peut être la cause.

Bien que la limite de la perfusion continue d'isotope stable soit la connaissance de l'enrichissement isotopique du précurseur, l'avantage majeur de cette technique est que le problème du recyclage du traceur est largement minimisé.

Le modèle multi-compartimental décrit dans cette étude pourrait paraître un peu trop complexe pour une investigation sous 14h. En effet, plusieurs paramètres comme les échanges du pool de HDL plasmatiques avec un pool extravasculaire ne peuvent être pris en compte. Le taux de catabolisme pour le compartiment de $\text{pr}\beta_1$ HDL ($k(0,1)$) n'a pas pu non plus être défini lors de nos simulations. Le fait de ne pas le prendre en compte ne changeait en rien les valeurs de autres paramètres cinétiques et permettait de mieux considérer les points expérimentaux. A ce jour, la majorité des études cinétiques est réalisée sous 14h. Même si certains paramètres sont incertains, ce modèle permet d'estimer les taux de conversion entre les $\text{pr}\beta_1$ HDL et les α HDL et donc, sous des conditions expérimentales identiques, de comparer l'effet de pathologie sur le remodelage des HDL.

Ces premiers résultats ont été obtenus chez des patients sains, il semble donc nécessaire d'étudier les variations des paramètres cinétiques des $\text{pr}\beta_1$ HDL et α HDL lors d'une perturbation métabolique. Nous nous sommes intéressés au diabète de type II, pathologie déjà explorée par notre groupe.

ETUDE 3 : Kinetics of pre β_1 HDL and α HDL in type II diabetic patients

-

M. Chétiveaux, F. Lalanne, G. Lambert, Y. Zaïr, K. Ouguerram et
M. Krempf

Soumis à J.Clin.Endocrinol.Metabol.



L'objectif de notre étude était de caractériser le métabolisme des pré β_1 HDL et α HDL chez des 6 patients présentant un diabète de type II vs. 6 sujets témoins lors d'une exploration cinétique. Des prélèvements plasmatiques des 12 patients perfusés avec de la leucine trideutérée pendant 14 heures ont été analysés. La purification des sous-populations de HDL a été réalisée par FPLC et l'enrichissement de l'Apo A-I en traceur a été évalué par GC-MS. L'analyse cinétique a été réalisée grâce au logiciel SAAM II. La concentration plasmatique de l'Apo A-I était réduite chez les patients diabétiques, résultant d'une diminution significative de l'Apo A-I dans les α HDL mais sans variation dans les pré β_1 HDL, bien que la contribution relative de l'Apo A-I au sein de cette dernière sous classes soit significativement augmentée. Ces sujets présentaient aussi une hypertriglycémie et une réduction du HDL cholestérol. Les flux de conversion entre les pré β_1 et les α HDL ont été estimés par un modèle multi-compartimental. Le taux de conversion des pré β_1 en α HDL n'était pas significativement différent, mais la formation des pré β_1 à partir des α HDL était augmentée chez les diabétiques de 60%. Le catabolisme de l'Apo A-I était significativement accéléré chez les patients diabétiques comparés aux témoins. Cette exploration plus complète confirme premièrement que la réduction du HDL cholestérol et de l'Apo A-I lors d'un diabète de type II est essentiellement due à son catabolisme accru et suggère aussi que l'augmentation caractéristique des pré β_1 HDL chez les patients diabétiques est liée à une augmentation du recyclage des α HDL en pré β_1 HDL.

Kinetics of pre β_1 HDL and α HDL in type II diabetic patients

M. Chétiveaux¹, F. Lalanne¹, G. Lambert¹, Y. Zair^{1,2}, K. Ouguerram¹ and M. Krempf^{1,2}

1 : Inserm U539, Centre de Recherche en Nutrition Humaine, CHU Hôtel Dieu, Nantes, France.

2 : Clinique d'Endocrinologie, Maladies Métaboliques. Nutrition, CHU Hôtel-Dieu, Nantes, France.

Correspondence:

Michel Krempf

Endocrinologie et Nutrition - Hôtel Dieu

44093 Nantes Cedex 01 France

33 (0)2 40 08 30 73

Fax : 33 (0)2 40 08 30 79

E-Mail : mkrempf@sante.univ-nantes.fr

Keywords : type II diabetes, FPLC, apolipoprotein A-I, pre β_1 HDL, α HDL, kinetic models

ABSTRACT

The aim of this study was to analyse the recycling of HDL in 6 type II diabetic patients compared with 6 control subjects by endogenous labelling of apolipoprotein A-I (Apo A-I) with stable isotope. Apo A-I-HDL kinetics were modelled with a multicompartamental model. Pre β_1 and α HDL were separated by FPLC. Plasma Apo A-I concentration was decreased in patients with type II diabetes as a result of a decrease in Apo A-I- α HDL ($p < 0.05$) and a non significant increase of Apo A-I-pre β_1 HDL. Diabetic patients were characterised by an increase of the relative contribution of Apo A-I in pre β_1 HDL ($18.3 \pm 2.8\%$ vs. $11.9 \pm 3.7\%$, $p < 0.01$). The synthetic rate of pre β_1 HDL was slightly increased in diabetic patients compared with control (NS) and an increase of recycling rate of α to pre β_1 HDL was observed ($11.67 \pm 3.14 \text{ d}^{-1}$ vs. $7.09 \pm 4.51 \text{ d}^{-1}$, $p < 0.05$). The clearance rate of Apo A-I was higher in diabetic patients ($p < 0.05$ for Apo A-I-pre β_1 HDL and $p < 0.005$ for Apo A-I- α HDL). This study suggest that the usual increase in pre β_1 HDL in type II diabetic patients is mainly related to an increase of the recycling rate of α to pre β_1 HDL.

INTRODUCTION

Diabetic patients have an increased risk for atherosclerosis (32). The most common profile of dyslipidemia in type II diabetic patients is an increase of plasma triglycerides (TG) associated with a decrease of high density lipoprotein cholesterol concentration (HDL-C). Apolipoprotein A-I (Apo A-I), the main HDL apolipoprotein, is decreased in type II diabetic patients (26). Plasma HDL-C or Apo A-I concentrations are inversely correlated with the incidence of coronary artery disease (11). The decrease of Apo A-I plasma pool size observed in type II diabetic patients was related to a major increase of Apo A-I-HDL fractional catabolic rate (FCR) (10). Endogenous labelling of Apo A-I using stable isotopes is an established method in kinetic studies for studying *in vivo* metabolism of HDL. Kinetics of Apo A-I-HDL in humans have been usually investigated using total HDL isolated by sequential ultracentrifugation. In previous works, we have used a new method (FPLC) and developed a new compartmental model for kinetic studies (4;5), which assess the analyse of precursor $\text{pre}\beta_1$ HDL and mature α HDL metabolism and the conversion rate between these subclasses. Indeed, $\text{pre}\beta_1$ HDL are considered as the initial acceptor of cellular cholesterol and are transformed into spherical α HDL as a result of the lecithin : cholesterol acyltransferase (LCAT) activity. Nascent discoidal $\text{pre}\beta_1$ HDL are either directly synthesised by the liver and the intestine or

generated α HDL by hepatic lipase (HL), cholesteryl ester transfer protein (CETP) and phospholipids transfer protein (PLTP) (29). Increases in $\text{pre}\beta_1$ HDL have been previously described in hypertriglyceridemic individuals (17) and in patients with obesity, insulin resistance or type II diabetes (24;30). It is unclear whether this represents a decrease of the conversion of $\text{pre}\beta_1$ HDL into α HDL or an increase of the recycling of α HDL to $\text{pre}\beta_1$ HDL. The aim of this investigation was to address this issue in patients with type II diabetes. We showed that these patients were characterised by a lower plasma Apo A-I level related to an increase of direct catabolism of Apo A-I-HDL and by an higher in $\text{pre}\beta_1$ HDL level associated with an increase in the conversion rate of α HDL to $\text{pre}\beta_1$ HDL.

IV. EXPERIMENTAL

Experimental protocol

The experimental protocol was approved by the ethic committee of the Nantes University Hospital and written consents were obtained from each volunteer before inclusion in the study. The kinetic study of Apo A-I metabolism was performed in 6 healthy, normolipidaemic subjects with normal glucose tolerance and 6 patients with type II diabetes. Diabetic patients ($HbA_{1c} = 8.0 \pm 1.3\%$) were treated with either sulfonylureas or biguanides for at least three months, and the same treatment was maintained for the duration of the study. Insulin treatment was an exclusion criterion. All control subjects were in good health and were taking no medication that could affect lipid metabolism. Relevant clinical characteristics of the two groups are shown in Table I. They were asked to consume a weight maintenance diet composed of 15% protein, 35% lipid and 45% carbohydrate at least three days prior to the study. The kinetic protocol was already described in a previous study (10). Endogenous labelling of apolipoprotein A-I was performed by administration of L[5.5.5- 2H_3]-leucine (99.8 Atom % ; Cambridge Isotope, Mass., USA), dissolved in a 0.9% NaCl solution and tested for sterility and pyrogenicity before the study. All subjects were fasted overnight for 12 h prior to the study, and remained fasted for the entire procedure. They received intravenously $10 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ of tracer, immediately followed by a constant tracer infusion ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) for 14 h. Venous blood was drawn into EDTA tubes (Venoject, Paris, France) at baseline, every 15 min during the first hour, every 30 min during the next 2 h, and then hourly until

the end of the study. Plasma was immediately separated by centrifugation for 30 min at 4°C ; sodium azide and Pefabloc SC (Interchim, Montluçon, France), protease inhibitors, were added to blood samples at final concentrations of 1.5 and 0.5 mmol/l, respectively.

Isolation of lipoproteins by FPLC

HDL subclasses separations by FPLC were performed on a Superdex 200 HR 10/30 column (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Orsay, France). Elution was performed in a 1 mM EDTA, 154 mM NaCl and 0,02% NaN₃ buffer filtered through a 0.22 µm filter (Membrane filters type GV, Duropore®, Millipore). Samples of 200 µl of plasma were injected and elution was performed at a flow of 0.35 ml/min. Approximately 0.2 ml was collected for each fraction. Apo A-I concentrations were measured by immunoturbidimetry in each FPLC fraction (Biomerieux, Marcy-L'Etoile, France). To analyse pure HDL subclasses, 10 fractions were not considered assuming to be a mixture of α and pre β_1 HDL. With this exclusion protocol, 66% of total Apo A-I were recovered, with 82% and 88% in α HDL and 18% and 12% in pre β_1 HDL for diabetic and control subjects, respectively. These percentages were multiplied with total plasma Apo A-I concentration to determine the concentrations of Apo A-I in pre β_1 and α HDL. The purity of each HDL subclasses was checked by a two-dimensional non denaturing electrophoresis and immunoblotting methods, as previously described (4).

Isolation of VLDL by ultracentrifugation

Plasma was adjusted to d=1,006 g/mL with a NaCl solution. VLDL were then isolated by ultracentrifugation (14) using a LKB ultracentrifuge with a RP55T rotor at 40000 rpm for 24 h at 4°C.

Isolation and preparation of apolipoprotein A-I and B100

Apo A-I of HDL subclasses and Apo B100 of VLDL were resolved by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using a 4 -20% and a 4-10% discontinuous gradient respectively. Apo A-I and Apo B100 bands were excised from the gels and hydrolysed for 24 h in 4 N HCl at 110°C.

Determination of tracer-to-tracee ratios

Hydrolysates were dried under nitrogen and amino acids were purified by cation exchange chromatography using a Dowex 50WX8-200 resin (Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Amino acids were esterified with propanol/acetyl chloride and derivatized using heptafluorobutyric anhydride (HFBA, Fluka, Saint-Quentin Fallavier, France). Electron-impact ionization gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) was performed on a 5890 A gas chromatograph connected with a 5971 A quadrupole mass spectrometer (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). The isotopic ratio was determined by selected ion monitoring at m/z of 282 and 285.

Modelling

Kinetic analysis of tracer-to-tracee ratios was achieved using computer software for simulation, analysis and modelling (SAAM II v 1.0.1, Resource Facility for Kinetic Analysis, Department of Bioengineering, SAAM Institute, Seattle, Wash., USA). Model used was a multi-compartmental model for the study of pre β_1 HDL and α HDL (Figure 1). The fractional production rate (FPR), i.e. the proportion of Apo A-I entering the pool per unit time (d^{-1}), and the absolute production rate (APR), i.e. the amount of Apo A-I entering the pool per unit time ($mg.kg^{-1}.d^{-1}$) were estimated. APR is the product of FPR and the pool size of Apo A-I in HDL subclasses. The Apo A-I pool size ($mg.kg^{-1}$) was calculated by multiplying the mean HDL subclasses Apo A-I concentration by 0.045 and 0.037 ($l.kg^{-1}$), assuming a plasma volume of 4.5% of body weight for control subjects and 3.7% for diabetic patients (7). Apo A-I pool was considered to be constant, as no significant variation was observed between measurements made at different sampling times. Under these steady-state conditions, FPR equals fractional clearance rate. The Apo A-I clearance and the Apo A-I recycling within HDL were analysed distinctly ; both were expressed as $pool.d^{-1}$. The clearance rate was the direct removal of Apo A-I [$k(0,20)$; $k(0,10)$] and the Apo A-I recycling corresponded to the conversion between pre β_1 and α HDL [$k(20,11)$; $k(11,20)$]. To estimate the Apo A-I synthesis, we used the plateau of VLDL-Apo B100 tracer-to-tracee ratio as precursor pool enrichment (16). This pool was considered to be constant owing to the steady-state observed

on plasma leucine tracer-to-tracee ratio (data not shown). VLDL Apo B100 data were kinetically analysed using mono-exponential function : $A(t)=A_p[1-\exp(-k(t-d))]$, where $A(t)$ is the tracer-to-tracee ratio at time t (h), A_p , the tracer-to-tracee ratio at plateau of the VLDL Apo B100 curve, d (h) the delay between the beginning of the experiment and the appearance of tracer in the apolipoprotein, and k the FCR of the apolipoprotein.

Statistical analysis

Data are reported as mean \pm SD unless otherwise specified. Mann and Whitney test (one tailed p value) was used to determine significant differences between groups using InStat Software package (GraphPad, San Diego, USA).

RESULTS

Apolipoprotein and lipid concentrations

Individual data for plasma and HDL composition are presented in Table II. As no significant variation was observed between measurements made at three different infusion times (data not shown), it was considered that all volunteers were in steady-state throughout the study. Apo A-I- α HDL concentration was lower in type II diabetes patients (98.2 ± 23.2 vs 124.6 ± 15.2 mg/dl, $p < 0.05$), plasma Apo A-I concentration was also decreased (119.9 ± 26.6 vs 141.9 ± 17.0 mg/dl, NS). Apo A-I-pre β_1 HDL concentration tended to be higher in diabetic patients (21.7 ± 4.9 mg. dl^{-1} vs. 17.2 ± 6.4 mg. dl^{-1} , NS). The relative contribution of Apo A-I-pre β_1 HDL was significantly higher

in type II diabetic patients than in control subjects. Indeed, $18.3 \pm 2.8\%$ of total Apo A-I was found in pre β_1 HDL in diabetic patients compared with $11.9 \pm 3.7\%$ in controls ($p < 0.01$).

Kinetic data

The tracer-to-tracee ratio curves for α HDL and pre β_1 HDL in control subjects and in type II diabetic patients are shown in Figure 2. In diabetic subjects, α HDL tracer enrichments were higher than those of normal subjects, but enrichments of pre β_1 HDL were not different. Enrichment in plasma free leucine reached a plateau after 30 min and remained stable throughout the end of the study (data not shown). The tracer-to-tracee ratio curve in Apo B100-VLDL reached a plateau which represented about 70% of that of plasma leucine. Kinetic parameters of Apo A-I-pre β_1 HDL and Apo A-I- α HDL obtained with the multi-compartmental model are shown in Table 3. The production rate of pre β_1 HDL was slightly increased in diabetic patients compared with controls, but not significantly (10.31 ± 2.65 vs 7.65 ± 2.75 mg.kg⁻¹.d⁻¹, NS). The conversion rate of pre β_1 to α HDL was not different in both groups and a 64% increase of synthesis rate of pre β_1 from α HDL was observed in diabetic patients (11.67 ± 3.14 vs 7.09 ± 4.51 d⁻¹, $p < 0.05$). The clearance of Apo A-I was higher in diabetic patients compared with control subjects (0.448 ± 0.210 vs 0.263 ± 0.085 d⁻¹ in pre β_1 HDL, $p < 0.05$ and $0.249 \pm$

0.010 vs 0.112 ± 0.026 d⁻¹ in α HDL, $p < 0.005$). Direct clearance in pre β_1 HDL was created for only one compartment [k(0,10)]. The clearance rate of the second compartment [k(0,11)] was not identified.

Correlations

When the results of both groups were pooled, significant negative correlation was observed between HDL-C and plasma TG ($r = -0.515$, $p < 0.05$). There were significant correlations between the clearance rate of Apo A-I- α HDL and plasma TG ($r = 0.554$, $p < 0.05$) or HDL-C ($r = -0.879$, $p < 0.01$) levels and between the clearance rate of Apo A-I-pre β_1 HDL and plasma TG levels ($r = 0.501$, $p < 0.05$). No correlation was found between conversion of HDL subclasses and their composition.

DISCUSSION

The aim of this study was to determine the pre β_1 and α HDL remodelling in 6 patients with type II diabetes compared to 6 control subjects by endogenous labelling of Apo A-I. HDL subclasses were separated by FPLC and the tracer enrichments of Apo A-I was measured by GC-MS. Patients with type II diabetes showed a significant lower level of HDL-C, a lower concentration of plasma Apo A-I related to an increased of Apo A-I FCR compared with control subjects. These results confirm our previously work (8;10). Moreover, type II diabetic patients were characterised by an increase in pre β_1 HDL which could be in part related to an increase in the recycling of α HDL to pre β_1 HDL.

All subjects fasted overnight for 12h before the study, and remained fasting for the entire procedure. Thus the main source of Apo A-I is the liver (16). As a forcing function for the precursor pool, we have used the enrichment of intracellular hepatic leucine estimated by the plateau enrichment of Apo B100 of VLDL, a rapidly synthesized hepatic apolipoprotein (22). Kinetic analysis was achieved using a multi-compartmental model with an exchange between $\text{pre}\beta_1$ and αHDL compartments. $\text{pre}\beta_1$ HDL were converted to αHDL (90%) or were directly catabolized (10%). Two $\text{pre}\beta_1$ HDL particles, with small but distinct differences in size differences, were already described (1) and could explain the compartmental heterogeneity used in the present model to fit the data with optimal accuracy. Our two groups were not well-matched for BMI or age, but several studies showed that neither BMI nor age were major factors determining apo A-I HDL turnover rate (23).

However Apo A-I is also synthesised in the intestine and released from the catabolism of triglyceride rich lipoproteins (TRLs). Since type II diabetic patients had elevated triglyceride and it is possible that TRLs could be a source for lipid poor Apo A-I. This investigation were performed at fasted state to minimise this effect.

In the present study, type II diabetic patients presented a production rate of $\text{pre}\beta_1$ HDL slightly increased and a clearance of Apo A-I- $\text{pre}\beta_1$ HDL higher compared with control subjects. Moreover, the increase of the conversion rate of αHDL to $\text{pre}\beta_1$ HDL would

predict that whole HDL remodelling proceeds at a faster rate in diabetic patients. Several processes which are dependent on CETP, HL, PLTP or scavenger receptor class B type I (SR-BI) activity are involved in the recycling of αHDL . Indeed, CETP promotes the exchange of cholesteryl esters (CE) and TG from HDL to VLDL/LDL, leading to an accumulation of TG in HDL. Diabetic patients of this study were characterised by plasma TG levels 2.5-fold higher than control subjects suggesting a possible increase of CETP activity (13;18;28). The decrease in HDL-C and the increase in HDL-TG levels observed in diabetic patients confirmed this hypothesis. This is in the line of our previous results regarding HDL clearance and lipoprotein lipase activity (9). In type II diabetes, LPL activity was reduced and induced a defect in the clearance of TG-rich lipoparticules from the circulation leading to an increase in VLDL-TG and the formation of HDL enriched in TG through CETP pathway (21). The TG content results in more unstable HDL particle (20). The thermodynamic instability of these HDL particles may result in increased Apo A-I shedding from the particle surface which is in turn rapidly cleared by the kidney (15), thereby contributing to lower plasma Apo A-I levels in hypertriglyceridemic diabetic patients. The significant correlation observed between plasma TG level and HDL-C with Apo A-I FCR supports this hypothesis.

TG enrichments of HDL particles make them also a better substrate for lipolysis by HL. HL activity was described to be increase during type II diabetes (27). Hydrolysis

mediated by HL reduces the core volume and size of the mature HDL (12) ; small HDL particles or remnants HDL which may be cleared by the SR-BI receptor. Indeed, *in vitro* and *in vivo* studies have established a role for HL in promoting the uptake of HDL-CE, acting with SR-BI receptors (6;21). SR-BI receptor contributes to the modification of the composition and reduction of HDL size leading to accelerated Apo A-I shedding and the formation of lipid poor Apo A-I (31). In the same time, pre β_1 HDL were also formed during HL lipolysis (2). This dual HL action could be completed by PLTP which increased the formation of pre β_1 HDL during HDL remodelling (19). PLTP activity tended to be higher in patients with type II diabetes (28) and increased in parallel with plasma TG levels (13).

Unfortunately, measures of enzyme activities were not performed. These activities reflected often the rate of cholesterol transport or lipids hydrolysis. In this investigation, the remodelling of HDL was analysed by measuring the kinetic parameters of Apo A-I ; thus a comparison with the enzyme activities could not possible because lipids or proteins were studied in these different cases. In a previous study, we have described a new approach with stable isotopes which allowed the analysis of direct removal of CE from HDL (direct HDL uptake and selective uptake of CE) (25). It would be interesting to realise a new comparative analysis between Apo A-I and cholesterol kinetics to see if the removal of CE is correlated with the conversion rate of

α HDL to pre β_1 HDL and to compare lipid kinetics and enzyme activities.

The accelerated HDL remodelling could result in the accumulation of HDL precursors with a good capacity for cell cholesterol uptake and increase the cholesterol efflux from cells into the plasma. However, in type II diabetic patients, Apo A-I recycling and direct production seem not strong enough to compensate the dramatic increase of HDL clearance. Nevertheless, HDL pool size is decreased and in turn total cholesterol efflux. The capacity to induce cholesterol efflux was already described stable or decrease in type II diabetic patients (3).

In conclusion, patients with type II diabetes show low Apo A-I plasma concentrations but an increase in pre β_1 HDL, related to an important increase of Apo A-I FCR and conversion rate of α HDL to pre β_1 HDL, respectively. The acceleration of these two parameters could reflected in fact variations in other parameters such as an increase in CETP, HL or PLTP activities and probably hypertriglyceridemia as the major driving force.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the department of Clinical Research of Nantes Hospital (Direction de la Recherche Clinique). Support was also provided by Bristol-Myers Squibb, Fournier, ALFEDIAM and Région des Pays de Loire et Bretagne.

REFERENCES

1. **Asztalos B.F., Sloop C.H., Woog L., Roheim P.S.** 1993 Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apo A-I containing subpopulations *Biochim.Biophys.Acta.* 1169:291-300
2. **Barrans A., Collet X., Barbaras R., Jaspard B., Manent J., Vieu C., Chap R., Perret B.** 1994 Hepatic lipase induces the formation of pre-beta1 high density lipoprotein from triacylglycerol-rich HDL2 *J.Biol.Chem.* 269:11572-11577
3. **Brites F.D., Cavallero E., Geitere de C., Nicolaiew N., Jacotot B., Rosseneu M., Fruchart J-C., Wikinski R.L., Castro G.R.** 1999 Abnormal capacity to induce cholesterol efflux and a new Lp A-I pre- β particle in type 2 diabetic patients *Clin.Chim.Acta.* 279:1-14
4. **Chetiveaux M., Nazih H., Ferchaud-Roucher V., Lambert G., Zair Y., Masson M., Ouguerram K., Bouhours D., Krempf M.** 2002 The differential apoA-I enrichment of prebeta(1) and alphaHDL is detectable by gel filtration separation *J Lipid Res* 43:1986-1993
5. **Chetiveaux M., Ouguerram K., Zair Y., Maugère P., Falconi I., Nazih H., Krempf M.** 2004 New model for kinetic studies of HDL metabolism in humans *Eur.J.Clin.Invest.* 34:262-267
6. **Collet X., Tall A.R., Serajuddin H., Guendouzy K., Royer L., Oliveira H., Barbaras R., Jiang X-C., Francone O.L.** 1999 Remodeling of HDL by CETP in vivo and CETP and hepatic lipase in vitro in enhanced uptake of HDL-CE by cells expressing scavenger receptor B-I *J.Lipid.Res.* 40:1185-1193
7. **Dagher FJ, Lyons JH, Finlayson DC, Shamsai J, Moore FD** 1965 Blood volume measurement: a critical study. Prediction of normal values, controlled measurement of sequential changes, choice of a bedside method. *Advanc Surg* 1:69-109
8. **Duvillard L., Pont F., Florentin E., Gambert P., Verges B.** 2000 Inefficiency of insulin therapy to correct apolipoprotein A-I metabolic abnormalities in non-insulin-dependent diabetes mellitus *Atherosclerosis* 152:229-237
9. **Frenais R., Nazih H., Ouguerram K., Maugeais C., Zair Y., Bard J.M., Charbonnel B., Magot T., Krempf M.** 2001 *In vivo* evidence for the role of lipoprotein lipase activity in the regulation of apolipoprotein AI metabolism : a kinetic study in control subjects and patients with type II diabetes Mellitus *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 86:1962-1967
10. **Frenais R., Ouguerram K., Maugeais C., Mahot P., Maugere P., Krempf M., Magot T.** 1997 High density lipoprotein apolipoprotein AI kinetics in NIDDM: a stable isotope study *Diabetologia* 40:578-583
11. **Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR** 1977 High Density Lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham study. *Am J Med* 62:707-714
12. **Guendouzy K., Jaspard B., Barbaras R., Motta C., Marcel Y., Chap H., Perret B., Collet X.** 1999 Biochemical and

physical properties of remnant-HDL₂ and preβ₁-HDL produced by hepatic lipase
 Biochem. 38:2762-2768

13. **Guerin M, Le Goff W, Lassel TS, van Tol A, Steiner G, Chapman MJ** 2001 Atherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL(1) and dense LDL in type 2 diabetes : impact of the degree of triglyceridemia *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:282-288

14. **Havel R.J., Eder H.A., Bragdon J.H.** 1955 The distribution and chemical composition of ultracentrifugation separated lipoproteins in human serum *J.Clin.Invest.* 34:1345-1353

15. **Horowitz BS, Goldberg IJ, Merab J, Vanni TM, Ramakrishnan R, Ginsberg HN** 1993 Increased plasma and renal clearance of an exchangeable pool of apolipoprotein AI in subjects with low levels of High Density Lipoprotein cholesterol *J Clin Invest* 91:1743-1752

16. **Ikewaki K., Rader D.J., Schaefer E.J., Fairwell T., Zech L.A., Brewer H.B.** 1993 Evaluation of apo A-I kinetics in humans using simultaneous endogenous stable isotope and exogenous radiotracer methods *J.Lipid.Res.* 34:2207-2215

17. **Ishida B.Y., Frolich J., Fielding C.J.** 1987 preβ₁-migrating high density lipoprotein : quantitation in normal and hyperlipidemic plasma by solid phase radioimmunoassay following electrophoretic transfer *J.Lipid.Res.* 28:778-786

18. **Jones R.J., Owens D., Brennan C., Collins P.B., Johnson A.H., Tomkin G.H.** 1996 Increased esterification of cholesterol

and transfer of cholesteryl ester to apo B-containing lipoproteins in Type 2 diabetes : relationship to serum lipoproteins A-I and A-II *Atherosclerosis* 119:151-157

19. **Lagrost L., Desrumaux C., Masson D., Deckert V., Gambert P.** 1998 Structure and function of plasma phospholipid transfer protein *Curr.Opin.Lipidol.* 9:203-209

20. **Lamarche B., Uffelman K.D., Carpentier A., Cohn J.S., Steiner G., Barrett P.H.R., Lewis G.F.** 1999 Triglyceride enrichment of HDL enhances in vivo metabolic clearance of HDL apo A-I in healthy men *J.Clin.Invest.* 103:1191-1199

21. **Lambert G., Amar M.J.A., Martin P., Fruchart-Najib J., Föger B., Shamburek R.D., Brewer Jr H.B., Santamarina-Fojo S.** 2000 Hepatic lipase deficiency decreases the selective uptake of HDL-cholesteryl esters in vivo *J.Lipid.Res.* 41:667-672

22. **Lichtenstein A.H., Cohn J.S., Hachey D.L., Millar J.S., Ordovas J.M., Schaefer E.J.** 1990 Comparison of deuterated leucine, valine, and lysine in the measurement of human apolipoprotein AI and B100 kinetics *J.Lipid.Res.* 31:1693-1701

23. **Marsh J.B., Welty F.K., Schaefer E.J.** 2000 Stable isotope turnover of apolipoproteins of high density lipoproteins in humans *Curr.Opin.Lipidol.* 11:261-266

24. **Miida T., Nakamura Y., Inano K., Matsuto T., Yamaguchi T., Tsuda T., Okada M.** 1996 Pre-β₁-high-density lipoprotein increases in coronary artery disease *Clin.Chem.* 42:1992-1995

25. **Ouguerram K., Krempf M., Maugeais C., Maugeais P., Darmaun D.,**

Magot T. 2002 A new labeling approach using stable isotopes to study in vivo plasma cholesterol metabolism in humans *Metabolism* 51:5-11

26. **Quintão E.C.R., Medina W.L., Passarelli M.** 2000 Reverse cholesterol transport in diabetes mellitus *Diabetes.Metab.Res.Rev.* 16:237-250

27. **Rashid S., Watanabe T., Sakaue T., Lewis G.F.** 2003 Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states : the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity *Clin.Biochem.* 36:421-429

28. **Riemens S, van Tol A, Sluiter W, Dullaart R** 1998 Elevated plasma cholesteryl ester transfer in NIDDM: relationships with apolipoprotein B-containing lipoproteins and

phospholipid transfer protein *Atherosclerosis* 140:71-79

29. **Rye K-A., Clay M.A., Barter P.J.** 1999 Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors *Atherosclerosis* 145:227-238

30. **Sasahara T., Yamaguchi T., Sviridov D., Fidge N., Nestel P.** 1997 Altered properties of high density lipoprotein subfractions in obese subjects *J.Lipid.Res.* 38:600-611

31. **Williams D.L., Connelly M.A., Temel R.E., Swarnakar S., Phillips M.C., de la Llera-Moya M., Rothblat G.H.** 1999 Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking *Curr.Opin.Lipidol.* 10:329-339

32. **Yoshino G., Hirano T., Kazumi T.** 2002 Atherogenic lipoproteins and diabetes mellitus *J.Diabet.Complic.* 16:29-34

Table 1 : Selected clinical and biological characteristics of study subjects

	Control subjects	Patients with type II diabetes
	(n=6)	(n=6)
Age (years)	37 ± 11	50 ± 12
Sex (male/female)	6/0	5/1
BMI (kg.m ⁻²)	24.3 ± 1.6	31.7 ± 2.6
Fasting blood glucose (mmol.l ⁻¹)	5.1 ± 0.6	8.8 ± 2.2

Figure 1 : Multi-compartmental model for kinetic analysis of Apo A-I – pre β_1 HDL and Apo A-I - α HDL metabolism

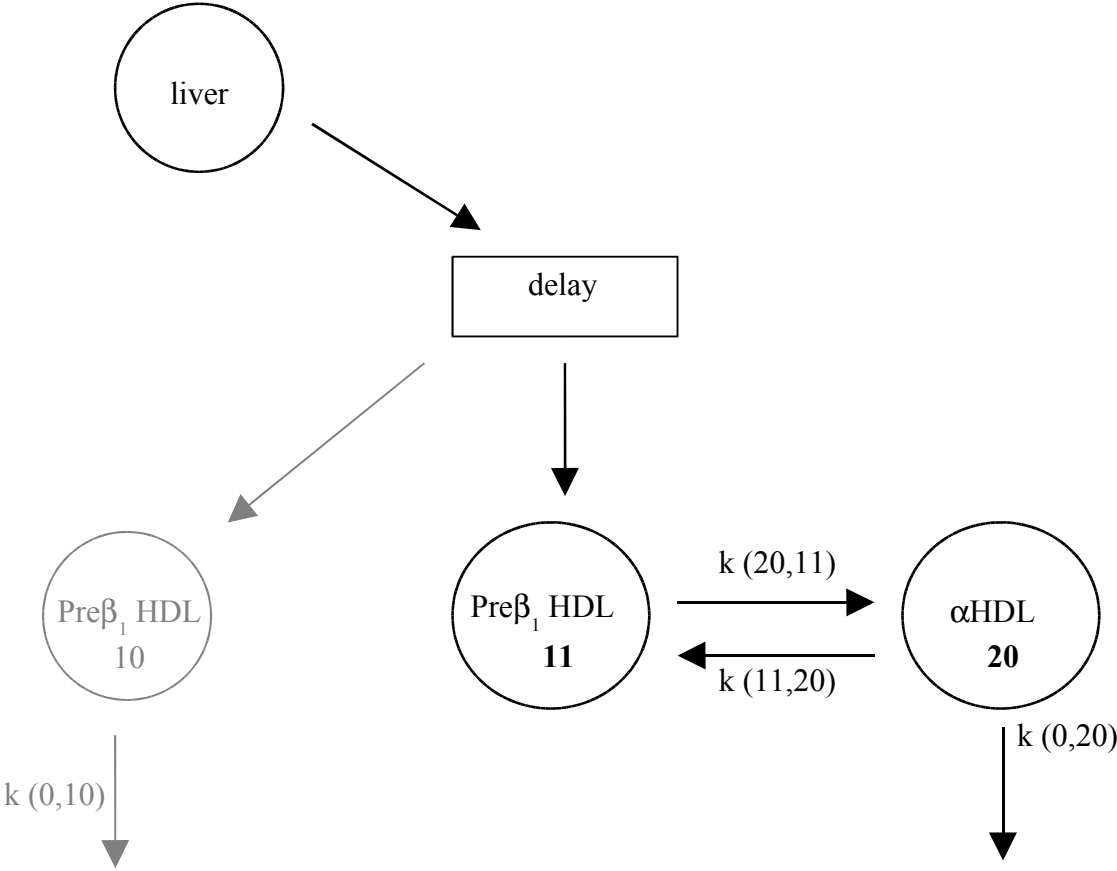


Table 2 : Plasma and HDL composition (mg.dl⁻¹) of study subjects

	Control subjects	Type II diabetic patients
	(n=6)	(n=6)
Plasma Apo A-I	141.9 ± 17.0	119.9 ± 26.6
Apo A-I – αHDL	124.6 ± 14.1	98.2 ± 23.3 ^a
Apo A-I – preβ ₁ - HDL	17.2 ± 6.4	21.7 ± 4.9
Plasma Cholesterol	242.5 ± 20.4	264.1 ± 22.2
HDL Cholesterol	51.8 ± 4.7	31.2 ± 2.3 ^b
αHDL Cholesterol	50.3 ± 4.1	28.7 ± 2.4 ^b
Preβ ₁ HDL Cholesterol	1.5 ± 1.1	2.5 ± 2.4
Plasma Triglycerides	141.1 ± 41.4	315.1 ± 96.4 ^b
HDL Triglycerides	13.5 ± 7.9	21.9 ± 12.9
αHDL Triglycerides	11.1 ± 2.7	16.1 ± 3.9
Preβ ₁ HDL Triglycerides	2.4 ± 2.2	5.9 ± 2.2

^a p=0.026 ; ^b p=0.0022

Figure 2 : Mean experimental values of the tracer-to-tracee ratio for α HDL (Fig 2a), pre β_1 HDL (Fig 2b) in control subjects (circle) and patients with type II diabetes (square) during a primed constant infusion of [2 H $_3$]leucine. Data are shown as mean \pm SEM

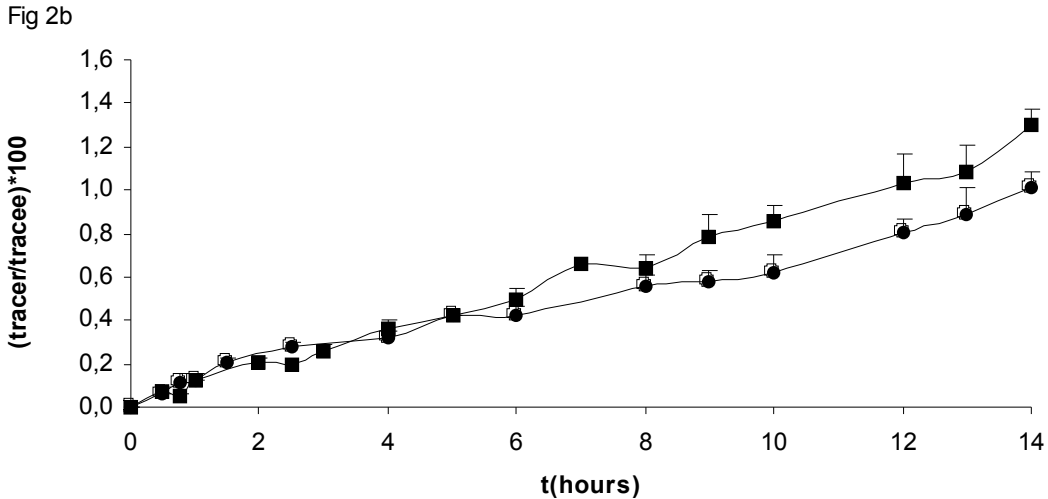
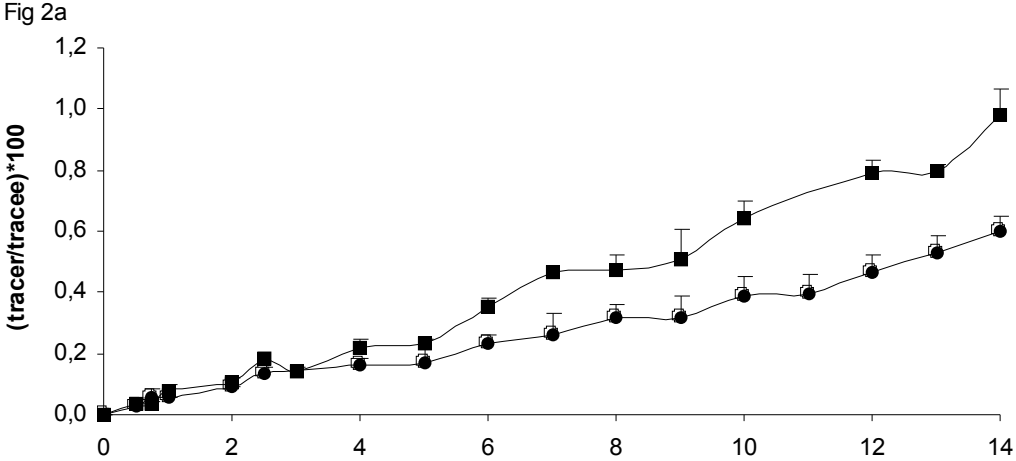


Table 3 : Kinetic parameters (identified values \pm standard deviation for FCR and clearance rate) of Apo A-I-HDL subclasses in subjects calculated with a multi-compartmental model

	Conversion pre β_1 → α HDL k(20,11) d ⁻¹	Conversion α →pre β_1 HDL k(11,20) d ⁻¹	Apo A-I FCR pre β_1 HDL k(0,10) d ⁻¹	Apo A-I FCR α HDL k(0,20) d ⁻¹	Pool size pre β_1 HDL mg.kg ⁻¹	APR pre β_1 HDL mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹	Pool size α HDL mg.kg ⁻¹	APR α HDL mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹
Diabetic subjects								
D1	372.48 \pm 177.36	15.98 \pm 6.43	0.353 \pm	0.230 \pm	9.44	11.513	38.07	234.19
D2	46.56 \pm 36.48	9.09 \pm 2.13	0.365 \pm	0.250 \pm	10.18	10.92	40.85	380.72
D3	183.12 \pm 49.20	15.10 \pm 2.38	0.331 \pm	0.250 \pm	7.84	12.51	44.62	684.32
D4	150.96 \pm 51.84	11.02 \pm 2.17	0.506 \pm	0.257 \pm	7.03	12.62	41.40	469.18
D5	48.96 \pm 17.42	10.30 \pm 1.28	0.286 \pm	0.250 \pm	8.51	8.45	32.01	336.94
D6	40.08 \pm 6.89	8.52 \pm 1.19	0.850 \pm	0.259 \pm 0.017	5.11	5.87	21.05	185.34
Mean	140.36	11.67	0.448	0.249	8.02	10.31	36.33	446.14
(SD)	(128.86)	(3.14)	(0.210)	(0.010)	(1.81)	(2.65)	(8.60)	(185.34)
Control Subjects								
Mean	96.24	^a 7.09	^a 0.263	^b 0.112	7.72	7.65	56.13	396.75
(SD)	(42.99)	(4.51)	(0.085)	(0.026)	(2.86)	(2.75)	(6.13)	(242.78)

^a p= 0.05

^b p=0.005

Discussion

Ce travail a permis de montrer que la réduction de la concentration en Apo A-I constatée chez les patients atteints d'un diabète de type II s'expliquait principalement par leur hypercatabolisme ; catabolisme qui a principalement lieu pendant le recyclage accéléré des α HDL en pré β_1 HDL observé chez ces patients.

Les résultats sur le catabolisme s'accordaient avec les données de Golay *et al.*, étude par marquage exogène (Golay A. et al., 1987) et ceux de Frénais *et al.*, étude par marquage endogène (Frenais R. et al., 1997). Mais ces deux études ont été réalisées à partir de HDL isolées par ultracentrifugation. L'intérêt de cette présente étude était la distinction de sous fractions de HDL : les précurseurs et les matures. La conversion des α HDL en pré β_1 HDL stimulée chez les patients avec un diabète de type II se traduit en réalité par une modification de la composition lipidique des α HDL et une réduction de leur taille. Cette étude distincte des sous populations de HDL laisse à penser que le catabolisme accru de l'Apo A-I et le recyclage des α HDL semblent en étroite relation. En effet, on peut supposer que l'augmentation du catabolisme de l'Apo A-I est causée par l'enrichissement en triglycérides et l'appauvrissement en cholestérol des HDL (HDL plus petites) qui augmentent (1) l'interaction des HDL avec la HL, (2) la dissociation de l'Apo A-I des HDL et par conséquent (3) la clearance de l'Apo A-I libre par le rein.

Les patients diabétiques de cette étude sont caractérisés par une augmentation du taux de conversion des α HDL en pré β_1 HDL. Par contre une diminution du pool de l'Apo A-I des α HDL est aussi observée. Donc si on parle en débit de conversion et non plus en taux, le recyclage des HDL matures reste inchangé par rapport aux sujets sains. Mais si la taille du pool est plus petite et que le taux de conversion est augmenté alors on peut en conclure que le pool des α HDL se renouvelle plus vite.

En perspective, on peut se demander quelles seraient les conséquences de l'utilisation d'un inhibiteur de la CETP chez ce type de patients présentant un diabète de type II. Un inhibiteur de la CETP aurait pour effet une augmentation du HDL-C. La taille des lipoprotéines tendrait aussi à varier avec une augmentation de la distribution de HDL larges parallèlement à une proportion de HDL petites inchangée. Le fait que les HDL ne s'enrichissent plus en triglycérides suite à l'inhibition partielle en CETP pourrait réduire l'action de la HL, dont le substrat privilégié est les HDL enrichies en triglycérides et appauvries en cholestérol.

Toutefois, on peut supposer que les α HDL resteraient de bon transporteur pour l'épuration du cholestérol par le foie par captage sélectif.

Etude du métabolisme des pré β_1 HDL et des α HDL à jeun et à l'état nourri

La concentration plasmatique HDL est inversement corrélée aux risques cardiovasculaires. De nombreux traitements sont actuellement développés pour augmenter sa synthèse in vivo. Une des cibles thérapeutiques pourrait être l'Apo A-I d'origine intestinale. L'objectif de cette étude était de développer chez l'homme une méthode de mesure des synthèses de l'Apo A-I d'origine intestinale et hépatique. Pour ce faire, en complément d'analyses biochimiques, nous avons réalisé des investigations cinétiques. Ces modèles d'exploration ont pour but d'étudier la stimulation préférentiellement de l'Apo A-I intestinale par des nutriments ou des médicaments. Nous avons testé deux approches distinctes :

Notre première approche était de réaliser un marquage endogène de l'Apo A-I à jeun et à l'état nourri. L'analyse des cinétiques d'enrichissement des pré β_1 HDL et des α HDL lors de ces deux situations nous a permis ainsi d'estimer le rôle des lipoprotéines d'origine intestinale obtenues après un régime riche en matière grasse sur les lipoprotéines hépatiques étudiées à jeun.

Notre deuxième approche était de réaliser un double marquage endogène, d'une part de l'Apo A-I intestinale par une injection d'un traceur dans le tube digestif et utilisé exclusivement dans l'entérocyte, d'autre part de l'Apo A-I hépatique et intestinale par une injection intraveineuse d'un autre traceur. L'acide glutamique marqué au ^{13}C a été utilisé pour le traçage de la protéine intestinale et la leucine deutérée pour l'Apo A-I circulante issue des deux organes.

Etude du métabolisme des pré β_1 HDL et des α HDL à jeun et à l'état nourri par marquage endogène de l'Apo A-I par infusion de d₃-leucine

INTRODUCTION

L'Apo A-I est codée par le gène cluster Apo A-I – CIII – A-IV (15 Kb) situé sur le bras long du chromosome 11. Ce gène est présent au niveau du foie et de l'intestin, ce qui induit une double synthèse distincte de l'Apo A-I, intestinale et hépatique. A ce jour, il n'existe pas de données permettant de distinguer des différences physico-chimiques entre l'Apo A-I d'origine intestinale et celle d'origine hépatique. Cependant, la quantité de traceurs intracellulaires du précurseur n'est pas la même dans ces deux organes ; en effet plusieurs travaux ont montré que la quantité de traceurs dans l'Apo B48 d'origine exclusivement intestinale est en règle générale plus faible que dans l'Apo B100 d'origine hépatique.

La contribution respective de l'Apo A-I d'origine intestinale ou d'origine hépatique est chez l'homme de fait relativement difficile à apprécier et des données très contradictoires ont été rapportées. Green *et al.* ont estimé à environ 50 %, et sur deux sujets, leur contribution respective (Green P.H.R. et al., 1979) ; ces deux patients présentaient une chylurie et le métabolisme intestinal de l'Apo A-I a été analysé au niveau des chylomicrons retrouvés dans les urines. Par ailleurs, Ikewaki suggère qu'environ 90 % de l'Apo A-I est d'origine hépatique, même à l'état nourri (Ikewaki K. et al., 1993). Pour cette étude, les auteurs ont réalisé un double marquage de l'Apo A-I. D'une part, un marquage exogène par des radiotraceurs qui permettait d'estimer le FCR réel de la protéine. Dans un deuxième temps, l'Apo A-I était marquée par voie endogène à l'aide d'un isotope stable. La modélisation était réalisée en faisant varier le pool précurseur et en lui attribuant un pourcentage de contribution intestinale et hépatique (grâce à la connaissance des valeurs d'enrichissement au plateau de l'Apo B100 et l'Apo B48) de manière à obtenir une valeur de FCR identique à celle mesurer avec le marquage exogène. L'erreur sur les mesures de la cinétique d'Apo A-I pourrait être de plus de 40 % si cette hypothèse était fausse.

Notre groupe a depuis plusieurs années travaillé sur la cinétique de l'Apo A-I en se mettant volontairement en période post-absorptive afin de limiter au maximum la synthèse d'Apo A-I intestinale. Cependant, même si cette hypothèse de travail semble acceptable, elle reste à démontrer et surtout il apparaît important de pouvoir vérifier la part respective de synthèse intestinale ou hépatique dans l'objectif de stimuler préférentiellement l'Apo A-I d'origine

intestinale par des nutriments ou des médicaments qui représenteraient ainsi une cible thérapeutique.

ETUDE PRELIMINAIRE

1. *Sous-populations de HDL du plasma et du chyle*

Dans un premier temps, une étude préliminaire a été entreprise sur une patiente présentant un chylothorax post-traumatique. Il s'agit d'une complication rare de la chirurgie thoracique où à la suite d'une rupture du canal thoracique le chyle se déverse dans la plèvre. L'Apo A-I obtenue dans les épanchements pleuraux chyleux de ces patients est a priori principalement d'origine intestinale. L'analyse comparative des HDL plasmatiques et chyleuses par FPLC nous a permis de distinguer une différence de distribution de l'Apo A-I au sein des HDL. La figure 29 représente la concentration en Apo A-I dans les fractions éluées au niveau des HDL.

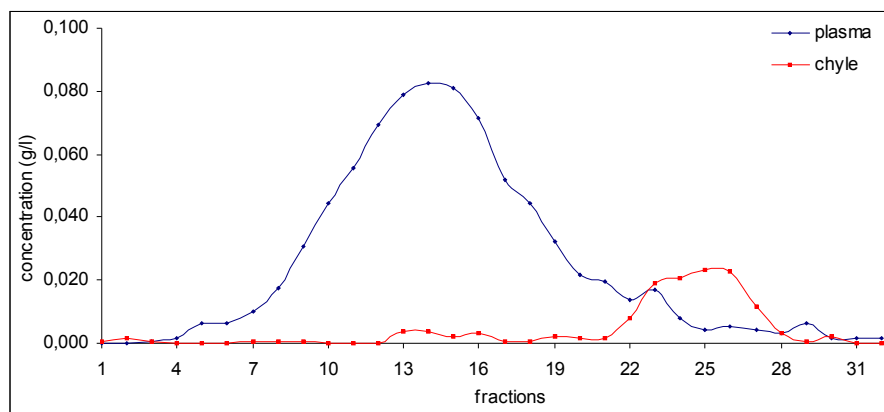


Figure 29 : Concentration en Apo A-I des HDL plasmatiques et chyleuses en fonction des fractions éluées après FPLC

La distribution de l'Apo A-I au niveau du chyle est décalée par rapport au plasma. L'Apo A-I chyleuse est en effet retrouvée pratiquement exclusivement au niveau de particules plus petites pouvant être des pré β_1 HDL.

Nous avons confirmé cette existence exclusive des pré β_1 HDL au niveau du chyle par des électrophorèses bidimensionnelles en conditions non dénaturantes. Cette technique permet de séparer des particules sans les dénaturer tout d'abord en fonction de leur mobilité électrophorétique puis lors d'une deuxième dimension en fonction de leur taille. La figure 30 représente une électrophorèse bidimensionnelle du plasma et du chyle après révélation avec un anticorps anti-Apo A-I.

Au niveau du plasma, nous pouvons distinguer quelques populations majeures : les α HDL (HDL₂ et HDL₃), les pré β_1 HDL et de l'Apo A-I libre. Par contre, cette expérience confirme la

présence des pré β_1 HDL au niveau du chyle ; et l'absence de α HDL. En fait, le chyle présente un profil particulier de populations contenant de l'Apo A-I et de poids moléculaires très proches allant environ de l'Apo A-I libre (28 KDa) aux pré β_1 HDL (70 KDa). Ce processus possible d'enrichissement de l'Apo A-I en lipides est retrouvé au niveau du plasma mais de manière beaucoup moins marquée.

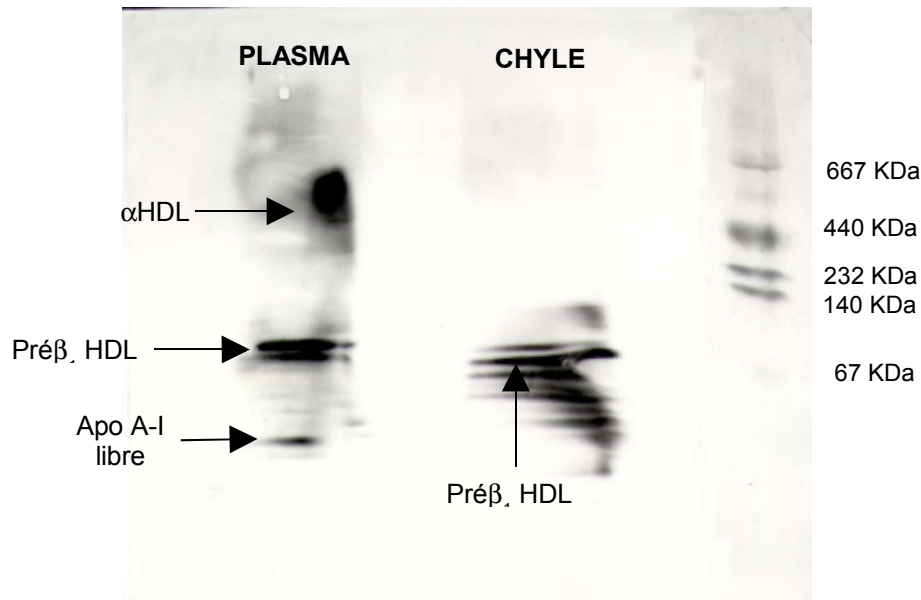


Figure 30 : Electrophorèse bidimensionnelle du plasma et du chyle après révélation avec un anticorps anti-Apo A-I

Le profil lipidique du chyle et du plasma de cette patiente a aussi été déterminé par dosage du cholestérol, des triglycérides, des phospholipides et de l'Apo B en fonction du volume d'éluion en sortie de FPLC (Figure 31).

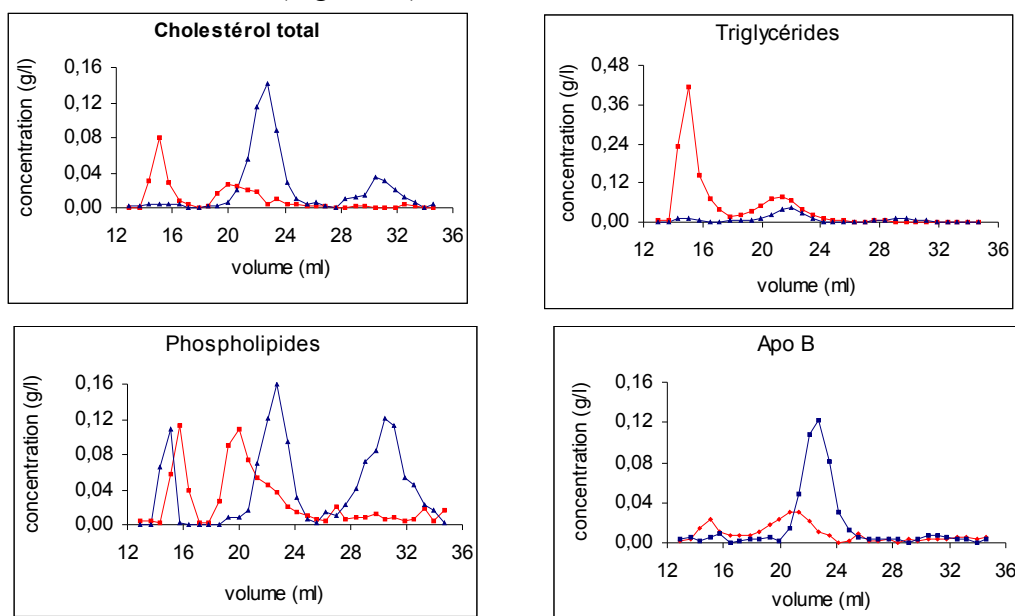


Figure 31 : Concentrations en cholestérol, triglycérides, phospholipides et Apo B du plasma (bleu) et du chyle (rouge) d'une patiente présentant un chylothorax en fonction du volume d'éluion en sortie de FPLC

Cette étude préliminaire nous a permis de mettre en évidence la présence de l'Apo A-I du chyle principalement au niveau des pré β_1 HDL. Notre hypothèse est que si son profil d'enrichissement isotopique est semblable à celui de l'Apo A-I des pré β_1 HDL du plasma, la contribution de l'Apo A-I d'origine intestinale pourrait jouer un rôle non négligeable dans l'organisme notamment à l'état post-prandial et pourrait directement s'incorporer au niveau des pré β_1 HDL. Toutefois, l'utilisation d'échantillons de lymphe drainés au niveau du canal thoracique pour étudier le métabolisme intestinal de l'Apo A-I présente une limite majeure ; en effet une partie de la lymphe provient des membres inférieurs par des troncs lombaires ce qui peut remettre en doute l'origine intestinale du chyle pleural de notre patiente (Figure 32). De plus, l'épanchement stagne plusieurs jours dans l'espace pleural avant d'être prélevé, ouvrant ainsi la possibilité d'échanges particuliers ou inhabituels.

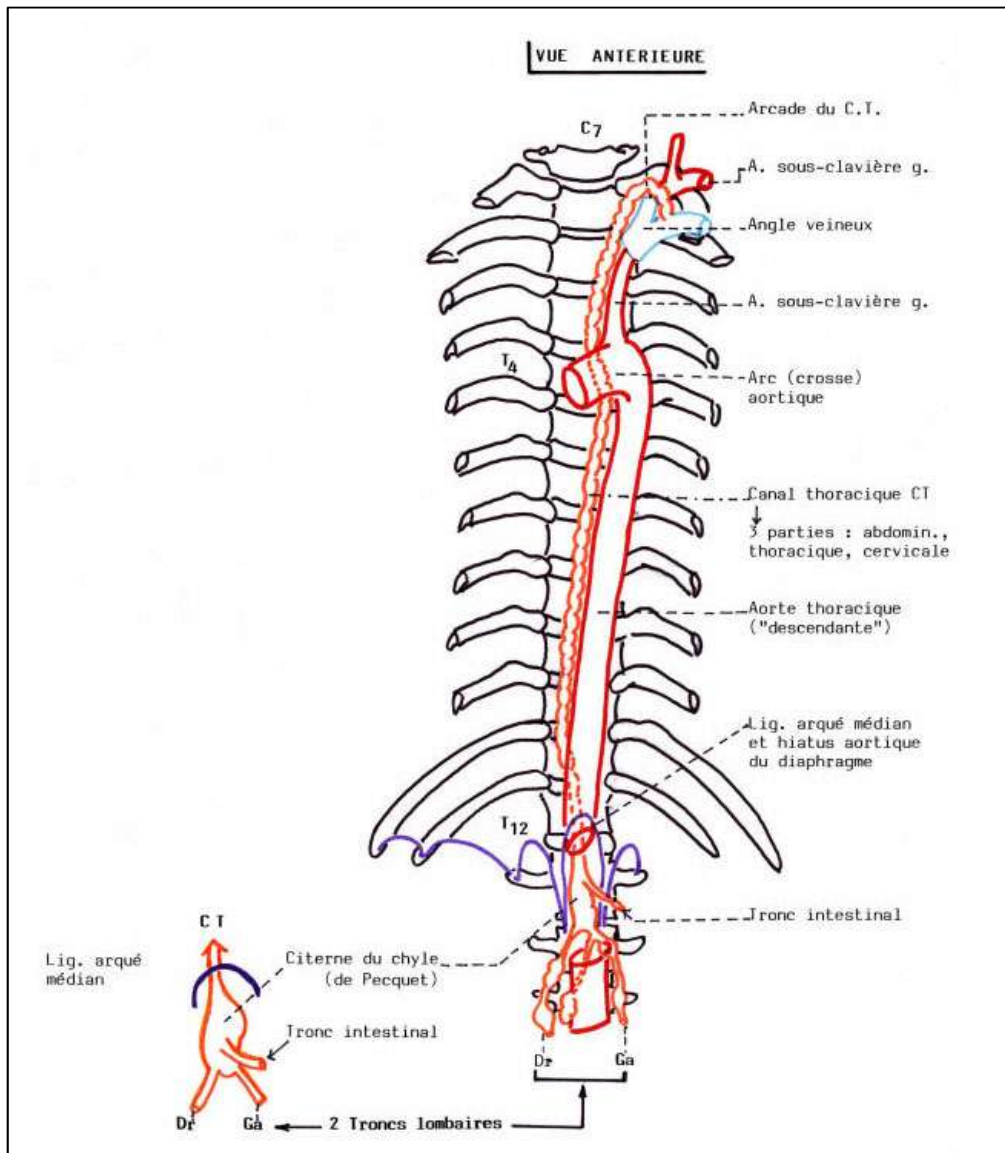


Figure 32 : Représentation schématique du conduit thoracique

METHODES

1. Protocole expérimental

La première méthode de travail était de réaliser un marquage endogène de l'Apo A-I à l'état à jeun et à l'état nourri afin de mesurer les variations de la cinétique des pré β_1 HDL et des α HDL. La leucine trideutérée a été perfusée au niveau veineux par une perfusion continue de 14h afin de marquer à la fois l'Apo A-I d'origine intestinale et hépatique. Des prélèvements plasmatiques seront réalisés tout au long de la cinétique puis à 24h, 48h, 72h et 96h. Deux investigations cinétiques ont été mises en place (Figure 33).

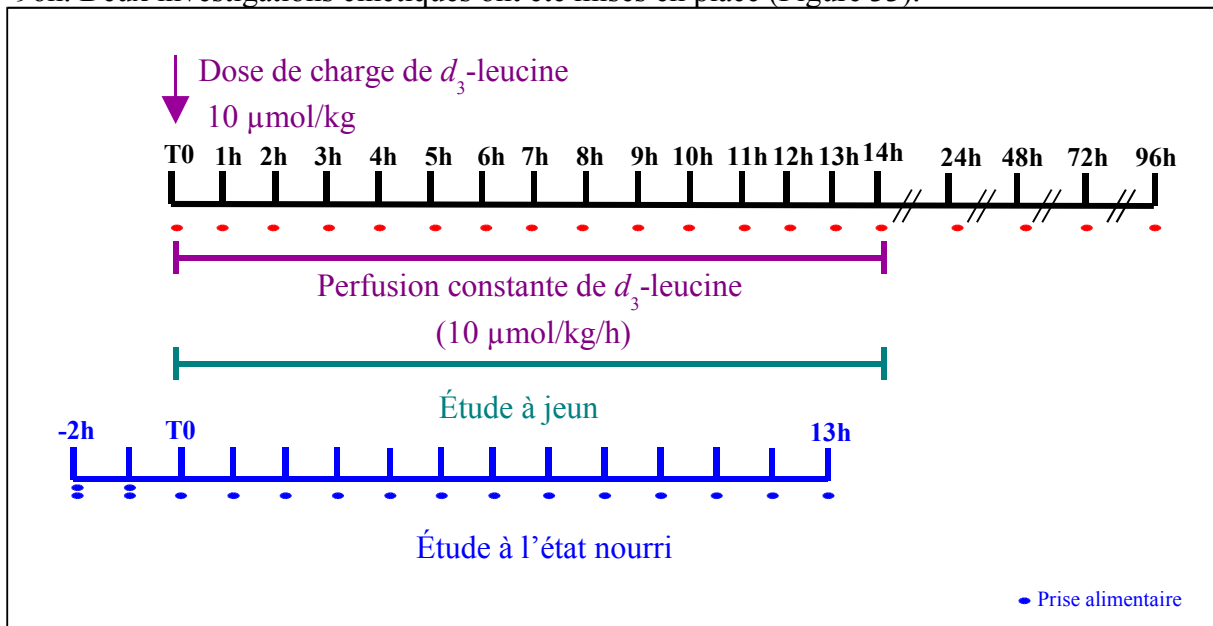


Figure 33 : Protocole expérimental du marquage endogène de l'Apo A-I des HDL à jeun et à l'état nourri

Dans un premier temps, l'étude a été réalisée sur 5 volontaires à jeun pour limiter au maximum la synthèse d'Apo A-I intestinale. Ainsi, l'analyse des HDL reflètera essentiellement leur origine hépatique.

Dans un deuxième temps, l'étude a été réalisée sur ces mêmes 5 volontaires à l'état nourri où l'Apo A-I pourrait être à la fois d'origine intestinale et hépatique. En comparant les données cinétiques de ces deux situations, nous pourrions ainsi déterminer la part respective des synthèses d'origine intestinale et hépatique. Pour cette étude, nous avons envisagé d'estimer les enrichissements des pools précurseurs hépatique et intestinal de l'Apo A-I par détermination des plateaux d'enrichissement respectivement de l'Apo B100 et de l'Apo B48 contenues dans des lipoprotéines riches en triglycérides (TRL). Ces apolipoprotéines représentent un matériel de choix puisque l'Apo B100 des VLDL est issue d'une synthèse

exclusivement hépatique, et l'Apo B48 des VLDL et chylomicrons est une protéine synthétisée par l'intestin uniquement à l'état postprandial.

Pour l'étude à l'état nourri, un repas de 2200Kcal a été fractionné en 17 portions identiques ; 2 portions étaient données aux volontaires sains 2h et 1h avant le début de la perfusion, puis 1 portion toutes les heures jusqu'à la fin du protocole. La composition du repas est détaillée dans le tableau 5.

Repas (17 biscottes, 200g fromage, 1280ml slim fast®)	2200Kcal
Protéines	15%
Glucides	44%
Lipides	41%

Tableau 5 : Composition du repas administré aux patients pendant la durée de la cinétique

2. Données cliniques et biologiques des patients

Le protocole expérimental a reçu l'accord du comité d'éthique et un consentement écrit de chacun des volontaires avant leur inclusion dans l'étude. Les volontaires étaient en bonne santé et ne prenaient pas de médicaments. Ils étaient jeunes (26.3 ± 5.7 ans), de sexe masculin avec un BMI normal (21.1 ± 2.5 kg/m²). La composition des lipides et apolipoprotéines du plasma est représentée dans le tableau 6.

Sujets	Cholestérol total	Triglycérides	HDL-C	LDL-C	Apo A-I	Apo B
S1	1.96	0.97	0.41	1.36	1.08	0.97
S2	1.36	1.14	0.49	0.64	1.52	0.50
S3	1.69	0.61	0.55	1.02	1.56	0.67
S4	1.25	0.47	0.45	0.70	1.19	0.51
S5	1.61	0.81	0.63	0.64	1.60	0.58
Moyenne	1.64	0.75	0.53	0.93	1.47	0.69
SD	0.30	0.27	0.10	0.32	0.29	0.20

Tableau 6 : composition des lipides et apolipoprotéines du plasma (g/l)

3. Séparations des sous populations de HDL par FPLC

La séparation des sous classes de HDL par FPLC est réalisée sur une colonne Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Orsay, France). L'élution est réalisée

grâce à un tampon 1mM EDTA, 154 mM NaCl et 0.02% NaN₃ filtré sur un filtre de 0.22µm (Filtre type GV, Duropore, Millipore). 200 µl de plasma sont injectés et le débit d'élution est de 0.35ml/min. Approximativement 0.2 ml est collectés pour chaque fraction. La concentration en Apo A-I est mesurée sur chaque fraction par immunoturbidimétrie (Biomerieux, Marcy-L'Étoile, France). Afin d'étudier des sous fractions de HDL pures, une 10^{ème} de fractions n'ont pas été prises en compte assimilées à une mixture contenant des α et des préβ₁ HDL. En considérant cette exclusion, 66% de l'Apo A-I total est conservé, comprenant 87% d'αHDL et 13% de préβ₁ HDL. La pureté de chaque sous classes de HDL a été confirmé par une électrophorèse bidimensionnelle en conditions non dénaturantes suivie d'un western blot anti-Apo A-I (Chetiveaux M. et al., 2002).

4. Séparation des VLDL et TRL par ultracentrifugation

Les échantillons plasmatiques ont été ajustés à une densité égale à 1.006g/ml avec une solution de NaCl. Les VLDL ont été isolées ensuite par ultracentrifugation à 40000rpm pendant 22h à 4°C. A l'état nourri, cette fraction contient aussi les chylomicrons et peut être assimilée aux lipoprotéines riches en triglycérides (TRL).

5. Isolation et préparation de l'Apo A-I, B100 et B48

L'Apo A-I des sous classes de HDL a été séparée par gel SDS-PAGE en gradient (4-20%). Les Apo B100 et B48 des TRL ont été séparées à l'aide d'un gradient 4-10% après avoir été identifiées par western blot avec un anticorps anti-Apo B48/100 humaine (Biodesign, Saco, Maine, USA). Les bandes d'Apo A-I, Apo B100 et Apo B48 ont été excisées du gel et hydrolysées pendant 24h dans de l'HCl 4N à 110°C.

6. Détermination des valeurs d'enrichissement

L'hydrolysate est séché sous hydrogène et les acides aminés sont purifiés grâce à une étape de chromatographie échangeuse de cations utilisant la résine Dowex 50WX8-200 (Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Les acides aminés sont ensuite estérifiés avec un mélange de N-propanol/acétylchloride et dérivés en utilisant de l'HFBA (Fluka, Saint-Quentin Fallavier, France). L'analyse en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est

ensuite réalisée. Les enrichissements isotopiques sont déterminés en sélectionnant les ions de masse m/z 282 et 285.

7. Modélisation

L'analyse cinétique a été réalisée en utilisant le logiciel de simulation, analyse et modélisation SAAM II (SAAM II v 1 0.1, Resource Facility for Kinetic Analysis, Department of Bioengineering, SAAM Institute, Seattle, WA). Les modèles d'étude du métabolisme des pré β_1 HDL et des α HDL à jeun et à l'état nourri sont décrits dans la partie résultat.

Le taux de production (FPR), c'est à dire la proportion d'Apo A-I à entrer dans le pool par unité de temps (j^{-1}), et le débit de production, c'est à dire la quantité d'Apo A-I à entrer dans le pool par unité de temps ($mg.kg^{-1}.j^{-1}$), ont été estimés. L'APR est le produit du FPR et de la taille du pool d'Apo A-I des différentes sous classes de lipoprotéines. La taille du pool d'Apo A-I ($mg.kg^{-1}$) a été calculée en multipliant la concentration en Apo A-I par $0.045 l.kg^{-1}$, assimilé le volume plasmatique à 4.5% du poids corporel. Le pool d'Apo A-I est considéré comme étant constant, car aucune variation significative n'a été observée entre les différentes mesures réalisées au cours de la cinétique. Sous ces conditions, le FPR est égal au taux de catabolisme (FCR). La clearance directe de l'Apo A-I et le recyclage de l'Apo A-I entre les lipoprotéines ont été analysé distinctement et sont exprimés en j^{-1} . Pour estimer la synthèse intestinale et hépatique de l'Apo A-I, nous avons utilisé la valeur d'enrichissement isotopique du plateau de l'Apo B48 des TRL et de l'Apo B100 des VLDL comme pool précurseur, respectivement. Ces deux apolipoprotéines ont été analysées en utilisant un modèle mono-compartimental.

RESULTATS

1. Détermination des pools précurseurs de la synthèse intestinale et hépatique de l'Apo A-I

L'enrichissement des pools précurseurs de la leucine hépatique et intestinale a été mesuré au niveau de l'Apo B100 des VLDL et au niveau de l'Apo B48 des TRL, respectivement. Les TRL sont l'ensemble des lipoprotéines de densité inférieure à $1.006g/ml$ et regroupent les VLDL, chylomicrons et chylomicrons remnants.

Les courbes d'enrichissement en d_3 -leucine de l'Apo B100 des VLDL à jeun et à l'état nourri sont représentées sur la figure 34 et pour l'Apo B48 des TRL à l'état nourri sur la figure 35. L'Apo B48 n'a pas été retrouvée à jeûn.

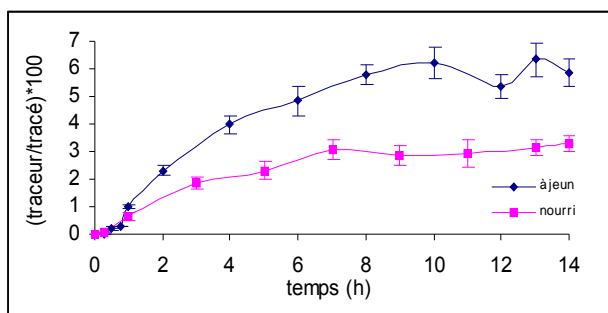


Figure 34 : Courbes d'enrichissement en d_3 -leucine de l'Apo B100 des VLDL à jeun et à l'état nourri

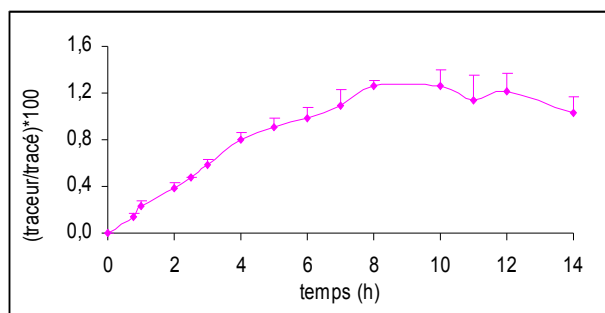


Figure 35 : Courbe d'enrichissement en d_3 -leucine de l'Apo B48 des TRL

- Les VLDL présentait une courbe d'enrichissement en traceur de l'Apo B100 supérieure à jeun qu'à l'état nourri. Ces données sont similaires à celles décrites par Cohn *et al.* (Cohn J.S. et al., 1990). On peut noter que les niveaux d'enrichissement en leucine marquée au niveau du plasma étaient aussi abaissés sous l'effet de l'alimentation ($9.18 \pm 0.75\%$ et $6.40 \pm 0.74\%$ $p < 0.05$, respectivement). Cette dilution isotopique s'expliquait par l'apport d'acides aminés au cours des différentes prises alimentaires.
- Le plateau de l'Apo B48 des TRL a atteint une valeur égale à 48% du plateau de l'Apo B100 des VLDL dans notre étude ($1.35 \pm 0.46\%$ pour l'Apo B48 vs. $3.22 \pm 0.93\%$ pour l'Apo B100 à l'état nourri). Cette donnée recoupait celles de la littérature (Lichtenstein A.H. et al., 1992; Vélez-Carrasco W. et al., 1999). Toutefois des divergences peuvent exister au niveau de l'analyse de l'Apo B48 des TRL. En effet, Welty *et al.* ont montré que des différences d'enrichissement de l'Apo B48 étaient observées en fonction de l'utilisation ou non de la résine échangeuse d'ions après l'hydrolyse de la bande de gel d'Apo B48. La valeur du plateau de l'Apo B48 était aux environs de 50% de celle du plateau de l'Apo B100 avec l'étape de chromatographie et aux environs de 75% quand elle n'était pas effectuée. Des observations similaires ont été réalisées sur l'Apo B67 (Welty F.K. et al., 1997). Les auteurs ont supposé que cette différence était due à une contamination bactérienne de l'eau de lavage des colonnes qui diluerait le marquage par un apport de leucine froide. Cette contamination serait visible uniquement pour des

apolipoprotéines peu concentrées, comme l'Apo B67 qui nécessite de pooler au moins 4 bandes de gel pour détecter un enrichissement. Dans notre étude, pour l'Apo B48, une seule bande de gel permettait d'obtenir un enrichissement et l'eau distillée utilisée ne contenait pas de leucine pouvant expliquer une telle dilution (données non montrées).

- Les paramètres cinétiques de l'Apo B48 des TRL de notre étude et ceux déjà publiés sont regroupés dans le tableau 7. Quelque soit la valeur du plateau de l'Apo B48 (50% ou 75% de celui de l'Apo B100), ces données sont très proches ; ceci peut s'expliquer par le fait que l'analyse est réalisée grâce à un système mono-compartimental pour modéliser la courbe d'enrichissement de l'Apo B48, la valeur du plateau de la protéine est directement utilisée pour renseigner sur l'enrichissement du pool précurseur intestinal. Ainsi, le rapport d'enrichissement B48/B100 n'intervient pas dans le calcul.

	Repas (P, G, L)	Rapport plateau B48/B100	pool (mg)	Taux de catabolisme j⁻¹	Taux de synthèse mg.kg⁻¹.j⁻¹
<i>Présente étude</i>	15%, 44%, 41%	48%	15.4 ± 6.0	6.7 ± 2.3	1.5 ± 0.6
(Lichtenstein A.H. et al., 1992)	15%, 49%, 36%	54%	15.5 ± 8.9	4.4 ± 2.0	1.3 ± 0.5
(Ikewaki K. et al., 1993)	16%, 47%, 37%	72%	-	6.2 ± 2.2	-
(Vélez-Carrasco W. et al., 1999)	16%, 49%, 35%	77%	14.0 ± 8.7	5.2 ± 2.1	0.9 ± 0.5
(Welty F.K. et al., 1999)	15%, 49%, 36%	50%	15.0 ± 9.6	5.1 ± 2.7	1.2 ± 0.8

Tableau 7 : Synthèse des données cinétiques de l'Apo B48 des TRL

2. Analyse cinétique de l'Apo A-I des pré β_1 HDL et α HDL à jeun et à l'état nourri

Les courbes d'enrichissement en d₃-leucine de l'Apo A-I des pré β_1 HDL et des α HDL à jeun et à l'état nourri sont représentées sur la figure 36 et la figure 37, respectivement. Ces données sont indiquées jusqu'à 14h de cinétique puis jusqu'au prélèvement 96h.

A l'état nourri, nous n'avons pas observé de variations significatives au niveau des valeurs d'enrichissement de l'Apo A-I des pré β_1 HDL ou des α HDL. Pourtant, les valeurs

d'enrichissement au plateau des différents pools précurseurs possibles sont abaissées sous l'effet de l'alimentation (l'Apo B100 des VLDL ou encore la leucine plasmatique). Ces courbes d'enrichissement pourraient laisser à penser que le pool d'Apo A-I au niveau des HDL se renouvellerait plus rapidement à l'état nourri qu'à l'état de jeûne ou bien que le recyclage de l'Apo A-I marquée était plus important.

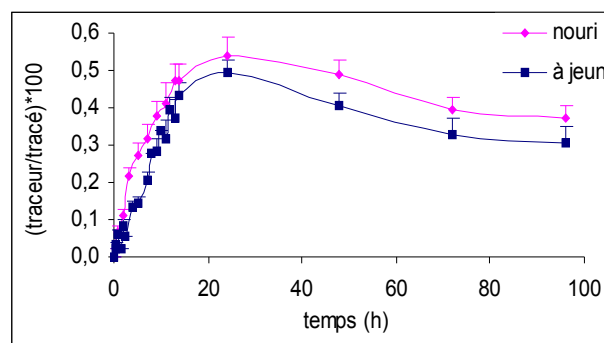
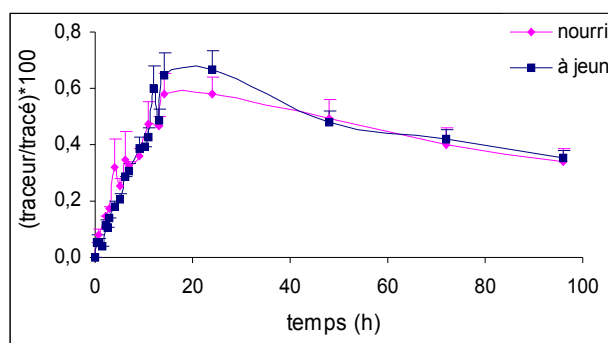
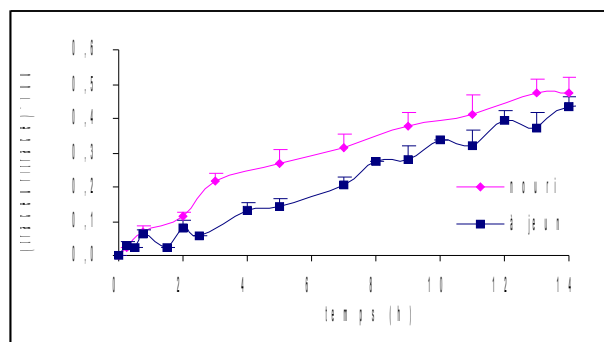
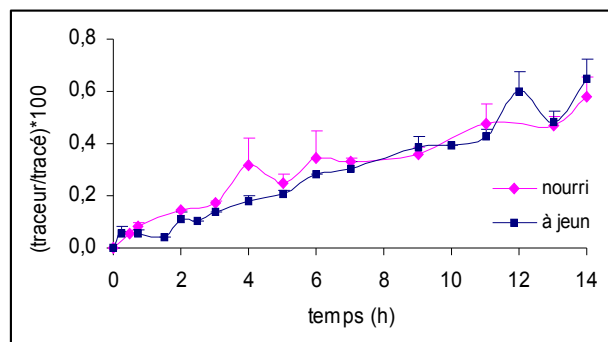
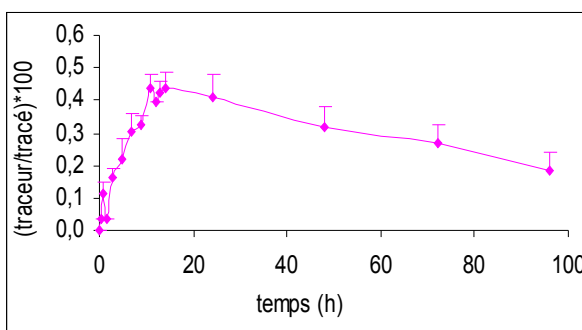
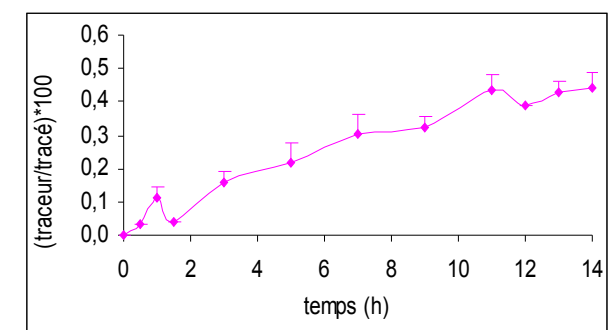


Figure 36 : Courbes d'enrichissement en d_3 -leucine de l'Apo A-I des $\text{pr}\beta_1$ HDL à jeun et à l'état nourri

Figure 37 : Courbes d'enrichissement en d_3 -leucine de l'Apo A-I des α HDL à jeun et à l'état nourri

3. Analyse cinétique de l'Apo A-I des TRL à l'état nourri

Les courbes d'enrichissement en d_3 -leucine de l'Apo A-I des TRL à l'état nourri sont représentées sur la figure 38. Ces données sont indiquées jusqu'à 14h de cinétique et jusqu'au



prélèvement 96h.

Figure 38 : Courbes d'enrichissement en d_3 -leucine de l'Apo A-I des TRL à l'état nourri

L'Apo A-I des TRL présentait des valeurs d'enrichissement en leucine à peu près similaires à celles de l'Apo A-I des HDL. Une différence majeure existait après l'arrêt de la perfusion. En effet, la disparition du traceur était beaucoup plus rapide au niveau de l'Apo A-I des TRL que pour l'Apo A-I des HDL (Figure 39).

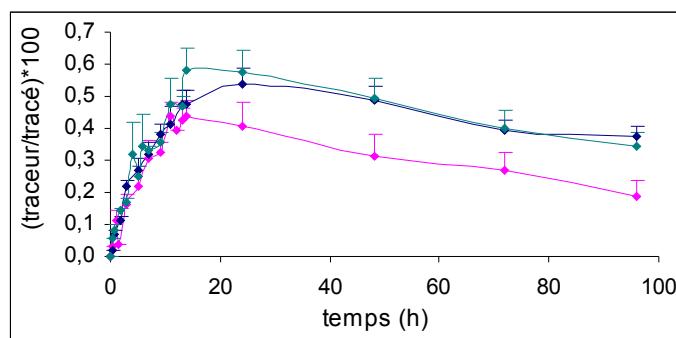


Figure 39 : Bilan des courbes d'enrichissement en d_3 -leucine de l'Apo A-I au niveau des TRL (rose), des pré β_1 HDL (vert) et des α HDL (bleu) à l'état nourri

Cette décroissance d'enrichissement au niveau du pool de l'Apo A-I des TRL pourrait s'expliquer par un échange rapide de la protéine des TRL vers les HDL et une dégradation directe. Le temps de résidence de l'Apo A-I au niveau des TRL semblait donc plus court qu'au niveau des HDL.

4. Analyse compartimentale

- **Choix du modèle**

Dans un premier temps, nous avons voulu modéliser le métabolisme de l'Apo A-I à l'état nourri uniquement au niveau des pré β_1 HDL et des α HDL. Nous sommes partis du modèle déjà décrit pour les études précédentes à l'état de jeune (Figure 40a) et nous avons ajouté une synthèse intestinale d'Apo A-I s'incorporant au niveau des précurseurs, les pré β_1 HDL (Figure 40b). Nous avons fait l'hypothèse que l'Apo A-I, nouvellement synthétisée par l'intestin, pouvait entrer directement dans la composition des pré β_1 HDL suite aux données observées lors de l'étude préliminaire chez la patiente présentant un chylothorax.

Nous nous sommes heurtés à un problème de modélisation ; le logiciel SAAM II ne pouvant pas estimer les différents paramètres en raison de la double entrée forcée au niveau d'un même compartiment (les pré β_1 HDL dans notre cas).

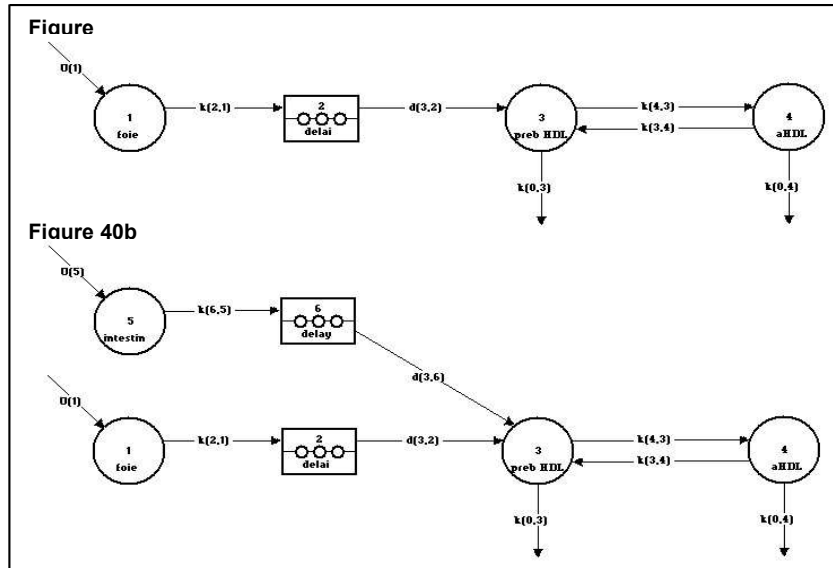


Figure 40 : (a) Modèle simple utilisé pour l'étude à jeun
 (b) Modèle à double entrée forcée utilisé pour l'étude à l'état nourri

Nous avons donc envisagé un autre modèle en nous inspirant de celui de Vélez-Carrasco *et al.* (Vélez-Carrasco W. et al., 1999). Dans ce modèle, l'Apo A-I intestinale nouvellement synthétisée s'incorpore au niveau des TRL avant d'être transférée aux HDL. Les HDL étaient isolées par ultracentrifugation et modélisées selon un seul compartiment (Figure 41). De plus, un catabolisme direct de l'Apo A-I des TRL n'était pas pris en compte et le transfert de l'Apo A-I se faisait uniquement dans le sens TRL vers HDL. Les auteurs suggéraient qu'un échange d'Apo A-I existait entre les TRL et les HDL mais que celui-ci était trop rapide *in vivo* pour que le modèle soit capable de le mesurer.

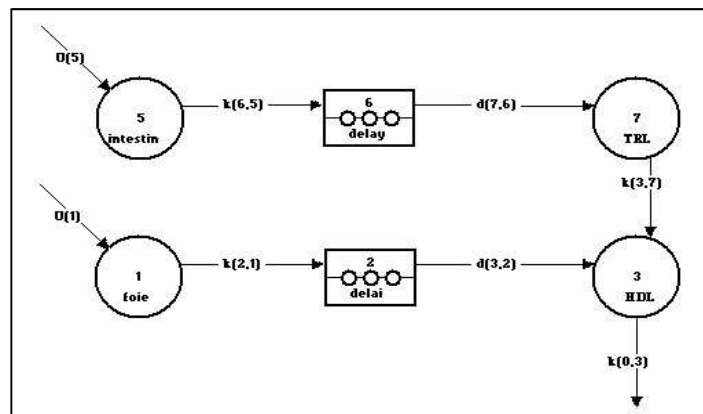


Figure 41 : Modèle de Vélez-Carrasco *et al.* (Vélez-Carrasco W. et al., 1999).

Pour notre étude, nous sommes partis sur la base du modèle précédent : l'Apo A-I synthétisée par l'intestin incorpore dans un premier temps au niveau des TRL, mais ensuite la protéine est soit échangée avec les préβ₁ HDL et les αHDL soit elle subit un catabolisme direct (Figure 42).

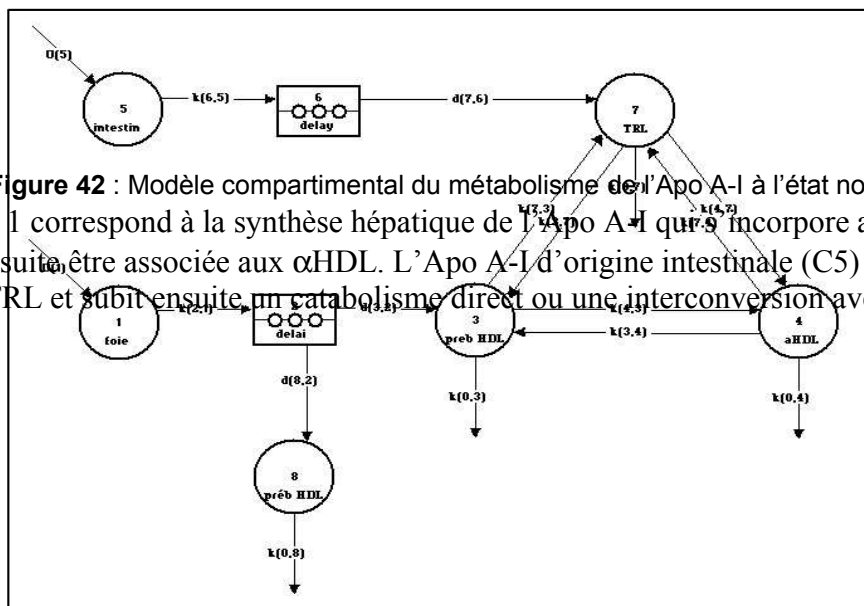


Figure 42 : Modèle compartimental du métabolisme de l'Apo A-I à l'état nourri

Le compartiment 1 correspond à la synthèse hépatique de l'Apo A-I qui s'incorpore au sein des préβ₁ HDL et peut ensuite être associée aux αHDL. L'Apo A-I d'origine intestinale (C5) s'incorpore au niveau des TRL et subit ensuite un catabolisme direct ou une interconversion avec les HDL.

des TRL
HDL est la

L'échange
vers les

conséquence d'un processus de lipolyse par la LPL qui aboutit à la libération de composants de surface comme l'Apo A-I, qui peut s'incorporer dans la composition des préβ₁ et des αHDL. A l'inverse, l'Apo A-I peut aussi être transférée des HDL vers les TRL.

- **Données cinétiques**

Données cinétiques basées sur un modèle complexe:

Les paramètres cinétiques du métabolisme de l'Apo A-I à jeun et à l'état nourri sont représentés sur la figure 43 et tableau 8.

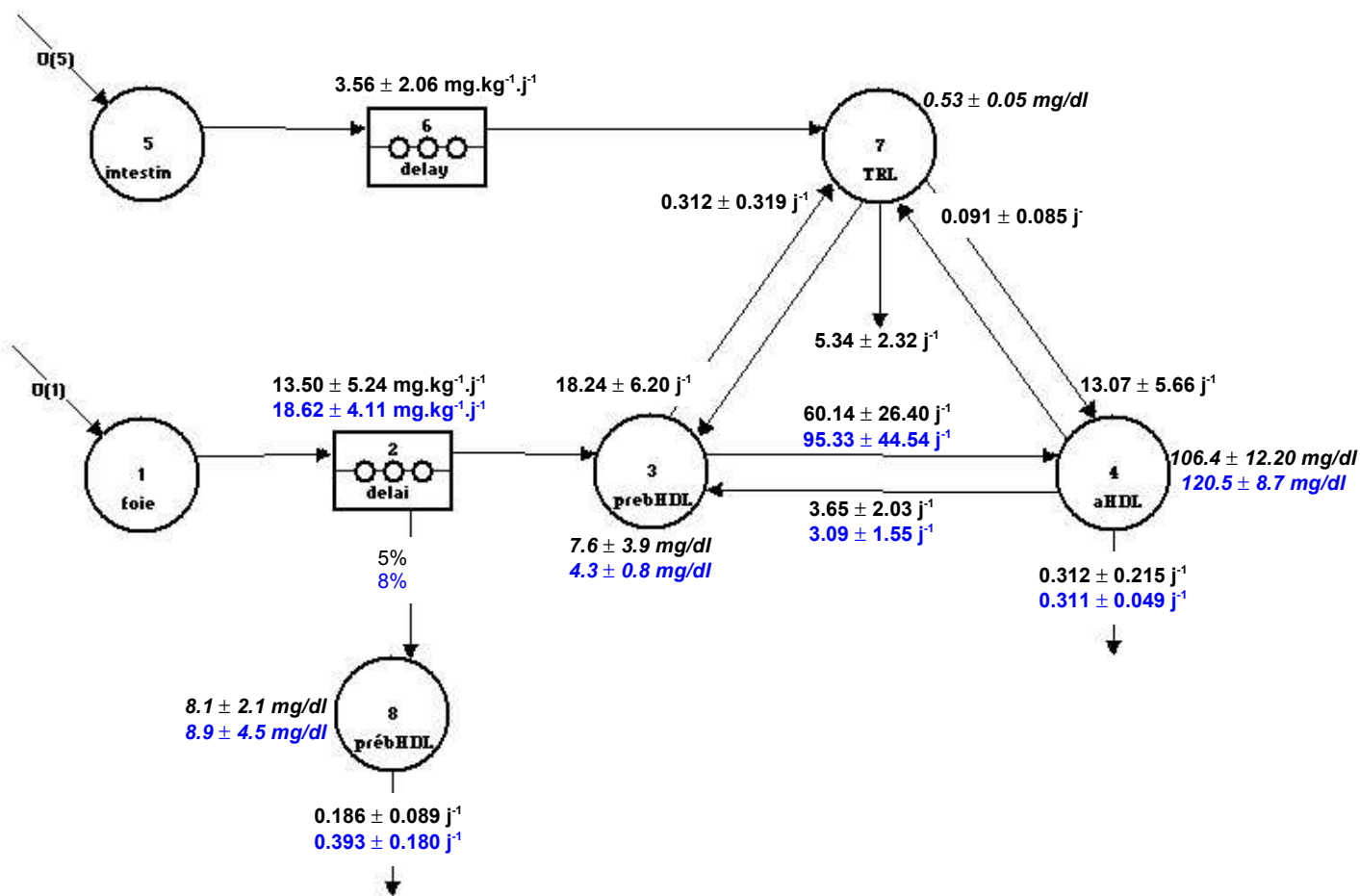


Figure 43 : Données cinétiques du métabolisme de l'Apo A-I à jeun (bleu) et à l'état nourri (noir) – modèle complexe (moyenne ± SD)

Le logiciel SAAM II accepte le calcul mais certains paramètres présentent des valeurs statistiques non satisfaisantes ; notamment au niveau des échanges entre TRL et HDL. Néanmoins, tous les paramètres du modèle semblent indispensables pour le fit simultané des trois courbes (Figure 44). L'hétérogénéité des préβ₁ HDL joue un rôle au niveau de la distinction des courbes des préβ₁ HDL et des αHDL et le paramètre de clearance directe k(0,3) du compartiment n°3 des préβ₁ HDL est quantifiable pour 3 sujets uniquement et reste très faible et hétérogène ($k(0,3)=0.036 \pm 0.039 \text{ j}^{-1}$).

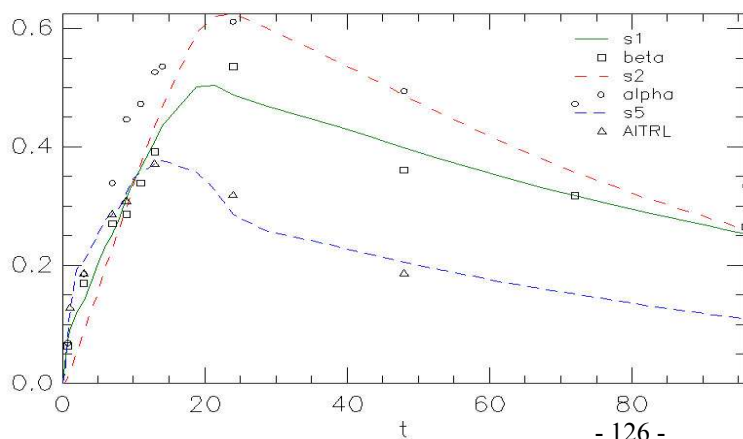


Figure 44 : Valeurs d'enrichissement de l'Apo A-I des TRL (triangles, ---), préβ₁ HDL (carrés, ---) et αHDL (ronds, ---) pour un patient représentatif. Les lignes représentent les fits obtenus avec le modèle.

Tableau 8 :

	Pool Apo A-I α HDL	Pool Apo A-I pré β_1 HDL	Conversion pré β_1 HDL en α HDL	Conversion α HDL en pré β_1 HDL	Catabolisme direct Apo A-I pré β_1 HDL	Catabolisme direct Apo A-I α HDL	Débit de synthèse hépatique	Pool Apo A-I TRL	Catabolisme direct Apo A-I TRL	Débit de synthèse intestinale	Conversion Apo A-I TRL - pré β_1 HDL	Conversion Apo A-I pré β_1 HDL - TRL	Conversion Apo A-I TRL - α HDL	Conversion Apo A-I α HDL - TRL
	mg.dl ⁻¹	mg.dl ⁻¹	j ⁻¹	j ⁻¹	j ⁻¹	j ⁻¹	mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	mg.dl ⁻¹	j-1	mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	j-1	j-1	j-1	j-1
A l'état nourri														
S1	96.8	14.8	69.60	5.52	0.123	0.372	11.98	0.44	6.91	5.96	22.82	0.136	18.41	0.073
S2	117.3	17.7	67.44	5.88	0.073	0.487	21.80	0.57	2.81	4.94	18.67	0.449	11.45	0.024
S3	107.0	11.7	94.32	3.00	0.190	0.173	7.40	0.55	2.78	2.62	8.14	0.814	5.95	0.006
S4	119.3	15.4	44.16	1.00	0.281	0.215	14.05	0.55	7.06	0.67	17.78	0.083	10.27	0.146
S5	91.6	19.6	25.20	2.83	0.262	0.314	12.26	0.55	7.13	3.38	23.76	0.082	19.27	0.208
Moyenne	106.4	15.8	60.14	3.65	0.186	0.312	13.50	0.53	5.34	3.52	18.24	0.312	13.07	0.091
SD	12.2	3.0	26.40	2.03	0.089	0.125	5.24	0.05	2.32	2.06	6.20	0.319	5.66	0.085
A jeun														
S1	130.4	18.5	96.01	2.38	0.674	0.348	24.88							
S2	119.0	14.6	66.48	2.54	0.300	0.343	19.65							
S3	110.1	13.5	156.00	4.56	0.463	0.329	18.35							
S4	128.4	12.8	41.04	1.16	0.222	0.227	13.98							
S5	114.6	7.1	117.12	4.8	0.304	0.310	16.25							
Moyenne	120.5	13.3	95.33	3.09	0.393	0.311	18.62							
SD	8.7	4.1	44.54	1.55	0.180	0.049	4.11							

Données cinétiques basées sur un modèle simple selon le modèle de Vélez-Carrasco et al. :

Nous avons modélisé le métabolisme de l'Apo A-I des HDL (α HDL) et de l'Apo A-I des TRL en reprenant nos données expérimentales et le modèle même modèle que celui de Vélez-Carrasco *et al.*. L'analyse a été réalisée sous 14h de cinétique et pour les HDL nous avons pris les données des α HDL. Les données cinétiques alors obtenues sont représentées sur la figure 45. Cette expérience avait pour but de voir si ce modèle plus simple pouvait nous apporter les mêmes informations que le modèle plus complexe. Sachant que le paramètre que nous voulons estimer les taux de synthèse intestinal et hépatique de l'Apo A-I, dans ce cas

l'hétérogénéité des pré β_1 HDL n'est pas

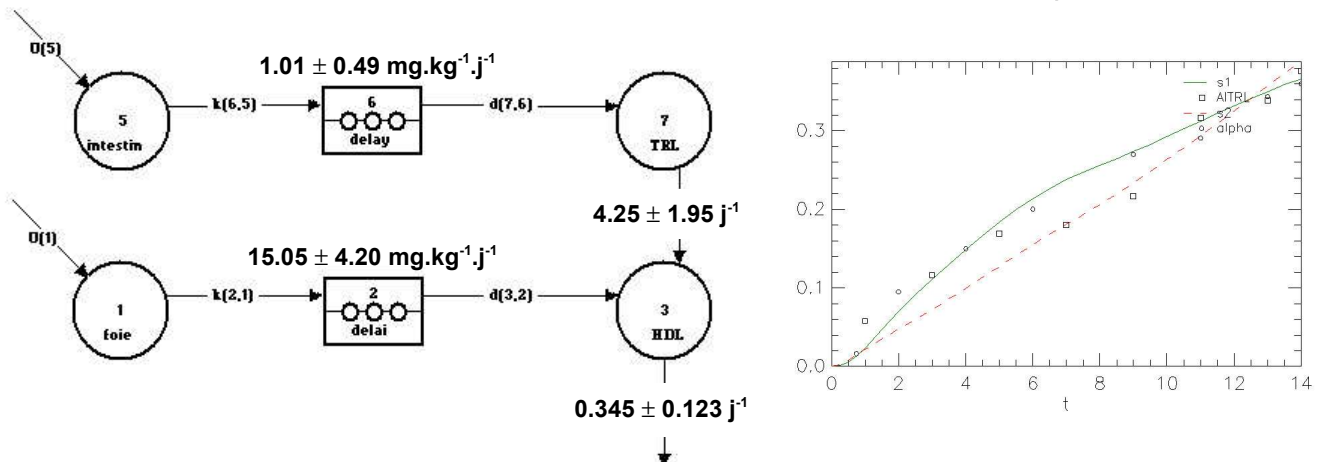


Figure 45 : Données cinétiques de l'Apo A-I des TRL et des α HDL (moyenne \pm SD). Valeurs d'enrichissement et fits de l'Apo A-I des TRL (carrés, ---), et α HDL (ronds, ---) pour un patient représentatif.

forcement nécessaire.

En comparant le modèle simple au modèle plus complexe, nous avons observé que le taux de catabolisme de l'Apo A-I des HDL est très proche ($0.345 \pm 0.123 \text{ j}^{-1}$ vs. $0.312 \pm 0.125 \text{ j}^{-1}$). Le taux de synthèse hépatique est aussi identique ($15.05 \pm 4.20 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ vs. $13.50 \pm 5.24 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$).

Pour les TRL, le taux de catabolisme est identique avec les deux modèles ($4.25 \pm 1.95 \text{ j}^{-1}$ vs. $5.34 \pm 2.32 \text{ j}^{-1}$). Par contre, bien que le taux de catabolisme et la taille du pool de l'Apo A-I – TRL soient équivalents, les taux de synthèse sont différents ($1.01 \pm 0.49 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ vs. $3.56 \pm 2.06 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$).

Ces estimations ont été réalisées sous 14h de cinétique. Quand le même modèle est étudié durant les 96h d'investigation, le modèle ne peut prendre en compte les points expérimentaux

et les fits ne sont plus corrects (Figure 46). Le modèle de Vélez-Carrasco semble donc alors trop simple sous ces conditions et les paramètres cinétiques ne peuvent pas être déterminés avec satisfaction.

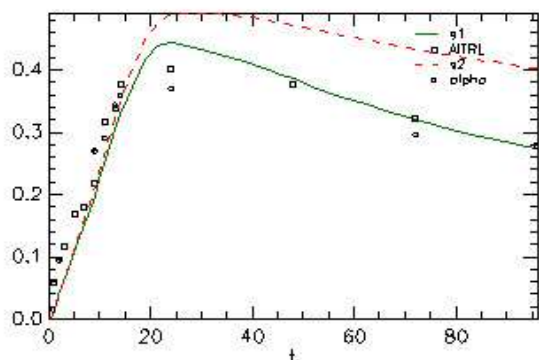


Figure 46 : Valeurs d'enrichissement de l'Apo A-I des TRL (carrés, ---), et α HDL (ronds, ---) pour un patient représentatif – modèle simple étude sous 96h de cinétique. Les lignes représentent les fits obtenus avec le modèle.

DISCUSSION

Le but de cette étude était de caractériser le métabolisme des pré β_1 et des α HDL à l'état nourri et de déterminer la contribution de l'intestin dans la synthèse de l'Apo A-I. Sous l'effet de l'alimentation, le catabolisme des HDL matures est inchangé. La synthèse totale de l'Apo A-I est aussi identique à jeun et à l'état nourri avec une contribution relative de l'intestin à l'état nourri estimée à $21 \pm 11\%$.

Le premier élément mis en évidence dans cette étude est que l'alimentation ne semble pas avoir d'effet majeur sur le catabolisme de l'Apo A-I en particulier sur celui de l'Apo A-I des HDL matures. Ces données sont donc en accord avec le fait que la concentration en Apo A-I ne varie pas en période post prandiale par rapport aux données à l'état basal. Que se soit avec des régimes riches en graisses saturées ou en graisses insaturées (Sheperd et al., 1978b), des régimes riches ou pauvres en graisses et en cholestérol (Brinton et al., 1990) ou encore des régimes pauvres en graisses saturées et en cholestérol (Vélez-Carrasco et al., 1999b), le taux de catabolisme de l'Apo A-I des HDL ne subit pas de variations significatives. De plus, lors d'une étude comparative, Cohn *et al.* ont précédemment caractérisé le catabolisme de l'Apo A-I comme étant identique à jeun et à l'état nourri (Cohn J.S. et al., 1990). Le débit de synthèse était lui aussi inchangé. Mais soulignons que dans cette étude la modélisation a été réalisée avec le plateau de l'Apo B100 des VLDL comme pool précurseur de l'Apo A-I à jeun comme à l'état nourri, en faisant l'impasse sur l'intestin comme organe précurseur de la synthèse d'Apo A-I. Ces données cinétiques sont donc à prendre avec précaution mais sont similaires à nos résultats.

A l'état nourri, les pools précurseurs de la synthèse de l'Apo A-I présentent des courbes d'enrichissement inférieures par rapport à l'état de jeûne du fait de l'apport d'acides aminés de l'alimentation. Paradoxalement, les valeurs expérimentales de l'Apo A-I des HDL ne sont pas statistiquement différentes mais tendent à être supérieures. Ces données pourraient être expliquées par un recyclage permanent de la protéine marquée plus important en période post-prandiale entre les HDL et les TRL. Le modèle ainsi décrit dans cette étude semble donc adapté au mieux pour étudier tous ces phénomènes d'échange et de recyclage de l'Apo A-I.

En nous basant sur le fait qu'au niveau du chyle l'Apo A-I était retrouvée principalement dans les $\text{pr}\beta_1$ HDL, un paramètre nous a posé beaucoup d'interrogations : celui qui caractérise l'incorporation de l'Apo A-I d'origine intestinale directement au niveau des $\text{pr}\beta_1$ HDL ($k(3,6)$). Mais ce paramètre n'a pas pu être estimé. En effet, quelque soit la valeur arbitraire qu'on lui donne pour débiter le calcul, le logiciel la garde et l'ensemble des autres paramètres cinétiques ne varie pas comme si la synthèse d'Apo A-I intestinale au niveau des $\text{pr}\beta_1$ HDL n'existait pas. La contribution de l'intestin au pool de $\text{pr}\beta_1$ HDL est donc indirecte et nécessite un passage par les TRL. Nous observons donc une contradiction entre les données obtenues au niveau du chyle et les données cinétiques. Cette différence peut être expliquée par les limites de la modélisation et de nos conditions expérimentales, mais on peut aussi supposer que les sujets présentant un chylothorax ne sont pas de bon modèle d'étude du métabolisme intestinal de l'Apo A-I et ne reflètent pas la physiologie. On peut penser en effet que la présence exclusive des $\text{pr}\beta_1$ HDL au niveau du chyle est un artefact lié à la pathologie et à la résidence prolongée du chyle au niveau pleural et qu'en cas de situation normale d'autres voies métaboliques se mettent en place.

Dans la littérature, les $\text{pr}\beta_1$ HDL sont décrites au niveau de la lymphe périphérique (collectée au niveau des vaisseaux sous cutanés des membres inférieurs), avec des concentrations égales à 20% de celles du plasma (Nanjee M.N. et al., 2000). Les α HDL sont elles aussi retrouvées au niveau de la lymphe, la même proportion de concentration par rapport au valeur plasmatique est observée (~20%). De plus anciennes études n'avaient pas mis en évidence la présence de particules naissances $\text{pr}\beta$ HDL au niveau de la lymphe mais la préparation des échantillons en est probablement la cause ; les HDL étant séparées par ultracentrifugation (Green P.H.R. et al. 1979 ; Rudra D.N. et al., 1984). Toutefois, ces données et celle de notre patiente avec un chylothorax ne peuvent pas réellement être mis en

relation de part les différences d'origine de prélèvements et de préparations des échantillons. En effet, les échantillons lymphatiques sont souvent collectés en périphérie (sous cutanés ou au niveau des pieds). Ainsi, le profil des HDL de la lymphe apparaît comme étant, à des concentrations plus faibles, un reflet direct de celui du plasma et ne peut servir de modèle dans l'étude du métabolisme intestinal des lipoprotéines.

Un travail réalisé chez des rats a permis de mettre en évidence que l'intestin sécrète des particules discoïdales riches en phospholipides et déficientes en esters de cholestérol (Green P.H.R. et al., 1978). Dans cette étude, les échantillons de lymphe mésentérique ont été prélevés avec ou sans DTNB (acide 5,5' dithionitrobenzoïque), un inhibiteur de la LCAT. Les particules discoïdales sont présentes au niveau de tous les échantillons lymphatiques bien qu'elles soient plus importantes en présence de DTNB. A l'état basal, ~50% des HDL ont ainsi été décrites par microscopie électronique comme discoïdales au niveau de la lymphe. Cette proportion passait à 30% à l'état nourri.

Néanmoins, ces données observées sur le modèle rat diffèrent des données décrites par Anderson *et al.* chez l'homme. En effet, cette équipe a étudié la répartition de l'Apo A-I au niveau de la lymphe drainée par le canal thoracique chez des sujets avant ou après une transplantation rénale (Anderson D.W. et al, 1981). L'Apo A-I est retrouvée au niveau de particules de type HDL_{2a} et HDL_{2b}, et, en microscopie électronique, les HDL discoïdales sont absentes avec ou sans DNTB. De plus, les auteurs calculent que ~80% de l'Apo A-I lymphatique provient du plasma et retourne dans ce même compartiment plasmatique chaque jour. Ainsi, en considérant que seule l'Apo A-I associée aux chylomicrons de la lymphe représente la synthèse d'origine intestinale, cette équipe a estimé la contribution relative de l'intestin dans la synthèse de l'Apo A-I à $26 \pm 10\%$. Notre donnée pour la synthèse intestinale de l'Apo A-I, représentant $21 \pm 11\%$ de la synthèse totale d'Apo A-I, concorde avec cette estimation.

Ce travail a aussi permis de confirmer l'importance des TRL dans l'incorporation de l'Apo A-I intestinale nouvellement synthétisée avant son transfert vers les HDL. Vélez-Carrasco *et al.* avaient déjà estimé le métabolisme de l'Apo A-I des TRL (Vélez-Carrasco W. et al., 1999). Le pool d'Apo A-I au niveau des TRL ainsi que les taux de synthèse et de catabolisme décrits sont beaucoup plus faibles par rapport à notre travail (Tableau 9). Dans cette étude, les fits de l'Apo A-I des TRL et des HDL obtenus par modélisation sont assez semblables et parallèles (Figure 47), bien que les courbes d'enrichissement expérimentales pour l'Apo A-I des TRL présentent une pente plus atténuée que celles pour l'Apo A-I des HDL. Les auteurs

semblent donc avoir donnés du poids à certains points. Néanmoins, l'Apo A-I présente un taux de catabolisme identique au sein des TRL et des HDL. De plus comme l'Apo A-I des TRL est transférée aux HDL plasmatiques et que les chylomicrons entrent dans la circulation, les auteurs suggèrent que le taux de synthèse de l'Apo A-I des TRL obtenu (650 fois inférieur à celui de l'Apo A-I des HDL) est probablement sous-estimé et ne reflète pas la quantité réelle d'Apo A-I synthétisée par l'intestin. Malgré cette sous-estimation, il est tout de même très surprenant que la synthèse intestinale ne reflète que 0.15% de la synthèse totale d'Apo A-I, ce qui est très éloigné des estimations de 10% faites par Ikewaki *et al.* (Ikewaki K. et al., 1993).

Le taux de catabolisme des α HDL est identique dans l'étude de Vélez-Carrasco *et al.* par rapport à notre travail (Tableau 9). Le débit de synthèse hépatique de l'Apo A-I est lui aussi identique. La taille du pool de l'Apo A-I des HDL diffère car dans notre étude nous utilisons la concentration de l'Apo A-I dans la sous fraction de α HDL et non la concentration plasmatique en Apo A-I. Pour le métabolisme des TRL, le pool d'Apo A-I-TRL ainsi que les taux de synthèse et de catabolisme décrits sont beaucoup plus faibles dans l'étude de Vélez-Carrasco *et al.*. Les différences observées au niveau de la taille du pool d'Apo A-I peuvent s'expliquer par une variation dans le régime donné pendant l'investigation. En effet, le repas du protocole est plus riche en lipides et moins riches en glucides que celui proposé par Vélez-Carrasco *et al.* (41% contre 35% pour les graisses et 44% contre 49% pour les sucres). L'apport plus important de graisses pourrait stimuler plus fortement la synthèse intestinale et augmenter par ce fait le pool ainsi que le turnover de la protéine. La différence importante au niveau du taux de catabolisme et du débit de synthèse peut s'expliquer en partie par une taille du pool différente ou encore un échange unilatéral d'Apo A-I entre les TRL et les HDL.

Comme nous pouvions le penser au vue des courbes d'enrichissement, le temps de rétention de l'Apo A-I dans les TRL est plus faible que dans les α HDL (en moyenne 0.187 jour pour Apo A-I-TRL vs. 3.20 jour pour Apo A-I- α HDL). Le temps de rétention de l'Apo A-I des TRL est proche de celui de l'Apo B48 des TRL (0.187 jour et 0.149 jour, respectivement). Les autres paramètres cinétiques de l'Apo A-I des TRL (synthèse, catabolisme, taille du pool) sont eux aussi assez similaires aux valeurs de l'Apo B48 des TRL (Tableau 6). Il apparaît que l'Apo A-I a un comportement cinétique qui suit celui des lipoprotéines à renouvellement rapide qu'elle compose comme les TRL (VLDL et chylomicrons).

Le débit de synthèse de l'Apo A-I intestinale diffère selon les deux modèles étudiés. La contribution de l'intestin est de $6.1 \pm 1.6\%$ avec le modèle simple et de $21 \pm 11\%$ avec le modèle complexe en utilisant les mêmes données. Cette différence peut s'expliquer par le fait que notre modèle utilise les données de 96h et que nous avons opté de travailler avec un échange d'Apo A-I et non un transfert net entre les TRL et les HDL. De plus le métabolisme des $\text{pr}\beta_1$ HDL et des α HDL est pris en compte. Pour ce modèle, les paramètres d'échanges de l'Apo A-I entre les TRL et les HDL sont très hétérogènes et pas en équilibre de masse (le taux d'Apo A-I des TRL transféré aux HDL est supérieur à celui de l'Apo A-I des HDL vers les TRL), la valeur de la perte totale de l'Apo A-I des TRL est supérieure à celle du catabolisme direct de la protéine du compartiment 7 des TRL ($k(0,7)$) et donc le débit de synthèse intestinal est peut être alors sur-estimé. Nous pouvons calculer que cette surestimation pourrait atteindre au maximum les 44% et ramènerait la synthèse intestinale de l'Apo A-I à $11.7 \pm 6.0\%$ de la synthèse totale. Pour le modèle simple, la sous-estimation soulignée par Vélez-Carrasco *et al.* dans leur étude, du fait de la disparition de l'Apo A-I vers les HDL et des TRL dans la circulation, peut aussi exister. Mais ce modèle semble trop simple pour l'analyse sous 96h et perd les informations essentielles liées à la décroissance. Néanmoins, le débit de synthèse intestinale estimé par ces modèles se rapproche de celui de 10% calculé par Ikewaki *et al.* à l'aide d'une technique de marquage exogène et endogène de l'Apo A-I.

Par ailleurs, à l'état nourri, on n'observe pas de différence significative entre la synthèse totale de l'Apo A-I (foie et intestin) par rapport à celui observé à l'état de jeûne supposé comme étant uniquement hépatique. Il semble donc que sous l'effet de l'alimentation, la synthèse hépatique de l'Apo A-I soit réduite ($13.50 \pm 5.24 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ vs. $18.62 \pm 4.11 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$). Cette différence n'est pas significative, mais on peut supposer un possible phénomène d'adaptation de la synthèse hépatique quand la synthèse intestinale est stimulée ou en réponse à l'alimentation. Cependant soulignons que ces paramètres de synthèse sont calculés à l'aide des différents paramètres de sortie et d'entrée du compartiment d'intérêt et certains de ces flux, comme les échanges entre les HDL et les TRL, sont très variables. Ces déviations standard doivent encore être affinées en poursuivant les simulations mais ne devraient pas faire varier beaucoup la différence observée au niveau du débit de synthèse hépatique de l'Apo A-I.

En conclusion, cette étude cinétique a permis de montrer *in vivo* l'importance des TRL dans la prise en charge de l'Apo A-I d'origine intestinale. Les $\text{pr}\beta_1$ HDL ont une importance moindre et la contribution intestinale sur ce pool est indirecte. Cette investigation, grâce à une

étude sur 96h, permet d'obtenir plus d'informations sur les échanges de l'Apo A-I entre les différentes lipoprotéines. Enfin, la contribution de l'intestin dans la synthèse de l'Apo A-I a pu être estimée aux environs de 10 à 20% de la synthèse totale ; données qui sont en accord avec celles décrites à l'aide de techniques de marquage exogène et endogène de l'Apo A-I (~10%) et celles décrites *in vivo* au niveau de la l'Apo A-I des TRL de la lymphe du canal thoracique (~26%).

ETUDE PAR DOUBLE MARQUAGE

1. Méthode

La deuxième méthode de travail est de réaliser un marquage endogène spécifique de l'Apo A-I d'origine intestinale. Nous pouvons différencier ces deux sources de synthèse en réalisant un double marquage endogène, d'une part de l'Apo A-I intestinale par une injection d'un traceur dans le tube digestif, d'autre part de l'Apo A-I hépatique et intestinale par une injection intraveineuse d'un autre traceur. (Krempf M. et al., 1993; Maugeais C. et al., 1998). La leucine deutérée pourra être infusée au niveau veineux par une infusion continue durant 14h et permettra de marquer à la fois l'Apo A-I d'origine intestinale et hépatique. Afin de marquer l'apolipoprotéine intestinale, nous utiliserons comme traceur spécifique l'acide glutamique marqué au carbone 13 qui sera administré au patient grâce à une sonde duodénale durant les 14h de cinétique.

Notre choix s'est porté sur l'acide glutamique pour le marquage de l'Apo A-I intestinale car cet acide aminé est décrit comme étant métabolisé à 96% par les cellules intestinales. En effet, des études réalisées chez le porc avec cathétérisme ont pu montrer que seulement 4% du traceur infusé dans l'estomac était retrouvé dans le sang portal (Reeds P.J. et al., 1997). De plus, l'acide glutamique représente 12% des acides aminés totaux de l'Apo A-I, par comparaison la proportion de la leucine est de 15%. En conséquence, l'acide glutamique que nous pouvons identifier par les méthodes d'analyse en spectrométrie de masse, serait un marqueur spécifique de l'Apo A-I intestinale et par comparaison avec les données cinétiques obtenues par la leucine sur l'Apo A-I totale, nous pourrions ainsi déterminer la part respective des synthèses d'origine hépatique et intestinale.

Le protocole expérimental est décrit au niveau de la figure 48. La perfusion de leucine trideutérée et l'ingestion de glutamate marqué au ^{13}C sont réalisées pendant les 14h de cinétique. Des prélèvements plasmatiques seront réalisés tout au long de la cinétique puis à 24h, 48h, 72h et 96h.

A ce jour, cette investigation cinétique a été réalisée sur un seul patient et dans un premier à l'état de jeûne pour tester la faisabilité du protocole.

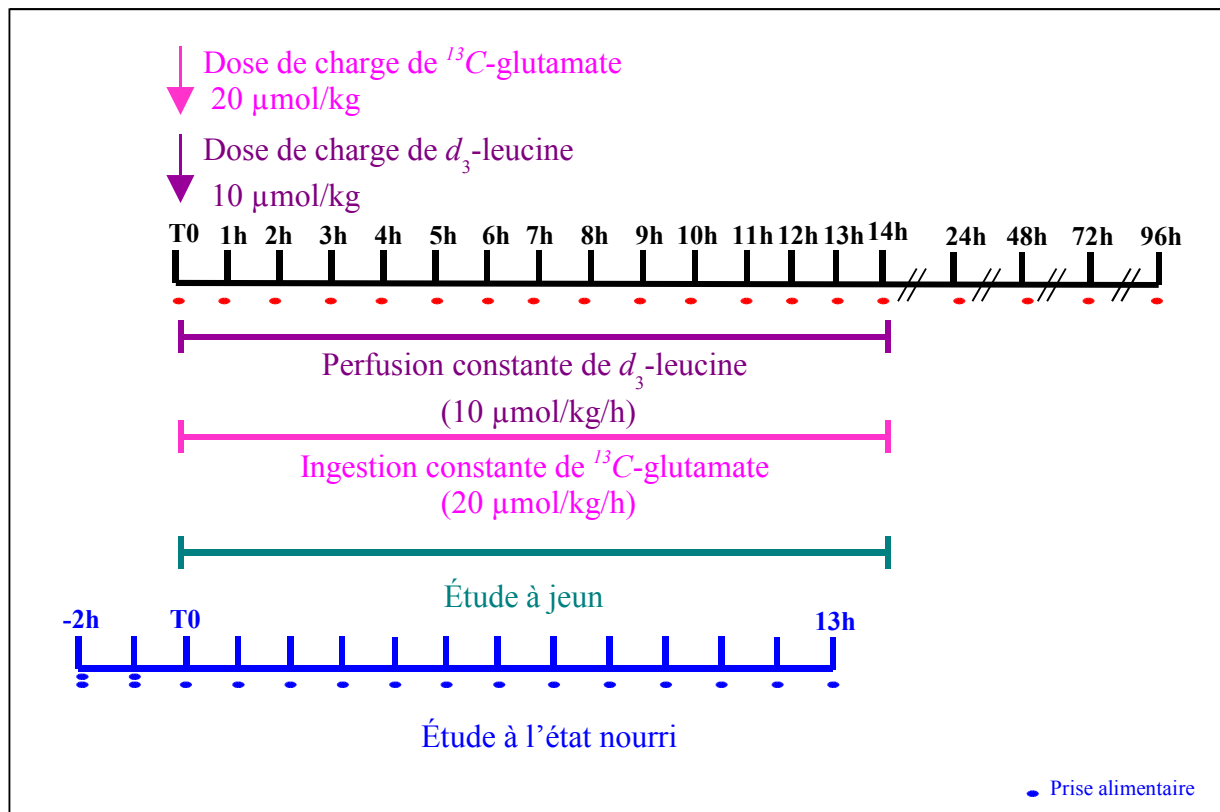


Figure 48 : **Protocole expérimental du double marquage endogène de l'Apo A-I des HDL à jeun et à l'état nourri**

2. Problématique

Tout d'abord, l'analyse de l'acide glutamique dans les échantillons protéiques n'est pas toujours simple. En effet, il est constaté une conversion de la glutamine en glutamate durant la préparation des échantillons qui pourrait conduire à des résultats erronés. En effet, le glutamate « froid » issu de la conversion de la glutamine naturelle va venir diluer le traceur et donc rendre pratiquement impossible la détection d'un enrichissement en glutamate marqué.

Cette conversion a lieu durant les phases à hautes températures. Deux étapes sont concernées : l'hydrolyse (24h à 110°C) et la phase d'estérification de la dérivation (30min à 110°C). Pour cette dernière étape, une alternative est possible en réalisant une dérivation dite douce (phase d'estérification 2h à température ambiante et sous agitation) qui apporte des résultats identiques à la dérivation classique.

Par contre, la phase d'hydrolyse pose de réels problèmes. Nous avons opté pour une technique d'hydrolyse aux micro-ondes, décrite par des équipes travaillant sur les acides aminés (Engelhart W.G., 1990; Chiou SH. et Wang KT., 1989; Engelhardt H. et al., 1990).

L'hydrolyse aux micro-ondes permet d'obtenir des résultats identiques sur des enrichissements en leucine et ceci au bout de 2min30 à une puissance de 900Watt. Un temps plus court n'apporte pas la même satisfaction. Ces conditions ont été appliquées sur des échantillons et des standards de glutamine. Malheureusement, la conversion de la glutamine en glutamate est partielle au bout de 30sec et totale après 1min. Des variations de la puissance du micro-onde (360, 480, 900Watt) n'apportent aucun changement.

Pour pallier à ce problème, nous nous sommes intéressés à une technique utilisée par l'équipe de Peter Fürst (Kuhn K.S. et al., 1996; Kuhn K.S. et al., 1999), qui permet la conversion de la glutamine en un acide stable (l'acide L-2,4 diaminobutyrique ou DABA) grâce à une dérivation en amont de l'hydrolyse et qui bloque ainsi toute conversion de la glutamine en glutamate.

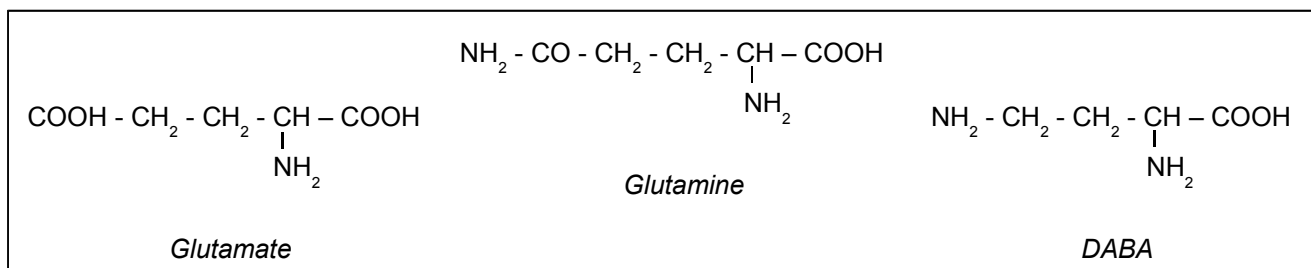


Figure 49 : Composition du glutamate, de la glutamine et l'acide L-2,4 diaminobutyrique (DABA)

Cette dérivation est réalisée en incubant les échantillons avec une solution fraîche de BTI ([bis(trifluoroacetoxy)iodo]benzène) dans du diméthylformamide (5mg/ml) et avec une solution de pyridine (50 µmol/ml), 4h à 50°C. A la suite de cette incubation les échantillons sont séchés sous azote et une hydrolyse aux micro-ondes est réalisée (2min30 à 900Watt). Puis après une étape de chromatographie échangeuse d'ions, les échantillons subissent une dérivation douce comme décrite précédemment en préparation au passage en spectrométrie de masse.

Le problème majeur est que cette technique est réalisée dans l'ensemble de ces études sur des standards de peptides ou des protéines en solution. Dans notre cas, notre échantillon est l'Apo A-I localisée dans une bande de gel d'acrylamide et il est donc nécessaire de faire différents tests pour vérifier que la dérivation BTI en bien possible sur un gel.

3. Résultats

Dans un premier temps, une partie du traceur peut être libéré dans le sang porte et s'incorporer au niveau du foie dans la synthèse de nouvelle protéine. Notre hypothèse est que, si on a une très faible quantité de traceur à libération intestinale et une très forte dilution de la glutamine et du glutamate dans le pool hépatique, le marquage de l'Apo A-I au niveau du foie devrait être extrêmement modeste. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en mesurant l'incorporation de glutamate marqué dans l'Apo B100. Malheureusement, cette démarche dépend uniquement de la mise au point de la dérivation au BTI sur gel d'acrylamide.

Toutefois, la mesure du glutamate marqué au niveau du plasma a été possible car celle-ci ne nécessite pas l'étape d'hydrolyse. La figure 50 représente la courbe d'enrichissement en ^{13}C glutamate au cours du temps. L'apparition de glutamate marqué au niveau du plasma pose un vrai problème, car ceci traduit une fuite du traceur au niveau hépatique.

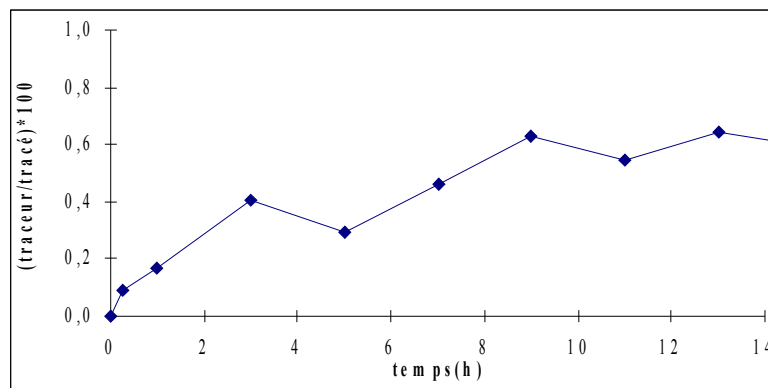


Figure 50 : Courbes d'enrichissement en ^{13}C -Glutamate au niveau du plasma à l'état à jeun

L'apparition de glutamate marqué au niveau du plasma pose un vrai problème, car ceci traduit une fuite du traceur au niveau hépatique. Pour cette expérience, on mesure l'acide aminé marqué proprement dit, mais à ce jour nous n'avons pas encore pu analyser de protéines en raison du problème technique évoqué précédemment.

On peut tout de même supposer que le glutamate ingéré n'est pas utilisé à 100% par l'intestin. Ainsi cette fuite détectée dans le plasma permet de penser que le traceur peut aussi être utilisé pour la synthèse de nouvelle protéine dans d'autres organes comme le foie et viendrait donc fausser nos résultats. La technique de double marquage pour distinguer les deux sources de synthèse de l'Apo A-I ne serait alors plus valable.

	Pool Apo A-I HDL mg.dl ⁻¹	Taux de catabolisme Apo A-I HDL j ⁻¹	Débit de synthèse Apo A-I HDL mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	Pool Apo A-I TRL mg.dl ⁻¹	Taux de catabolisme Apo A-I TRL j ⁻¹	Débit de synthèse Apo A-I TRL mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹
--	--	--	---	--	--	---

Données de Vélez-Carrasco et al.

Moyenne	134.0	0.239	14.61	0.204	0.250	0.0223
SD	14.9	0.054	4.42	0.057	0.069	0.0069

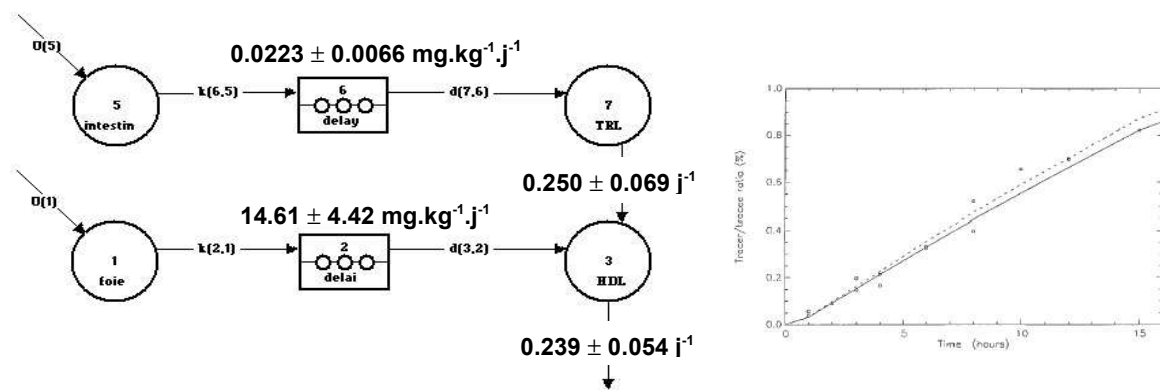
Nos données

Moyenne	106.4	0.345	15.05	0.550	4.25	1.01
SD	12.2	0.123	4.20	0.050	1.95	0.49

Tableau 9 : paramètres cinétiques de l'Apo A-I des TRL et des HDL selon le modèle de Vélez-Carrasco *et al.* :

Données cinétiques décrites par Vélez-Carrasco *et al.* :

Les données cinétiques de l'Apo A-I des TRL et des HDL ainsi que les fits obtenus par Vélez-Carrasco *et al.* sont représentées sur la figure 47.



Dans cette étude, le taux de catabolisme de l'Apo A-I est identique au sein des TRL et des HDL. Par contre, le taux de synthèse de Apo A-I des HDL est 650 fois supérieur au taux de synthèse de l'Apo A-I des TRL, ce qui signifie que la contribution intestinale serait égale à 0.15% de la synthèse totale.

Discussion Générale et Conclusion

Développement méthodologique

Au cours de ce travail, l'analyse cinétique du métabolisme des pré β_1 HDL et α HDL a été réalisée par marquage endogène de l'Apo A-I à l'aide d'isotope stable. Cette étude a nécessité le développement d'une méthode déjà utilisée pour la séparation des lipoprotéines mais jamais dans le cadre d'investigations cinétiques : le système FPLC. Les précédentes études étaient dans la plupart des cas réalisées à partir des HDL isolées par ultracentrifugation.

Dans le cas de l'ultracentrifugation, l'action cumulée de concentration élevée de sel et surtout de fortes forces centrifuges répétées imposent au plasma un environnement hostile. Il est en effet possible que des composants des lipoprotéines se détachent de leur surface : apolipoprotéines (A-I, A-IV, C, E) ou encore d'enzymes comme la LCAT. En effet pour l'Apo A-I, on observe une perte progressive de cette protéine à la suite d'ultracentrifugations répétées, jusqu'à 35% au bout de quatre opérations. Les fortes pressions générées à la surface des HDL par les forces centrifuges semblent être responsables de la perte d'Apo A-I. Ainsi, l'Apo A-I analysée après ultracentrifugation pourrait refléter un mélange d'Apo A-I issue de différentes sous classes de HDL et non uniquement des HDL matures (HDL₂ et HDL₃).

La FPLC présente donc de forts avantages par rapport aux ultracentrifugations. En effet, cette méthode douce permet d'obtenir, à partir d'uniquement 200 μ l de plasma, de nombreuses informations. Par le profil protéique, on peut évaluer la proportion plasmatique de chaque lipoprotéine. Cette première observation peut être confirmée par des dosages lipidiques et protéiques qui rendent compte de d'hypertriglycéridémie, d'hypercholestérolémie ou d'un état sain. Pour séparer le même nombre d'échantillons qu'avec l'ultracentrifugation, le système FPLC peut nous faire gagner une journée. De plus la très faible quantité de plasma utilisée, donc de sang prélevé, est beaucoup moins invasive pour les patients. Ce dernier point étant un avantage, du point de vue éthique, non négligeable.

L'utilisation de la FPLC nous a permis de séparer les pré β_1 HDL des α HDL et donc de faire la distinction entre les HDL dites précurseurs et les HDL dites matures. Cette nouvelle approche nous a permis de développer un nouveau modèle et d'avoir accès à de nouveaux paramètres cinétiques comme les taux d'interconversion de ces lipoparticules et donc leur processus de recyclage.

Nouvelle approche du métabolisme des pré β_1 HDL et des α HDL

L'étude du métabolisme cinétique des pré β_1 HDL et des α HDL a été réalisée chez des sujets sains et l'évolution des différents paramètres cinétiques a été mesurée chez des patients présentant un diabète de type II. Ces sujets sont caractérisés par une hypertriglycéridémie et une réduction du HDL cholestérol, ainsi qu'une diminution de la concentration en Apo A-I. Les flux de conversion entre les pré β_1 et les α HDL ont été estimés par un modèle multi-compartimental. Le taux de conversion des pré β_1 en α HDL n'était pas significativement différent, mais la formation des pré β_1 à partir des α HDL était augmentée chez les diabétiques de 60%. Cette exploration nous a permis de confirmer dans un premier temps que la réduction du HDL cholestérol et de l'Apo A-I lors d'un diabète de type II est essentiellement due à catabolisme accru de la protéine (au niveau des pré β_1 HDL et surtout au niveau des α HDL). De plus, cette étude suggère que l'augmentation caractéristique des pré β_1 HDL chez les patients diabétiques de type II est liée à une augmentation du recyclage des α HDL en pré β_1 HDL.

Au cours de notre étude en période post-prandiale, nous nous sommes heurté à des problèmes méthodologiques et de modélisation importants. Néanmoins, il semblerait qu'à l'état nourri les valeurs d'enrichissement de l'Apo A-I en traceur dans les différentes lipoparticules (TRL, pré β_1 HDL ou α HDL) soient assez proches. Bien que de nombreux points soient encore à approfondir, ce nouveau modèle multi-compartimental mis en place, encore en cours d'élaboration, nous a permis d'en éclaircir certains. Les premiers éléments qui ressortent de cette analyse sont que l'Apo A-I synthétisée au niveau de l'intestin a un passage obligatoire par les TRL avant d'être incorporée au niveau des HDL. Des échanges de la protéine entre les TRL et les HDL ont été identifiés bien qu'ils restent assez hétérogènes. Ce nouveau modèle nous a permis d'estimer la contribution intestinale dans la synthèse de l'Apo A-I qui semble être de l'ordre de 10 à 20% de la synthèse totale.

Limite du modèle

L'analyse compartimentale du métabolisme des HDL pose encore des interrogations pour pouvoir établir un modèle reflétant parfaitement la physiologie. La connaissance du pool précurseur de la synthèse de l'Apo A-I et l'exploration de voies métaboliques encore inconnues sont les deux points majeurs qui sont à explorer.

➤ **Connaissance du pool précurseur**

L'évaluation des paramètres cinétiques de l'Apo A-I des HDL impose la connaissance de l'enrichissement à l'équilibre du pool d'acides aminés précurseurs de sa synthèse. Comme l'Apo A-I est une protéine à renouvellement lent, expérimentalement les valeurs d'enrichissement n'atteignent pas le plateau isotopique dans nos conditions de perfusion ; ces valeurs au plateau sont donc estimées. Pour l'Apo A-I plusieurs pools précurseurs sont possibles.

La plupart des investigations cinétiques sont réalisées à jeun et il est donc supposé que l'intestin a une contribution minimale et que la synthèse de l'Apo A-I est quasi exclusivement d'origine hépatique. De plus, Ikewaki *et al.* ont décrit dans une publication maintenant de référence que la contribution de l'intestin est uniquement de 10% dans la synthèse de l'Apo A-I totale même à l'état nourri. Sous nos conditions expérimentales, c'est à dire à jeun, nous avons admis que la synthèse d'Apo A-I était majoritairement d'origine hépatique. L'Apo B100 des VLDL nous a donc semblé être un bon choix pour estimer le pool précurseur de leucine de la synthèse de l'Apo A-I. En effet, l'Apo B100 est une protéine de synthèse hépatique et au sein des VLDL a un renouvellement rapide. Ce précurseur est, à ce jour, largement utilisé pour l'estimation du taux de renouvellement des HDL.

Pour les mêmes raisons, l'Apo B48 des TRL semble être une bonne alternative pour estimer le pool précurseur intestinal de la synthèse de l'Apo A-I.

Néanmoins utiliser le plateau d'enrichissement de la proApo A-I à la place du plateau de l'Apo B100 des VLDL pour calculer les paramètres cinétiques de l'Apo A-I semblerait plus exact car la proApo A-I est bien le précurseur direct de l'Apo A-I mature. Les valeurs d'enrichissement de la proApo A-I atteignent un plateau durant une perfusion continue de traceur de 12h. Malheureusement, cette valeur au plateau isotopique peut être assimilée à l'enrichissement du pool précurseur d'acides aminés intestinal et hépatique duquel la proApo A-I est dérivée et une distinction de ces deux organes n'est pas possible. Il faudrait avoir recours au plateau de l'Apo B100 et de l'Apo B48 pour estimer par calcul la contribution du foie et de l'intestin, respectivement, sur la synthèse de la proApo A-I.

Utiliser les valeurs d'enrichissement au plateau de l'Apo B100 et l'Apo B48 semblent donc être une solution très acceptable pour estimer les pools précurseurs de la synthèse de l'Apo A-I.

➤ **Voies métaboliques à explorer**

En plus du problème du pool précurseur, des processus physiologiques encore très flous sur le métabolisme des HDL existent.

La question principale qui se pose est de savoir si la synthèse de l'Apo A-I par l'intestin est induite uniquement en période post prandiale ou si elle existe aussi à jeun. Du point de vue des apolipoprotéines intestinales, l'Apo B48 est une protéine synthétisée uniquement à l'état post prandial alors que l'Apo A-IV est retrouvée à jeun. L'Apo A-I pourrait donc suivre le processus de l'une ou l'autre de ces apolipoprotéines.

De plus, les voies de dégradation de l'Apo A-I et de la lipoparticule HDL sont elles aussi encore très floues. Bien que le système mégaline/cubuline soit décrit au niveau du rein, il n'existe pas d'autres récepteurs clairement identifiés au niveau du foie ou d'éventuels autres organes. Des premiers travaux publiés sur l'ATP synthase ont ouvert une porte mais à ce jour aucune autre publication n'a repris le sujet.

Enfin, les HDL sont des lipoparticules très hétérogènes et de nombreux intermédiaires ne sont pas encore étudiés lors d'investigations cinétiques. On peut penser par exemple aux particules d'Apo A-I pauvres en lipides, aux pré β_2 HDL, aux pré β_3 HDL, aux HDL-TG ou encore aux HDL remnants. Il est possible que certaines de ces lipoparticules existent seulement à l'état transitoire *in vivo* et soient remodelées ou épurées à des taux trop importants limitant ainsi leur mesure dans le plasma ou une détection de différence d'enrichissement (en cas de conversion trop rapide avec les autres HDL).

Mais les paramètres essentiels pour une bonne étude du métabolisme de l'Apo A-I des HDL sont les taux de catabolisme et les débits de synthèse de la protéine. Grâce au modèle décrit dans ce travail, ces deux paramètres peuvent être mesurés ainsi que les différents taux de recyclage de l'Apo A-I entre les différentes lipoprotéines. Au vu de ces données, l'analyse du métabolisme des HDL par marquage endogène de l'Apo A-I semble avoir atteint une certaine limite.

Perspectives

Bien que l'analyse des transporteurs protéiques soit indispensable, elle n'est plus suffisante car le métabolisme des lipides transportés n'est pas directement étudié. Afin de réellement faire progresser les modèles d'étude, un double marquage des apolipoprotéines et du cholestérol doit être envisagé.

Une première approche a été réalisée dans notre laboratoire par une infusion simultanée de leucine trideutérée pour le marquage des apolipoprotéines et d'acétate marqué au ^{13}C pour le marquage du cholestérol (Ouguerram K. *et al.*, 2002). Le métabolisme de renouvellement du cholestérol estérifié entre les lipoparticules à Apo B100 (VLDL et LDL) et à Apo A-I (HDL) a ainsi été étudié. L'intérêt du marquage endogène du cholestérol est de pouvoir mesurer *in vivo* les différents paramètres cinétiques comme le taux d'estérification du cholestérol libre, les taux de transfert ou d'échange du cholestérol estérifié entre les lipoprotéines, les taux de captation du cholestérol estérifié. Dans le cas des HDL, nous pouvons donc estimer : (1) le taux d'estérification du cholestérol libre plasmatique incorporé dans les HDL associée à l'action de la LCAT ; (2) le taux d'échange du cholestérol estérifié entre les HDL et les lipoprotéines à Apo B qui dépend de l'action de la CETP ; (3) la clearance directe du cholestérol dépendante du catabolisme de l'Apo A-I et la captation sélective du cholestérol indépendante de la clearance de l'Apo A-I et assimilable à la voie du SR-BI.

Grâce au double marquage, nous pourrions donc mettre en relation les paramètres cinétiques du cholestérol et de ses transporteurs directs et des activités d'enzymes (LCAT ou CETP) ou de récepteur (SR-BI). Ensuite, les dosages d'activités enzymatiques, qui reflètent la plupart du temps des taux d'estérification, de transfert ou de clearance, pourront être directement corrélés avec les paramètres cinétiques du cholestérol. En effet, à ce jour, il n'est pas facile de corréler des dosages d'activité des différentes enzymes avec les paramètres cinétiques de l'Apo A-I. Les flux de lipides sont mesurés pour l'un et des taux de transfert protéique pour l'autre. Un manque de corrélation ne veut donc pas forcément dire que les paramètres cinétiques sont inexacts.

Pour l'étude du métabolisme intestinal de l'Apo A-I, bien que notre modèle améliore les connaissances, de nombreuses hypothèses restent à valider. Un marquage spécifique pour l'intestin serait d'un grand intérêt. Cette technique devrait aider à affiner les paramètres d'échanges entre les TRL et les HDL et à confirmer que l'Apo A-I intestinale est bien incorporée dans les TRL avant d'être transférée aux HDL. Toutefois, grâce à cette approche, une synthèse directe de pré β_1 HDL pourrait être mise en évidence et une estimation de son importance par rapport à la voie des TRL devrait donc être possible. Les premières réponses pourraient apparaître si les problèmes techniques survenus lors de l'étude du double marquage endogène de l'Apo A-I intestinale et hépatique sont résolus. La mise au point continue.

Par ailleurs, il semble qu'une autre approche pour caractériser les propriétés de l'Apo A-I directement issue de l'intestin serait de pouvoir collecter la lymphe au niveau du canal

thoracique sans être pour autant en situation pathologique comme c'est le cas lors d'un chylothorax. Une collaboration avec le service d'urologie devrait nous permettre de pouvoir obtenir des prélèvements lymphatiques collectés, lors de prélèvement d'organe, au niveau de la citerne de Pecquet (ou citerne du chyle) et du tronc intestinal. Comme des données contradictoires sur la composition des HDL du canal thoracique sont rapportées ; rappelons que chez le rat, des pré β et des α HDL sont retrouvées ; chez l'homme, les α HDL sont uniquement décrites ; enfin dans notre étude, la patiente avec un chylothorax présente principalement des pré β HDL, les α HDL étant absentes. Nous étudierons donc dans ces échantillons la répartition de l'Apo A-I, la composition des lipoprotéines et leur importance bien qu'une analyse par isotope stable soit impossible. Cette approche aura pour but d'asseoir et de valider notre modèle en confirmant que l'entrée principale de l'Apo A-I intestinale se fait au niveau des TRL, mais que l'idée que l'Apo A-I libérée par l'intestin s'enrichisse en lipides et forme des pré β HDL n'est pas totalement exclue.

Le modèle d'étude ainsi mis en place lors de ce travail permet une réelle avancée dans les connaissances du métabolisme de l'Apo A-I des HDL et peut déjà être utilisé pour des études comparant les effets d'une diète ou encore les conséquences d'un traitement aux fibrates ou autres PPAR α agonistes sur son métabolisme hépatique et intestinal.

A

Agellon L.B., Quinet E.M., Gillette T.G., Drayna D.T., Brown M.L., and Tall A.R. Organization of the human cholesteryl ester transfer protein gene. (1990) *Biochem.* 29, 1372-1376.

Ameli S., Hultgardh-Nilsson A., Cercek B., Shah P.K., Forrester J.S., Ageland H., and Nilsson J. Recombinant apolipoprotein A-I milano reduces intimal thickening after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. (1994) *Circulation* 90, 1935-1941.

Anderson D.W., Schaefer E.J., Bronzert T.J., Lindgren F.T., Forte T., Starzl T.E., Niblack G.D., Zech L.A., and Brewer H.B. Transport of apolipoproteins A-I and A-II by human thoracic duct lymph (1981) *J.Clin.Invest.* 67, 857-866.

Asztalos B.F., Brousseau M.E., McNamara J.R., Horvath K.V., Roheim P.S., and Schaefer E.J. Subpopulations of high density lipoproteins in homozygous and heterozygous Tangier disease. (2001) *Atherosclerosis* 156, 217-255.

Asztalos B.F., Horvath K.V., Kajinami K., Nartsuphar C., Cox C.E., Batista M., Schaefer E.J., Inazu A., and Mabuchi H. Apolipoprotein composition of HDL in cholesteryl ester transfer protein deficiency. (2004) *J.Lipid.Res.* 45, 448-455.

Asztalos B.F., Sloop C.H., Woog L., and Roheim P.S. Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apo A-I containing subpopulations. (1993) *Biochim.Biophys.Acta.* 1169, 291-300.

B

Barrans A., Collet X., Barbaras R., Jaspard B., Manent J., Vieu C., Chap R., and Perret B. Hepatic lipase induces the formation of pre-beta1 high density lipoprotein from triacylglycerol-rich HDL2. (1994) *J.Biol.Chem.* 269, 11572-11577.

Barrans A., Jaspard B., Barbaras R., Chap R., Perret B., and Collet X. Pre-beta HDL : structure and metabolism. (1996) *Biochim.Biophys.Acta.* 1300, 73-85.

Barth J.L. and Argraves W.S. Cubilin and megalin : partners in lipoprotein and vitamin metabolism. (2001) *Trends.Cardiovasc.Med.* 11, 26-31.

Batal R., Tremblay M., Krimbou L., Mamer O., Davignon J., Genest J., and Cohn J.S. Familial HDL deficiency characterized by hypercatabolism of mature Apo A-I but not proApo A-I. (1998) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 18, 655-664.

Benlian P. Mutations génomiques dans les formes familiales d'athérosclérose. (2003) *L'athérosclérose*, 223-239.

Bilz S., Wagner S., Schmitz M., Bedynek A., Keller U., and Demant T. Effects of atorvastatin versus fenofibrate on apo B-100 and Apo A-I kinetics in mixed hyperlipemia. (2004) *J.Lipid.Res.* 45, 174-185.

Blanche P.J., Gong E.L., Forte T.M., and Nichols A.V. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. (1981) *Biochim.Biophys.Acta.* 665, 408-419.

Blum CB, Levy RI, Eisenberg S, Hall M, Goebel RH, and Berman M. High density lipoprotein metabolism in man. (1977) *J Clin Invest* 60, 795-807.

Braschi S., Neville T.A-M., Vohl M-C., and Sparks D.L. Apolipoprotein A-I charge and conformation regulate the clearance of reconstituted high density lipoprotein in vivo. (1999) *J.Lip.Res.* 40, 522-532.

Breslow J.L. Genetics of lipoprotein disorders. (1993) *Circulation* 87, III-16-III-21.

Brewer H.B. Current concepts of the molecular structure and metabolism of human apolipoproteins and lipoproteins. (1981) *Klin Wochenschr* 59, 1023-1035.

Brinton EA, Eisenberg S, and Breslow JL. A low fat diet decreases high density lipoprotein (HDL) cholesterol levels by decreasing HDL apolipoprotein transport rates. (1990) *J Clin Invest* 85, 144-151.

Brinton EA, Eisenberg S, and Breslow JL. Human HDL cholesterol levels are determined by apo AI fractional catabolic rate, which correlates inversely with estimates of HDL particle size. (1994) *Arterioscler Thromb* 14, 707-720.

Brousseau M.E., Schaefer E.J., Wolfe M.L., Bloedon L.T., Digenio A.G., Clark R.W., Mancuso J.P., and Rader D.J. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL metabolism. (2004) *N.Engl.J.Med.* 350, 1505-1515.

C

Cabana V.G., Reardon C.A., Feng N., Neath S., Lukens J., and Getz G.S. Serum paraoxonase : effect of the apolipoprotein composition of HDL and the acute phase response. (2003) *J.Lip.Res.* 44, 780-792.

- Calabresi L., Lucchini A., Vecchio G., Sirtori C.R., and Franceschini G. Human apolipoprotein A-II inhibits the formation of pre- β high density lipoproteins. (1996) *Biochim.Biophys.Acta.* 1304, 32-42.
- Calandra S. and Tarugi P. Synthesis and secretion of apolipoprotein A-I. (1993) *Biochem.Soc.Trans.* 21, 493-499.
- Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, and Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. (1981) *Journal of Lipid research* 22, 339-358.
- Cheung M.C. and Wolf A.C. Differential effect of ultracentrifugation on apolipoprotein A-I-containing lipoprotein subpopulations. (1988) *J.Lipid.Res.* 29, 15-25.
- Chiesa G. and Sirtori C.R. Apolipoprotein A-I_{Milano} : current perspectives. (2003) *Curr.Opin.Lipidol.* 14, 159-163.
- Chiou SH. and Wang KT. Peptide and protein hydrolysis by microwave irradiation. (1989) *J Chromatogr.* 491, 424-431.
- Clay M.A., Newnham H.H., and Barter P.J. Hepatic lipase promotes a loss of apolipoprotein A-I from triglyceride-enriched human high density lipoproteins during incubation in vitro. (1991) *Arterioscler.Thromb.* 11, 415-422.
- Cohn J.S., Wagner D.A., Cohn S.D., Millar J.S., and Schaefer E.J. Measurement of very low density and low density lipoprotein apolipoprotein (Apo) B-100 and high density lipoprotein Apo A-I production in human subjects using deuterated leucine - Effect of fasting and feeding. (1990) *J.Clin.Invest.* 85, 804-811.
- Collet X., Tall A.R., Serajuddin H., Guendouzy K., Royer L., Oliveira H., Barbaras R., Jiang X-C., and Francone O.L. Remodeling of HDL by CETP in vivo and CETP and hepatic lipase in vitro in enhanced uptake of HDL-CE by cells expressing scavenger receptor B-I. (1999) *J.Lipid.Res.* 40, 1185-1193.
- Colvin P.L., Moriguchi E., Barrett P.H.R., Parks J.S., and Lawrence L.R. Small HDL particules containing two Apo A-I molecules are precursors in vivo to medium and large HDL particules containing three and four Apo A-I molecules in nonhuman primates. (1999) *J.Lipid.Res* 40, 1782-1792.

D

Dallinger-Thie G.M., Bu X-D., Linde-Sibenus Trip M., Rotter J.I., Lusis A.J., and De Bruin T.W.A. Apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster in familial combined hyperlipidemia : effects on LDL-cholesterol and apolipoproteins B and C-III. (1996) *J.Lipid.Res* 37, 136-147.

De Beer M.C., Durbin D.M., Cai L., Jonas A., De Beer F.C., and Van Der Westhuyzen D.R. Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI. (2001) *J.Lipid.Res.* 42, 309-313.

Durack-Brown I., Fumeron F., Betoulle D., Chevreuil O., and Apfelbaum M. Xmn1 restriction polymorphism of apolipoprotein AI gene and lipoprotein levels in obesity. (1994) *Int.J.Obes.* 18, 460-464.

Duvillard L., Pont F., Florentin E., Gambert P., and Verges B. Inefficiency of insulin therapy to correct apolipoprotein A-I metabolic abnormalities in non-insulin-dependent diabetes mellitus. (2000) *Atherosclerosis* 152, 229-237.

E

Elkhalil L., Majd Z., Bakir R., Perez-Mendez O., Castro G., Poulain P., Lacroix B., Duhal N., Fruchart J-C., and Luc G. Fish-eye disease : structural and in vivo metabolic abnormalities of high-density lipoproteins. (1997) *Metabolism* 46, 474-483.

Engelhardt H., Krämer M., and Waldhoff H. Enhancement of protein detection by microwave-induced hydrolysis and OPA derivatization. (1990) *Chromatographia* 30, 523-526.

Engelhart W.G. Microwave hydrolysis of peptides and proteins for amino acid analysis. (1990) *American Biotechnol.Lab.* 8, 30-34.

F

Fidge N, Nestel P, Ishikawa T, Reardon M, and Billington T. Turnover of apoprotein AI and AII of High Density Lipoprotein and the relationship to other lipoproteins in normal and hyperlipidemic individuals. (1980) *Metabolism* 29, 643-653.

Fielding C.J. and Fielding P.E. Cellular cholesterol efflux. (2001) *Biochim.Biophys.Acta.* 1533, 175-189.

Fisher W.R., Venkatakrisnan V., Fisher E.S., Stacpoole P.W., and Zech L.A. The ³H-leucine tracer : its use in kinetic studies of plasma lipoproteins. (1997) *Metabolism* 46, 333-342.

Fisher WR, Venkatakrishnan V, Zech LA, Hall CM, Kilgore LL, Stacpoole PW, Diffenderfer MR, Friday KE, Sumner AE, and Marsh JB. Kinetic evidence for both a fast and a slow secretory pathway for apolipoprotein A-I in humans. (1995) *J Lipid Res* 36, 1618-1628.

Frenais R., Ouguerram K., Maugeais C., Mahot P., Maugere P., Krempf M., and Magot T. High density lipoprotein apolipoprotein AI kinetics in NIDDM: a stable isotope study. (1997) *Diabetologia* 40, 578-583.

Frenais R., Ouguerram K., Maugeais C., Marchini J.S., Benlian P., Bard J.M., Magot T., and Krempf M. Apolipoprotein A-I kinetics in heterozygous familial hypercholesterolemia: a stable isotope study. (1999) *J.Lipid Res.* 40, 1506-1511.

Frenais R, Maugeais C, Ouguerram K, Zair Y, Bard JM, Charbonnel B, Magot T, and Krempf M. Effect of low-density lipoproteins on apolipoprotein AI kinetics in heterozygous familial hypercholesterolemia. (2001) *Metabolism* 50, 635-639.

Frenais R, Ouguerram K, Maugeais C, Mahot P, Charbonnel B, Magot T, and Krempf M. Effect of dietary omega-3 fatty acids on high-density lipoprotein apolipoprotein AI kinetics in type II diabetes mellitus. (2001) *Atherosclerosis* 157, 131-135.

Fruchart J-C. and Duriez P. Données fondamentales sur l'athérosclérose. (2001) *Ann.Endocrinol.* 62, 93-100.

G

Ghiselli G., Rohde M.F., Tanenbaum S., Krishan S., and Gotto JAM. Origin of apolipoprotein A-I polymorphism in plasma. (1985) *J.Biol.Chem.* 260, 15662-15668.

Gillotte K.L., Davidson W.S., Lund-Katz S., Rothblat G.H., and Phillips M.C. Removal of cellular cholesterol by pre β -HDL involves plasma membrane microsolubilization. (1998) *J.Lipid.Res.* 39, 1918-1928.

Ginsberg H.N., Le N-A., Goldberg I.J., Gibson J.C., Rubinstein A., Wang-Iverson P., Norum R., and Brown W.V. Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoprotein CIII and AI. (1986) *J.Clin.Invest.* 78, 1287-1295.

Ginsberg HN, Le N-A, Goldberg IJ, Gibson JC, Rubinstein A, Wang-Iverson P, Norum R, and Brown WV. Apolipoprotein B Metabolism in Subjects with Deficiency of Apolipoproteins CIII and AI. (1986) *Journal of Clinical Investigation* 78, 1287-1295.

Golay A., Zech L., Shi M.Z., Chiou Y.A.M., Reaven G.M., and Chen Y.D.I. High density lipoprotein (HDL) metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus: measurement of HDL turnover using tritiated HDL. (1987) *J Clin Endocrinol Metab* 65, 512-518.

Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, and Dawber TR. High Density Lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham study. (1977) *Am J Med* 62, 707-714.

Gotto AMJ, Pownall HJ, and Havel RJ. Introduction to the plasma lipoproteins. (1986) *Methods Enzymol* 128, 3-41.

Green P.H.R., Tall A.R., and Glickman R.M. Rat intestine secretes discoid high density lipoprotein (1978) *J.Clin.Invest.* 61, 528-534.

Green P.H.R., Glickman R.M., Saudek C.D., Blum C.B., and Tall A.R. Human intestinal lipoproteins. Studies in chyluric subjects. (1979) *J.Clin.Invest.* 64, 233-242.

Groenendijk M., Cantor R.M., Bruin de T.W.A., and Dallinge-Thie G.M. The Apo AI - CIII - AIV gene cluster. (2001) *Atherosclerosis* 157, 1-11.

H

Hammad S.M., Barth J.L., Knaak C., and Argraves W.S. Megalin acts in concert with cubilin to mediate endocytosis of high density lipoproteins. (2000) *J.Biol.Chem.* 275, 12003-12008.

Hammad S.M., Stefansson S., Twal W.O., Drake C.J., Fleming P., Remaley A., Brewer H.B., and Argraves W.S. Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B₁₂ complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. (1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.* 96, 10158-10163.

Havel R.J., Eder H.A., and Bragdon J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugation separated lipoproteins in human serum. (1955) *J.Clin.Invest.* 34, 1345-1353.

Hesca-Gomez C., Franco M., Luc G., Montano L.F., Masso F., Posadas-Romero C., and Perez-Mendez O. Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. (2002) *Metabolism* 51, 443-450.

Hobbs H.H. and Rader D.J. ABC1 : connecting yellow fever, neuropathy, and very low HDL. (1999) *J.Clin.Invest.* 104, 1015-1017.

Horowitz B.S., Goldberg I.J., Merab J., Vanni T.M., Ramakrishnan R., and Ginsberg H.N. Increase plasma and renal clearance of an exchangeable pool of apolipoprotein A-I in subjects with low levels of high density lipoprotein cholesterol. (1993) *J.Clin.Invest.* 91, 1752.

Hughes T.A., Moore M.A., Neame P., Medley M.F., and Chung B.H. Rapid quantitative apolipoprotein analysis by gradient ultracentrifugation and reversed-phase high performance liquid chromatography. (1988) *J.Lip.Res.* 29, 363-376.

Huuskonen J., Olkkonen V.M., Ehnholm C., Metso J., Julkunen I., and Jauhiainen M. Phospholipid transfer is a prerequisite for PLTP-mediated HDL conversion. (2000) *Biochem.* 39, 16092-16098.

I

Ikewaki K., Rader D.J., Schaefer E.J., Fairwell T., Zech L.A., and Brewer H.B. Evaluation of apo A-I kinetics in humans using simultaneous endogenous stable isotope and exogenous radiotracer methods. (1993) *J.Lipid.Res.* 34, 2207-2215.

Ikewaki K., Rader DJ, Sakamoto T, Nishiwaki M, Schaefer JR, Ishikawa T, Fairwell T, Zech LA, Nakamura H, Nagano M, and Brewer HBJ. Delayed catabolism of High Density Lipoprotein AI and AII in human cholesteryl ester transfer protein deficiency. (1993) *J.Clin.Invest.* 92, 1650-1658.

Inazu A., Koizumi J., and Mabuchi H. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis. (2000) *Curr.Opin.Lipidol.* 11, 389-396.

Ishida B.Y., Frolich J., Fielding C.J. Prebeta-migrating high density lipoprotein : quantitation in normal and hyperlipidemic plasma by solid phase radioimmunoassay following electrophoretic transfer

J

Jafari M., Leaf D.A., MacRae H., Kasem J., O'Conner P., Pullinger C., Malloy M., and Kane J.P. The effects of physical exercise on plasma prebeta-1 high-density lipoprotein. (2003) *Metabolism* 52, 437-442.

Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. (2000) *Biochim.Biophys.Acta.* 1529, 245-256.

K

Kamboh M.I., Aston C.E., Nestlerode C.M., McAllister A.E., and Hamman R.F. Haplotype analysis of two Apo A-I/MstI polymorphisms in relation to plasma levels of Apo A-I and HDL-cholesterol. (1996) *Atherosclerosis* 127, 255-262.

Karasawa K., Harada A., Satoh N., Inoue K., and Setaka M. Plasma platelet activating factor - acetylhydrolase (PAF-AH). (2003) *Progress in Lipid Research* 42, 93-114.

Kozyraki R, Fyfe J, Kristiansen M, Gerdes C, Jacobsen C, Cui S, Christensen EI, Aminoff M, de la CA, Krahe R, Verroust PJ, and Moestrup SK. The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. (1999) *Nat.Med* 5, 656-661.

Krempf M., Hoerr R.A., Pelletier V.A., Marks L.M., Gleason R., and Young V.R. An isotopic study of the effect of dietary carbohydrate on the metabolic fate of dietary leucine and phenylalanine. (1993) *Am.J.Clin.Nutr.* 57, 161-169.

Kuivenhoven J.A., Pritchard H., Hill J., Frohlich J., Assmann G., and Kastelein J. The molecular pathology of lecithin : cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. (1997) *J.Lipid.Res.* 38, 191-205.

Kuhn K.S., Schuhmann K., Stehle P., Darmaun D., and Furst P. Determination of glutamine in muscle protein facilitates accurate assessment of proteolysis and de novo synthesis-derived endogenous glutamine production. (1999) *Am.J.Clin.Nutr.* 70, 484-489.

Kuhn K.S., Stehle P., and Furst P. Quantitative analyses of glutamine in peptides and proteins. (1996) *J.Agric.Food.Chem.* 44, 1808-1811.

Kunitake S.T. and Kane J.P. Factors affecting the integrity of high density lipoproteins in the ultracentrifuge. (1982) *J.Lipid.Res.* 23, 936-940.

L

Lagrost L., Desrumaux C., Masson D., Deckert V., and Gambert P. Structure and function of plasma phospholipid transfer protein. (1998) *Curr.Opin.Lipidol.* 9, 203-209.

Lamarche B., Uffelman K.D., Carpentier A., Cohn J.S., Steiner G., Barrett P.H.R., and Lewis G.F. Triglyceride enrichment of HDL enhances in vivo metabolic clearance of HDL apo A-I in healthy men. (1999) *J.Clin.Invest.* 103, 1191-1199.

Lamarche B., Uffelman K.D., Steiner G., Barrett P.H.R., and Lewis G.F. Analysis of particle size and lipid composition as determinants of metabolic clearance of human high density lipoproteins in a rabbit model. (1998) *J.Lip.Res.* 39, 1162-1172.

Lamarche B, Rashid S, and Lewis GF. HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. (1999) *Clin Chim Acta* 286, 145-161.

Lambert G., Amar M.J.A., Martin P., Fruchart-Najib J., Föger B., Shamburek R.D., Brewer Jr H.B., and Santamarina-Fojo S. Hepatic lipase deficiency decreases the selective uptake of HDL-cholesteryl esters in vivo. (2000) *J.Lip.Res.* 41, 667-672.

Lamon-Fava S. and Micherone D. Regulation of Apo A-I gene expression : mechanism of action of estrogen and genistein. (2004) *J.Lip.Res.* 45, 106-112.

Lawn R.M., Wade D.P., Garvin M.R., Wang X., Schwartz K., Porter J.G, Seilhamer J.J, Vaughan A.M, and Oram J.F. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. (1999) *J.Clin.Invest.* 104, R25-R31.

Lewis G.F., Lamarche B., Uffelman K.D., Heatherington A.C., Honig M.A., Szeto L.W., and Barrett P.H.R. Clearance of postprandial and lipolytically modified human HDL in rabbits and rats. (1997) *J.Lip.Res.* 38, 1771-1781.

Liang HQ., Rye K-A., and Barter P.J. Cycling of apolipoprotein A-I between lipid-associated and lipid-free pools. (1995) *Biochim.Biophys.Acta.* 1995, 31-37.

Liang HQ., Rye K-A., and Barter P.J. Remodelling of reconstituted high density lipoproteins by lecithin:cholesterol acyltransferase. (1996) *J.Lipid.Res.* 37, 1962-1970.

Lichtenstein A.H., Cohn J.S., Hachey D.L., Millar J.S., Ordovas J.M., and Schaefer E.J. Comparison of deuterated leucine, valine, and lysine in the measurement of human apolipoprotein AI and B100 kinetics. (1990) *J.Lipid.Res.* 31, 1693-1701.

Lichtenstein A.H., Hachey DL, Millar JS, Jenner JL, Booth L, Ordovas J, and Schaefer EJ. Measurement of human apolipoprotein B48 and B100 kinetics in triglyceride-rich lipoproteins using [5,5,5-²H₃] leucine. (1992) *J Lipid Res* 33, 907-914.

Lie J., De Crom R., Jauhiainen M., Van Gent T., Van Haperen R., Scheek L., Jansen H., Ehnholm C., and Van Tol A. Evaluation of phospholipid transfer protein and cholesteryl ester transfer protein as contributors to the generation of pre β -high-density lipoproteins. (2001) *Biochem.J.* 360, 379-385.

M

Martinez L., Jacquet S., Esteve J-P., Rolland C., Cabezón E., Champagne E., Pineau T., Georgeaud V., Walker E., Tercé F., Collet X., Perret B., and Barbaras R. Ectopic β -chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. (2003) *Nature* 421, 75-79.

- Martinez L., Jacquet S., Tercé F., Perret B., Collet X., and Barbaras R. ATP synthase/apolipoprotéine A-I : un nouveau couple contre l'athérosclérose ? (2003) *Médecine Sciences* 19, 795-796.
- Matsushima T., Cryer D.R., Winkler K.E., Marsh J.B., and Cortner J.A. Measurement of apolipoprotein B synthesis in perfused rat liver using stable isotopes : [¹⁵N]hippurate as a measure of the intracellular [¹⁵N]glycine precursor enrichment. (1989) *J.Lipid.Res.* 1989, 841-846.
- Matthews CME. The theory of tracer experiments with ¹³¹I-labeled plasma proteins. (1957) *Phys Med Biol* 2, 36-54.
- Maugeais C., Ouguerram K., Krempf M., and Magot T. Kinetic study of apo B100 containing lipoprotein metabolism using amino acids labeled with stable isotopes: methodological aspects. (1998) *Clin.Chem.Lab Med.* 36, 739-745.
- McFarlane A.S. Efficient trace-labelling of proteins with iodine (1958) *Nature (London)* 182, 53.
- Mead J.R. and Ramji D.P. The pivotal role of lipoprotein lipase in atherosclerosis. (2002) *Cardiovasc.Res.* 55, 261-269.
- Merkel M., Eckel R.H., and Goldberg I.J. Lipoprotein lipase : genetics, lipid uptake, and regulation. (2002) *J.Lip.Res.* 43, 1997-2006.
- Miida T., Nakamura Y., Inano K., Matsuto T., Yamaguchi T., Tsuda T., and Okada M. Pre-β₁-high-density lipoprotein increases in coronary artery disease. (1996) *Clin.Chem.* 42, 1992-1995.
- Miida T., Ozaki K., Murakami T., Kashiwa T., Yamadera T., Tsuda T., Inano K., and Okada M. preβ₁ high density lipoprotein (preβ₁-HDL) concentration can change with low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) concentration independent of cholesteryl ester transfer protein (CETP). (2000) *Clin.Chim.Acta.* 292, 69-80.
- Miida T., Sakai N., Ozaki K., Nakamura Y., Yamaguchi T., Tsuda T., Kashiwa T., Murakami T., Inano K., and Okada M. Bezafibrate increases preβ₁-HDL at the expense of HDL_{2b} in hypertriglyceridemia. (2000) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 20, 2428-2433.
- Mineo C. and Shaul P.W. HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase - A novel mechanism of HDL action. (2003) *Trends.Cardiovasc.Med.* 13, 226-231.
- Morton R.E. Cholesteryl ester transfer protein and its plasma regulator : lipid transfer inhibitor protein. (1999) *Curr.Opin.Lipidol.* 10, 321-327.

N

Nanjee M.N., Cooke C.J., Olszewski W.L., and Miller N.E. Concentrations of electrophoretic and size subclasses of apolipoprotein A-I-containing particles in human peripheral lymph (2000) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 20:2148-2155.

Nanjee M.N., Cooke C.J., Garvin R., Semeria F., Lewis G., Olszewski W.L., and Miller N.E. Intravenous Apo A-I/lecithin discs increase pre β -HDL concentration in tissue fluid and stimulate reverse cholesterol transport in humans. (2001) *J.Lipid.Res.* 42, 1586-1593.

Nestruck AC, Suzue G, and Marcel YL. Studies on the polymorphism of human apolipoprotein AI. (1980) *Biochim Biophys Acta* 617, 110-121.

Nissen S.E., Tsunoda T., Tuzcu E.M., Schoenhagen P., Cooper C.J., Yasin M., Eaton G.M., Lauer M.A., Sheldon W.S., Grines C.L., Halpern S., Crowe T., Blankenship J.C., and Kerensky R. Effect of recombinant Apo A-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes. (2003) *JAMA* 290, 2292-2300.

O

O'Connor P.M., Zysow B.R., Schoenhaus S.A., Ishida S.T., Kunitake S.T., Naya-Vigne J.M., Duchateau P.N., Redberg R.F., Spencer S.J., Mark S., Mazur M., Heilbron D.C., Jaffe R.B., Malloy M.J., and Kane J.P. Prebeta-1 HDL in plasma of normolipidemic individuals : influences of plasma lipoproteins, age, and gender. (1998) *J.Lipid.Res.* 39, 670-678.

O'Kane M.J., Wisdom G.B., McEneny J., McFerran N.V., and Trimble E.R. Pre-beta high-density lipoprotein determined by immunoblotting with chemiluminescent detection. (1992) *Clin.Chem.* 28, 2273-2277.

Oppert JM., Fumeron F., Moreel JF.R., and Apfelbaum M. Association of a DNA polymorphism of the apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster with hypertriglyceridemia in obese people. (1992) *Int.J.Obes.* 16, 891-896.

Oram J.F. Molecular basis of cholesterol homeostasis : lessons from Tangier disease and ABCA1. (2002) *TRENDS* 8, 168-173.

Oram J.F and Vaughan A.M. ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. (2000) *Curr.Opin.Lipidol.* 11, 253-260.

Ouguerram K., Krempf M., Maugeais C., Maugère P., Darmaun D. and Magot T. A new labeling approach using stable isotopes to study in vivo plasma cholesterol metabolism in humans (2002) *Metabolism* 51, 5-11.

P

Peelman F., Vandekerckhove J., and Rosseneu M. Structure and function of lecithin cholesterol acyl transferase : new insights from structural predictions and animal models. (2000) *Curr.Opin.Lipidol.* 11, 155-160.

Perret B., Mabile L., Martinez L., Tercé F., Barbaras R., and Collet X. Hepatic lipase : structure / function relationship, synthesis, and regulation. (2002) *J.Lip.Res.* 43, 1163-1169.

Pietzsch J., Julius U., Nitzsche S., and Hanefeld M. In vivo evidence for increased apolipoprotein A-I catabolism in subjects with impaired glucose tolerance. (1998) *Diabetes* 47, 1928-1934.

Pont F., Duvillard L., Florentin E., Gambert P., and Verges B. High-density lipoprotein apolipoprotein A-I kinetics in obese insulin resistant patients. An *in vivo* stable isotope study. (2002) *Int.J.Obes.* 26, 1151-1158.

Preiss-Landl K., Zimmermann R., Hämmerle G., and Zechner R. Lipoprotein lipase : the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. (2002) *Curr.Opin.Lipidol.* 13, 471-481.

R

Rader D.J., Ikewaki K., Duverger N., Schmidt H., Pritchard H., Frohlich J., Clerc M., Dumon M-H., Fairwell T., Zech L., Santamarina-Fojo S., and Brewer H.B. Markedly accelerated catabolism of apolipoprotein A-II (Apo A-II) and high density lipoproteins containing Apo A-II in classic lecithin : cholesterol acyltransferase deficiency and Fish-Eye disease. (1994) *J.Clin.Invest.* 93, 321-330.

Rader D.J., Schaefer J.R., Lohse P., Ikewaki K., Thomas F., Harris W.A., Zech L.A., Dujovne C.A., and Brewer H.B. Increased production of apolipoprotein A-I associated with elevated plasma levels of high-density lipoproteins, apolipoprotein A-I, and lipoprotein A-I in a patient with familial hyperalphalipoproteinemia. (1993) *Metabolism* 42, 1429-1434.

Rader DJ, Castro G, Zech LA, Fruchart JC, and Brewer HBJ. In vivo metabolism of apolipoprotein AI on High Density Lipoprotein particles Lp AI and Lp AI:AI. (1991) *J Lipid Res* 32, 1849-1859.

- Rashid S., Barrett P.H.R., Uffelman K.D., Watanabe T., Adeli K., and Lewis G.F. Lipolytically modified triglyceride-enriched HDLs are rapidly cleared from the circulation. (2002) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 483-487.
- Reaven G.M. Role of insulin resistance in human disease. (1988) *Diabetes* 37, 1595-1607.
- Recalde D., Vélez-Carrasco W., Civeira F., Cenarro A., Gomez-Coronado D., Ordovas J.M., and Pocovi M. Enhanced fractional catabolic rate of Apo A-I and Apo A-II in heterozygous subjects for Apo A-I_{Zaragoza} (L144R). (2001) *Atherosclerosis* 154, 613-623.
- Reeds P.J., Burrin D.G., Stoll B., Jahoor F., Wykes L., Henry J., and Frazer E.M. Enteral glutamate is the preferential source for mucosal glutathione synthesis in fed piglets. (1997) *Am.J.Physiol.* 273, E408-E415.
- Riemens S, van Tol A, Sluiter W, and Dullaart R. Elevated plasma cholesteryl ester transfer in NIDDM: relationships with apolipoprotein B-containing lipoproteins and phospholipid transfer protein. (1998) *Atherosclerosis* 140, 71-79.
- Rigotti A., Trigatti B., Babitt J., Penman M., Xu S., and Krieger M. Scavenger receptor BI - a cell surface receptor for high density lipoprotein. (1997) *Curr.Opin.Lipidol.* 8, 181-188.
- Rigotti A., Trigatti B., Penman M., Rayburn H., Herz J., and Krieger M. A targeted mutation in the murine gene encoding the density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. (1997) *Proc.Natl.Acad.Sci.* 94, 12610-12615.
- Roma P, Gregg RE, Ronan MR, Zech LA, Franceschini G, Sirtori CR, and Brewer HBJ. In vivo metabolism of a mutant form of apolipoprotein AI, apo AI-Milano, associated with familial hypoalphalipoproteinemia. (1993) *J Clin Invest* 91, 1445-1452.
- Rudel L.L. and Kesäniemi A.A. Unraveling the mysteries of high density lipoprotein metabolism. (1999) *Curr.Opin.Lipidol.* 10, 293-294.
- Rudra D.N., Myant N.B., Pflug J.J., and Reichl D. The distribution of cholesterol and apoprotein A-I between the lipoproteins in plasma and peripheral lymph from normal human subjects (1984) *Atherosclerosis* 53, 297-308.
- Ruel I.L., Couture P., Cohn J.S., Bensadoun A., Marcil M., and Lamarche B. Evidence that hepatic lipase deficiency in humans is not associated with proatherogenic changes in HDL composition and metabolism. (2004) *J.Lip.Res.* 45, 1528-1537.
- Rye K-A. and Barter P.J. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. (2004) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24, 421-428.

Rye K-A., Clay M.A., and Barter P.J. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. (1999) *Atherosclerosis* 145, 227-238.

Rye K-A., Jauhiainen M., Barter P.J., and Ehnholm C. Triglyceride-enrichment of high density lipoproteins enhances their remodelling by phospholipid transfer protein. (1998) *J.Lipid.Res.* 39, 613-622.

S

Santamarina-Fojo S., Haudenschild C., and Amar M. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. (1998) *Curr.Opin.Lipidol.* 9, 211-219.

Santamarina-Fojo S., Lambert G., Hoeg J.M., and Brewer H.B. Lecithin-cholesterol acyltransferase : role in lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and atherosclerosis. (2000) *Curr.Opin.Lipidol.* 11, 267-275.

Santamarina-Fojo S and Dugi KA. Structure, function and role of lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism. (1994) *Curr Opin Lipidol* 5, 117-125.

Sasahara T., Yamaguchi T., Sviridov D., Fidge N., and Nestel P. Altered properties of high density lipoprotein subfractions in obese subjects. (1997) *J.Lipid.Res.* 38, 600-611.

Schaefer J.R., Rader D.J., and Brewer Jr H.B. Investigation of lipoprotein kinetics using endogenous labeling with stable isotopes. (1992) *Curr.Opin.Lipidol.* 3, 227-232.

Schaefer J.R., Schweer H., Ikewaki K., Stracke H., Seyberth H.J., Kaffarnik H., Maisch B., and Steinmetz A. Metabolic basis of high density lipoproteins and apolipoprotein A-I increase by HMG-CoA reductase inhibition in healthy subjects and a patient with coronary artery disease. (1999) *Atherosclerosis* 144, 177-184.

Schaefer EJ, Conrad MD, Blum CB, Levy RI, Jenkins LL, Alaupovic P, Foster DM, and Brewer HBJ. Metabolism of High Density Lipoprotein apolipoproteins in Tangier disease. (1978) *N Engl J Med* 299, 905-910.

Schaefer EJ, Zech LA, Jenkins LL, Bronzert TJ, Rubalcaba EA, Lindgren FT, Aamodt RL, and Brewer HBJ. Human apolipoprotein AI and AII metabolism. (1982) *J Lipid Res* 23, 850-862.

Schaefer JR, Rader DJ, Ikewaki K, Fairwell T, Zech LA, Kindt MR, Davignon J, Gregg RE, and Brewer HBJ. In vivo metabolism of apolipoprotein AI in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. (1992) *Arterioscler Thromb* 12, 843-848.

Schmitz G., Assmann G., and Melnik B. The role of lecithin : cholesterol acyltransferase in high density lipoprotein₃/high density lipoprotein₂ interconversion. (1981) *Clin.Chim.Acta.* 119, 225-236.

Schmitz G., Kaminski W.E., and Orso E. ABC transporters in cellular lipid trafficking. (2000) *Curr.Opin.Lipidol.* 11, 493-501.

Shaul P.W. and Mineo C. HDL action on the vascular wall : is the answer NO? (2004) *J.Clin.Invest.* 113, 509-513.

Shepherd J, Packard CJ, Patsch JR, Gotto AM, and Taunton OD. Effects of dietary polyunsaturated and saturated fat on the properties of High Density Lipoproteins and the metabolism of apolipoprotein AI. (1978) *J Clin Invest* 61, 1582-1592.

Shepherd J, Patsch JR, Packard CJ, Gotto AM, and Taunton OD. Dynamic properties of human high density lipoprotein apoproteins. (1978) *J.Lipid.Res.* 19, 283-389.

Silver D.L., Jiang X-C., and Tall A.R. Increased high density lipoprotein (HDL), defective hepatic catabolism of Apo A-I and Apo A-II, and decreased Apo A-I mRNA in ob/ob mice. (1999) *J.Biol.Chem.* 274, 4140-4146.

Slama G. and Sélam JL. Les diabètes. (2001) *Traité de nutrition clinique de l'adulte* , 472.

Staels B. and Auwerx J. Regulation of Apo A-I gene expression by fibrates. (1998) *Atherosclerosis* 137, S19-S23.

T

Tedgui A. and Chapman J. Pathogenèse de l'athérosclérose : théories et mécanismes. (2003) *L'athérosclérose* , 245-256.

Thompson P.D., Yurgalevitch S.M., Flynn M.M., Zmuda J.M., Spannaus-Martin D., Saritelli A., Bausserman L., and Herbert P.N. Effect of prolonged exercise training without weight loss on high-density lipoprotein metabolism in overweight men. (1997) *Metabolism* 46, 217-233.

Thuren T. Hepatic lipase and HDL metabolism. (2000) *Curr.Opin.Lipidol.* 11, 277-283.

Tilly-Kiesi M, Lichtenstein AH, Joven J, Vilella E, Cheung MC, Carrasco WV, Ordovas J, Dolnikowski G, and Schaefer EJ. Impact of gender on the metabolism of apolipoprotein AI in HDL subclasses LpAI and LpAI:AI in older subjects. (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 3513-3518.

Trigatti B., Krieger M., and Rigotti A. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. (2003) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 23, 1732-1738.

Trigatti B., Rayburn H., Vinals M., Braun A., Miettinen H., Penman M., Hertz M., Schrenzel M., Amigo L., Rigotti A., and Krieger M. Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. (1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.* 96, 9322-9327.

Tselepis A.D. and Chapman J.M. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis : potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. (2002) *Atherosclerosis* supplements 3, 57-68.

V

Vandenbrouck Y, Janvier B, Loriette C, Bereziat G, and Mangeney-Andreani M. Thyroid hormone modulates apolipoprotein-AI gene expression at the post-transcriptional level in Hep G2 cells. (1995) *Eur J Biochem* 231, 126-132.

Vélez-Carrasco W., Lichtenstein A.H., Barrett P.H.R., Sun Z., Dolnikowski G.G., Welty F.K., and Schaefer E.J. Human apolipoprotein A-I kinetics within triglyceride-rich lipoproteins and high density lipoproteins. (1999) *J.Lipid.Res.* 40, 1695-1700.

Vélez-Carrasco W., Lichtenstein A.H., Li Z., Dolnikowski G.G., Lamon-Fava S., Welty F.K., and Schaefer E.J. Apolipoprotein A-I and A-II kinetic parameters as assessed by endogenous labelling with [²H₃] leucine in middle-aged and elderly men and women. (2000) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 801-806.

Vélez-Carrasco W., Lichtenstein A.H., Welty F.K., Li Z., Lamon-Fava S., Dolnikowski G.G., and Schaefer E.J. Dietary restriction of saturated fat and cholesterol decreases HDL Apo A-I secretion. (1999) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19, 918-924.

Von Eckardstein A., Jauhiainen M., Huang Y., Metso J., Langer C., Pussinen P., Ehnholm C., and Assmann G. Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre β_1 HDL. (1996) *Biochim.Biophys.Acta.* 1301, 255-262.

von Eckardstein A, Huang Y, Kastelein JJ, Geisel J, Real JT, Kuivenhoven JA, Miccoli R, Nosedà G, and Assmann G. Lipid-free apolipoprotein (apo) A-I is converted into alpha-migrating high density lipoproteins by lipoprotein-depleted plasma of normolipidemic donors and apo A-I-deficient patients but not of Tangier disease patients. (1998) *Atherosclerosis* 138, 25-34.

W

Wang X.L., Badenhop R., Humphrey K.E., and Wilcken D.E.L. New MspI polymorphism at +83bp of the human Apolipoprotein AI gene: association with increased circulating high density lipoprotein cholesterol levels. (1996) *Genet.Epidemiol.* 13, 1-10.

Watkins L.K., Bondarenko P.V., Barbacci D.C., Song S., Cockrill S.L., Russell D.H., and Macfarlane R.D. Fast C18 solid-phase desalting/delipidation of the human serum apolipoproteins for matrix-assisted laser desorption ionization and electrospray ionization mass spectrometric analysis. (1999) *J Chromatogr.* 840, 183-193.

Watts G.F., Barrett P.H.R., Ji J., Serone A.P., Chan D.C., Croft K.D., Loehrer F., and Johnson A.G. Differential regulation of lipoprotein kinetics by atorvastatin and fenofibrate in subjects with the metabolic syndrome. (2003) *Diabetes* 52, 803-811.

Welty F.K., Lichtenstein A.H., Barrett P.H.R., Dolnikowski G.G., Ordovas J.M., and Schaefer E.J. Production of apolipoprotein B-67 in apolipoprotein B-67/B-100 heterozygotes : technical problems associated with leucine contamination in stable isotope studies. (1997) *J.Lipid.Res.* 38, 1535-1543.

Welty F.K., Lichtenstein A.H., Barrett P.H.R., Dolnikowski G.G., and Schaefer E.J. Human apolipoprotein (Apo) B-48 and B-100 kinetics with stable isotopes. (1999) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19, 2966-2974.

Williams D.L., Connelly M.A., Temel R.E., Swarnakar S., Phillips M.C., de la Llera-Moya M., and Rothblat G.H. Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. (1999) *Curr.Opin.Lipidol.* 10, 329-339.

X

Xu S., Laccotripe M., Huang X., Rigotti A., Zannis V.I., and Krieger M. Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-B1, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. (1997) *J.Lipid.Res.* 38, 1289-1298.

Xu Y. and Fu M. Alterations of HDL subclasses in hyperlipidemia (2003) *Clin.Chim.Acta.* 332, 95-102.

Y

Yancey P.G., Bortnick A.E., Kellner-Weibel G., Llera-Moya de la M., Phillips M.C., and Rothblat G.H. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. (2003) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 23, 712-719.

Z

Zech L.A., Schaefer E.J., Bronzert T.J., Aamodt R.L., and Brewer H.B. Metabolism of human apolipoproteins A-I and A-II : compartmental models. (1983) *J.Lipid.Res.* 24, 60-71.

Zhang X., Jiao J.-J., Bhavnani B.R., and Tam S.-P. Regulation of human apolipoprotein A-I gene expression by equine estrogens. (2001) *J.Lip.Res.* 42, 1789-1800.

Nouvelle approche de l'étude cinétique du métabolisme des HDL par marquage endogène de l'Apo A-I par des isotopes stables chez l'Homme

La concentration en cholestérol des HDL est inversement corrélée au risque cardio-vasculaire. Les HDL présentent des propriétés anti-athérogènes, leur fonction principale étant d'assurer le retour du cholestérol tissulaire vers le foie. Les investigations cinétiques, de part leur caractère dynamique, constituent un outil privilégié dans l'étude du métabolisme des lipoprotéines. La plupart de ces études cinétiques sont réalisées sur des HDL totales isolées par ultracentrifugation, technique durant laquelle l'hétérogénéité des HDL peut être perturbée. L'objectif de ce travail était d'utiliser la FPLC pour la séparation des HDL. Cette technique de gel filtration respecte l'intégrité des lipoparticules et permet la distinction des enrichissements de l'Apo A-I des pré β_1 et α HDL des HDL totales préalablement étudiées. Cette séparation nous a permis de développer un nouveau modèle multi-compartimental, composé de deux compartiments distincts pour les pré β_1 et α HDL, qui permettait d'estimer les taux de conversion existants entre ces deux sous classes de lipoparticules. Pour valider ce modèle, la méthodologie a ensuite été appliquée à l'étude de la modulation des paramètres cinétiques du métabolisme de l'Apo A-I des sous-classes HDL lors d'une situation physiopathologique (diabète de type II) et lors d'une situation physiologique (à jeun et à l'état nourri). Lors d'un diabète de type II, la concentration de l'Apo A-I était réduite au niveau du plasma et des α HDL en raison d'un catabolisme accru de la protéine. La contribution relative de l'Apo A-I au sein des pré β_1 HDL était augmentée suite à une augmentation du recyclage des α en pré β_1 HDL. Dans une dernière étude, le métabolisme des pré β_1 et α HDL a été caractérisé à l'état nourri dans le but de déterminer la contribution relative de l'intestin dans la synthèse de l'Apo A-I. Sous nos conditions expérimentales, l'Apo A-I synthétisée par l'intestin représente 10 à 20% de l'Apo A-I totale et s'incorpore dans les HDL via la voie des lipoprotéines riches en triglycérides (TRL). Une contribution directe n'a pas pu être à ce jour estimée.

Mots clés : pré β_1 HDL, α HDL, Apo A-I, isotopes stables, diabète de type II, état post prandial

New insight in the kinetic study of HDL metabolism by endogenous labelling of Apo A-I in Human using stable isotopes

HDL-cholesterol is inversely correlated to the cardiovascular risk. HDL display anti-atherogenic properties in part by promoting cholesterol reverse transport from peripheral tissues to the liver. Kinetic investigations, because of their dynamic properties, are a powerful tool for studying lipoproteins metabolism. Most of kinetic studies have been investigated by using total HDL isolated by ultracentrifugation, technique known to alter HDL subclasses. The aim of this study was to assess the isolation of HDL by FPLC. This technique of gel filtration respects the integrity of lipoproteins and allows the distinction of enrichments of Apo A-I in pré β_1 and α HDL from total HDL previously used. A new multi-compartmental model was created, including two distinct compartments of pré β_1 and α HDL, which allow the measurement of conversion rate between these lipoproteins. To validate this model, this methodology has been applied to study kinetic disorders of Apo A-I – HDL subclasses metabolism in physiopathology state (type II diabetes) and in physiology state (post prandial study). In type II diabetes, α HDL as well as plasma Apo A-I concentration were decreased because of the increase of protein catabolism. The relative contribution of Apo A-I in pré β_1 HDL was significantly increased and was related to an increase of the recycling rate of α HDL to pré β_1 HDL. In a second time, the pré β_1 and α HDL metabolism has been studied in post prandial state to determine the relative contribution of the intestine in the Apo A-I synthesis. Apo A-I synthesised by the intestine represented 10-20% of the total Apo A-I and was incorporated in HDL after an exchange with triglycerides rich lipoproteins. A direct contribution of the intestine

Key words : pré β_1 HDL, α HDL, Apo A-I, stable isotopes, type II diabetes, post prandial state