

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2006

N°130

T H E S E

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Qualification en Endocrinologie, Diabète et Métabolisme

par

Estelle Nobécourt

Née le 05/11/1975

Présentée et soutenue publiquement

le 17 octobre 2006

Les propriétés anti-athérogènes des particules HDL sont altérées chez les patients diabétiques de type 2

Président : Monsieur le Professeur **B. Charbonnel**

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur M.Krempf

INDEX

I. INTRODUCTION 06

1.1. Le diabète et la maladie athéromateuse.	06
1.1.1. Généralités sur le diabète	06
1.1.2. Pathologie cardio-vasculaire et diabète	07
1.2. Relation entre hyperglycémie, stress oxydant et pathologie cardio-vasculaire	09
1.2.1. Généralités sur le stress oxydant	10
1.2.2. Stress oxydant et diabète	11
1.3. Les particules HDL	12
1.2.1. HDL et maladie cardio-vasculaire	12
1.2.1.a. <u>Les études de population</u>	12
1.2.1.b. <u>Les études d'intervention</u>	13
1.2.1.c. <u>Les modèles animaux</u>	14
1.2.2. Hétérogénéité des particules HDL	14
1.2.3. Les HDL par leurs hétérogénéités possèdent des propriétés antiathérogènes variées	15
1.2.3.a. <u>Le transport inverse du cholestérol</u>	15
1.2.3.b. <u>Les propriétés antioxydantes</u>	16
1.2.3.c. <u>Les autres propriétés antiathérogènes</u>	18
1.2.4. Propriétés antiathérogènes des HDL et diabète	18

II. MATERIEL ET METHODE 20

2.1. Critères de sélection des patients diabétiques et contrôles	20
2.2. Traitement du plasma et du sérum.	20
2.3. Mesure des marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation systémique	21
2.4. Isolement des sous-fractions d'HDL et LDL	21
2.5. Caractérisation des différentes sous fractions d'HDL	24
2.5.1. Composition chimique par méthode enzymatique et révélation en spectrophotométrie.	24
2.5.2. Mesures des concentrations d'ApoE et Apo C (CI, C II et C III)	25
2.6. Mesure de l'activité de la paraoxonase	26
2.7. Mesure de l'activité de la LCAT	27
2.8. Mesure de l'activité de la PAF-AH	27
2.9. Mesure des paramètres de l'oxydation des lipoprotéines	28
2.9.1. Mesure de l'oxydation des LDL en présence des particules HDL	28

2.9.2. <i>Dosage des TBARS (thiobarbituric acid reactivés substances)</i>	31
2.9.3. <i>Dosage des REM (Relative Electrophoretic Mobility)</i>	32
2.10. Tests statistiques	33
III. RÉSULTATS	34
<hr/>	
3.1. Les Caractéristiques cliniques et biologiques des sujets diabétiques de type 2 et des sujets contrôles, non diabétiques.	34
3.2. Marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation systémique	35
3.3. Concentrations plasmatiques et composition chimique des sous-fractions d'HDL	35
3.3.1. <i>Concentration et répartition des sous-fractions de HDL dans le plasma</i>	35
3.3.2. <i>Composition chimique des sous-fractions HDL</i>	36
3.4. Protection des LDL de l'oxydation par les différentes sous-fractions d'HDL	37
3.5. Activité enzymatique des principales enzymes antioxydantes liées au HDL	40
3.5.1. <i>Activité de la paraoxonase</i>	40
3.5.2. <i>Activité de la PAF-AH</i>	40
3.5.3. <i>Activité de la LCAT</i>	41
3.5.4. <i>Corrélations</i>	42
IV. DISCUSSION	43
<hr/>	
4.1. L'élévation du stress oxydant dans le diabète de type 2 est reliée aux anomalies métaboliques caractéristiques de cette pathologie	43
4.2. Les particules HDL isolées des patients diabétiques ont une capacité antioxydante diminuée	45
4.3. L'activité des facteurs antioxydants associés aux HDL des patients diabétiques est altérée	48
4.3.1. <i>Activité de la paraoxonase</i>	48
4.3.2. <i>Etude des autres facteurs aux propriétés antioxydantes liés aux HDL: la PAF-AH, la LCAT et les apolipoprotéines</i>	51
4.4. La modification de la composition chimique des HDL entraîne des remaniements structurels altérant ses fonctions	42
V. CONCLUSIONS	55

VI. PERSPECTIVES	57
VII. BILIOGRAPHIE	58
VIII. ANNEXES	70
Tableau 1. Les différentes sous-populations de particules HDL	72
Tableau 2. Facteurs intervenant dans le remodelage et la composition des particules HDL	76
Tableau 3. Caractéristiques cliniques et biologiques des patients diabétiques de type II et des sujets contrôles, normolipidémiques, non diabétiques.	77
Tableau 4. Concentration molaire, poids moléculaire, composition chimique en lipides et protéines rapportée en pourcentage de la masse totale et activités enzymatiques des sous-fractions de HDL des sujets diabétiques de type II et des sujets contrôles.	78
Tableau 5. Corrélations entre activité de la PON1, de la PAF-AH et de la LCAT et les paramètres de l'oxydation des LDL mesurés en présence des sous-fractions de HDL.	79
Figure 1. Les sous-populations de HDL.	71
Figure 2. Le transport inverse du cholestérol.	73
Figure 3. Le stress oxydant né d'un déséquilibre entre facteurs prooxydants et antioxydants	74
Figure 4. Les 4 voies métaboliques par lesquelles l'hyperglycémie induit le stress oxydant et les dommages vasculaires.	75
Figure 5. Corrélation entre stress oxydant et le taux plasmatique de HDL-C, et l'HbA1c	80
Figure 6. Distribution des différentes sous-fractions de HDL-C.	81
Figure 7. Activité antioxydante spécifique.	82
Figure 8. Activité antioxydante totale.	83
Figure 9. Corrélation entre le stress oxydant systémique et les paramètres d'oxydation des LDL en présence de HDL3c.	84

Abréviations utilisées

HDL High Density Lipoprotein

IDM infarctus du myocarde

AVC accident vasculaire cérébral

HTA hypertension artérielle

UKPDS United Kingdom Prospective Diabetes Study

DCCT Diabetes Control and Complications Trial

EDIC Epidemiology of Diabetes Intervention and Complications,

ox-LDL LDL oxydés,

ROS Reactive Oxygen Species

AGE advanced glycation end product

IMC indice de masse corporelle

TG triglycérides

CT cholestérol total

EC esters de cholestérol / CE cholestérol estérifié

CL cholestérol libre

PL phospholipides

LDL Low Density Lipoprotein

CETP Cholesterol Ester Transfer Protein

ApoA-I Apolipoprotein A-I

LCAT Lecithin Cholesterol Acyl Transferase

PLTP Phospholipid Transfer Protein

HL Hepatic Lipase

EL Endothelial Lipase

VLDL Very Low Density Lipoprotein

LPL Lipoprotein Lipase

ABCA-1 ATP binding cassette, sub-family A, member 1

ABCG-1 ATP binding cassette, sub-family G, member 1

AAPH 2,2'-azobis-(2-amidinopropane/hydrochloride)

MDA Malone dialdéhyde

RÉSUMÉ

L'hyperglycémie du diabète de type 2 est souvent associée à une dyslipidémie caractérisée par une hypertriglycéridémie et un taux de High Density Lipoprotein-cholestérol (HDL-C) diminué. Tous ces facteurs contribuent à l'élévation du stress oxydant participant à l'incidence précoce et élevée de la maladie athéromateuse. Les particules HDL sont reconnues pour leurs propriétés anti-athéromateuses, parmi lesquelles on retrouve des capacités antioxydantes.

L'objectif de ce travail est d'analyser les propriétés antioxydantes des sous-fractions de HDL dans le diabète de type II et de juger l'impact du stress oxydant systémique, du degré d'hyperglycémie et d'hypertriglycéridémie sur les capacités antiathérogènes des HDL.

Méthodes : Les cinq sous-fractions de HDL (2b, 2a, 3a, 3b et 3c) ont été isolées par ultracentrifugation en gradient de densité d'une population de sujets diabétiques de type II, bien équilibrés (n=20) et d'une population de sujets contrôles, non diabétiques, normolipidémiques (n=10). L'activité antioxydante, basée sur la capacité des sous-fractions d'HDL à protéger les particules Low Density Lipoprotein (LDL) de l'oxydation par l'AAPH, a été mesurée ainsi que la composition chimique et enzymatique de chaque sous-fraction de HDL.

La mesure du stress oxydant systémique a été effectuée par le niveau de 8-isoprostanes.

Résultats : l'activité antioxydante des sous-fractions de HDL petites et denses, HDL3b et 3c, isolée des sujets diabétiques, est significativement diminuée (jusqu'à 47%) par comparaison aux sujets contrôles. Le niveau de 8-isoprostanes est significativement plus élevé (2.9 fois) chez les sujets diabétiques par comparaison au groupe contrôle. De plus le niveau de 8-isoprostanes est négativement corrélé avec l'activité antioxydante des sous-fractions d'HDL3, et le niveau plasmatique de HDL-C total et il est positivement corrélé avec la glycémie à jeun et le taux de triglycérides. L'activité de l'enzyme antioxydante associée aux HDL, la paraoxonase, tend à être diminuée dans toutes les sous-fractions et elle est positivement corrélée avec l'activité antioxydante des sous-fractions HDL3. La composition altérée des particules HDL des sujets diabétiques (déplétion en cholestérol libre et estérifié, et enrichissement en triglycérides) est également corrélée avec la diminution des propriétés antioxydantes de ces particules.

Conclusion : Les propriétés antioxydantes des HDL petites et denses sont altérées chez les sujets diabétiques de type II, même s'ils bénéficient d'un équilibre glycémique correct. L'altération de ces propriétés antioxydantes est intimement liée à l'hypertriglycéridémie, la glycémie à jeun, et aux marqueurs du stress oxydant systémique. On retrouve donc une altération quantitative mais aussi qualitative des particules HDL, reconnues comme hautement antiathérogènes. Cela peut expliquer en partie l'incidence élevée de la maladie cardio-vasculaire associée au diabète.

1. INTRODUCTION

De récents changements dans le style de vie, comme l'augmentation des apports caloriques concernant en particulier les graisses et les sucres rapides et la sédentarité ont conduit à une augmentation fulgurante de l'incidence des désordres métaboliques comme les dyslipidémies, le diabète de type II et le syndrome métabolique. La plupart de ces pathologies sont caractérisées par une baisse du taux de High Density Lipoprotein (HDL) mais aussi par une altération des propriétés antiathérogènes présentées par ces particules. Un taux de HDL-cholestérol bas est maintenant clairement établi comme un puissant facteur de risque cardio-vasculaire indépendant¹⁻⁵.

L'incidence du diabète de type II prend des proportions alarmantes: En 1997, 124 millions de diagnostics de diabète de type II ont été réalisés dans le monde. En 2000, le nombre était de 151 millions. Les prédictions pour 2010 sont de 221 millions de nouveaux cas et 300 millions d'ici 2025⁶⁻⁸. Il est prévisible que cette augmentation du nombre de sujets diabétiques de type II sera suivie d'une épidémie de maladies cardio-vasculaires⁹.

En effet 70 à 80% des sujets diabétiques meurent de pathologies en rapport avec la maladie athéromateuse⁸.

Le lien entre diabète et pathologie cardio-vasculaire n'est pas encore totalement expliqué.

1.1. Le diabète et la maladie athéromateuse.

1.1.1. Généralités sur le diabète

Le diabète est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycémie en rapport avec une carence en insuline ou une résistance à son action. On parle de diabète avéré lorsque la glycémie à jeun est supérieure par deux fois à 1,26 g/L (7 mmol/L), selon les critères de l'OMS. L'insuline est une hormone sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. L'insuline régule le métabolisme du glucose, activant son transport dans les cellules insulino-sensibles et favorisant sa mise en réserve au sein du foie.

On retrouve deux principaux types de diabète : Le diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant, dont l'étiologie est une carence complète en insuline le plus souvent d'origine auto-immune. Ce diabète touche essentiellement des sujets jeunes mais peut aussi apparaître plus tardivement. On ne le trouve que chez 5 à 10% de l'ensemble des diabétiques.

Le diabète de type 2 ou diabète non-insulino dépendant représente 90-95% des diabètes, recensés dans le monde ¹⁰. La physiopathologie de ce diabète est en rapport avec une insulino-résistance puis secondairement une insulino-pénie. Il apparaît en général à l'âge mûr, mais des sujets de plus en plus jeunes en sont atteints ¹⁰⁻¹².

L'hyperglycémie chronique, en absence de traitement bien suivi, entraîne des complications touchant essentiellement les vaisseaux qui se divisent en complications microangiopathiques et macroangiopathiques. Les complications microangiopathiques sont dues à l'atteinte des petits vaisseaux, en particulier ceux de la rétine, responsable de rétinopathie, des reins, responsable de néphropathie diabétique et des fibres nerveuses, responsable de neuropathie. Les complications macroangiopathiques sont dues à l'atteinte des gros vaisseaux, en particulier les coronaires, responsable de cardiopathie ischémique, d'infarctus du myocarde (IDM) et d'insuffisance cardiaque, les carotides, responsable d'accident vasculaire cérébrale (AVC), et les artères des membres inférieurs, responsable de l'artérite des membres inférieurs.

1.1.2. Pathologies cardio-vasculaires et diabète

La principale cause de morbi-mortalité du sujet diabétique est la maladie cardio-vasculaire ¹³⁻¹⁵. Elle est généralement précoce et sévère, son risque d'apparition est multiplié par un facteur variant de 3 à 5 par rapport à des sujets exempts de toutes pathologies ^{16,17}. Un sujet diabétique de type 2 sans antécédents d'IDM à le même risque de mourir d'un IDM, qu'un sujet non diabétique ayant déjà fait un IDM ^{16,18}. L'IDM est responsable d'environ 20% des décès de la population de sujets diabétiques et dans le post-infarctus, les sujets diabétiques sont plus susceptibles d'avoir des complications comme la resténose, l'insuffisance cardiaque et le décès ^{13,14,19,20}.

Les sujets diabétiques ont trois fois plus de risques que la population non-diabétique de faire un AVC ^{21,22}.

Le diabète est aussi une cause majeure d'amputations des membres inférieurs d'origine non traumatique ²³.

Les études épidémiologiques ont retrouvé un lien très fort entre le diabète et la maladie cardio-vasculaire faisant de l'hyperglycémie un facteur de risque cardio-vasculaire indépendant ²⁴⁻²⁶.

L'hémoglobine glyquée, HbA1c, est un marqueur permettant d'avoir une idée de l'équilibre glycémique moyen sur les 3 derniers mois ²⁷. Dans la population finlandaise chez des sujets d'âges moyens et chez des sujets âgés, diabétiques de type 2, le niveau d'HbA1c a été retrouvé corrélé à l'incidence de la maladie cardio-vasculaire ^{28,29}. Cependant la grande étude d'intervention qu'est l'United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) ³⁰⁻³², n'a pas réussi à retrouver de relations significatives entre contrôle glycémique et diminution de l'incidence de la pathologie cardio-vasculaire. En effet dans cette étude les investigateurs ont suivi 2 groupes de patients diabétiques de type 2, 1 groupe ayant bénéficié d'un traitement et d'un suivi intensif et un groupe ayant bénéficié d'un suivi conventionnel. A la fin des dix ans de suivi la différence d'HbA1c entre les deux groupes était de 0.9%, liée à une diminution non significative de 16% du risque de faire un IDM dans le groupe ayant bénéficié d'un traitement intensif ³⁰. Cependant, dans le diabète de type 2, l'hyperglycémie est très souvent associée à d'autres facteurs de risques cardio-vasculaires comme la dyslipidémie et l'HTA ²⁴. Chez les sujets diabétiques de type 2 en surpoids, l'amélioration de l'équilibre glycémique obtenue avec la metformine a résulté en une diminution significative de 39% du risque de faire un IDM ³³.

L'étude Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) et son suivi, l'étude Epidemiology of Diabetes Intervention and Complications (EDIC) ont suivi deux groupes de patients diabétiques de type 1, un groupe ayant un traitement et un suivi intensif et l'autre un traitement conventionnel. Ces

études testent particulièrement les effets de la glycémie, les patients diabétiques de type 1 étant le plus souvent exempts d'autres facteurs de risque cardio-vasculaires.

A la fin du DCCT, 7 ans après le début de l'étude, un effet significatif sur la diminution des complications microangiopathiques a été observé dans le groupe bénéficiant d'un traitement intensif. Il a donc été proposé au groupe, ayant un traitement conventionnel, de changer pour un traitement intensifié. 18 ans après le début de l'étude, les deux groupes ont la même HbA1c, cependant, on observe dans le groupe traité, au départ, de façon intensif, une diminution de 42% de l'incidence des pathologies cardio-vasculaires avec en particulier une diminution de 57% du risque de faire un IDM non fatal ou un AVC ³⁴. Ces résultats confirment l'importance de l'hyperglycémie comme facteur de risque cardio-vasculaire ^{35,36}.

1.2. Relation entre hyperglycémie, stress oxydant et pathologie cardio-vasculaire

Dans les tissus ne nécessitant pas d'insuline pour le captage du glucose comme le rein, la rétine, l'endothélium vasculaire, l'hyperglycémie induit des changements dans les voies métaboliques incluant : (i) la voie des polyols avec l'activation de l'aldose réductase entraînant la formation de sorbitol avec consommation de NADPH ³⁷ (ii) l'activation de la protéine kinase C entraînant une augmentation de la formation de diacyl glycerol ^{38,39} (iii) la voie des hexosamines avec la formation d'UDP-acetylglucosamine ⁴⁰⁻⁴² et (iv) la glycation des protéines entraînant la formation d'advanced glycation end product (AGE).

Ces différentes voies métaboliques stimulent la formation de produits d'oxydation très réactifs : les espèces oxygénées réactives, reactive oxygen species (ROS), et sont les promoteurs majeurs du stress oxydant dans le diabète ^{43,44} (Figure 4). Le stress oxydant est fortement impliqué dans la formation de la plaque d'athérome ⁴⁵⁻⁴⁷.

1.2.1. Généralités sur le stress oxydant

Le stress oxydant est défini par un déséquilibre de la balance entre les facteurs pro et antioxydants (Figure 3). Parmi les facteurs prooxydants, on retrouve: les radicaux libres et les espèces oxygénées réactives (ROS) comprenant : les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), les peroxydes d'hydrogène (H_2O_2), le peroxy-nitrite ($ONOO^{\cdot}$) et les radicaux hydroxyles (HO^{\cdot}). Ces facteurs très réactifs ont une durée de vie courte et sont des produits normaux du métabolisme.

Chez le sujet sain, ils représentent 3% de la quantité d'oxygène consommée (essentiellement produit par la chaîne respiratoire). Ils servent de moyens de défense pour la cellule comme, par exemple, la destruction de cellules bactériennes et cancéreuses. Les macrophages et les polynucléaires neutrophiles sont à l'origine d'une source importante d'anions superoxydes, de plus ils secrètent la myéloperoxydase qui initie la peroxydation des lipides⁴⁸.

Le stress oxydant est observé quand la production de radicaux libres dépasse les défenses^{49,50}.

Les radicaux libres non neutralisés réagissent avec des substrats oxydables (protéines, lipides) entraînant la formation de radicaux carbonyles pérennisant la formation de radicaux libres et provoquant des altérations de l'ADN, une modulation de l'expression des gènes, une modification des protéines et de leurs fonctions⁵¹. De façon chronique, ils entraînent des perturbations dans le fonctionnement de la cellule et provoquent son apoptose.

Dans des conditions de stress oxydant, ces radicaux libres peuvent altérer les lipoprotéines et conduire à la formation des particules LDL oxydés (ox-LDL) connues pour leur potentiel hautement athérogène et pro-inflammatoire^{52,53} : l'étape initiale consiste en l'oxydation d'un acide gras des LDL par un facteur prooxydant (« initiateur »). Puis il y a formation d'un radical résonnant centré sur un carbone R^{\cdot} : le diène conjugué, qui va réagir avec le di-oxygène (péroxy radical (ROO^{\cdot})) et entraîner une réaction en chaîne, appelée phase de propagation de la réaction d'oxydation (réaction avec un autre acide gras pour former un radical hydroperoxyde ($ROOH$)).

Les radicaux ainsi que les particules oxydées sont pro-inflammatoires et favorisent la dysfonction endothéliale, une étape primordiale pour la genèse de la plaque d'athérome^{54,55}.

1.2.2. Stress oxydant et diabète

Le stress oxydant est élevé dans le diabète de type 1 et de type 2 ⁵⁶⁻⁶⁰ ainsi que dans les modèles animaux de diabète ^{56,61-63}. Chez le diabétique, les marqueurs du stress oxydant, comme la F₂-isoprostanes, sont particulièrement élevés ^{49,50,64}.

Les défenses antioxydantes sont aussi diminuées (diminution de la superoxyde dismutase, de la catalase, du glutathion, de l'acide ascorbique, de l'acide urique, de la vitamine E...) ^{65,66}.

Les études *in vivo* comme *in vitro* confirment un lien très fort entre hyperglycémie et stress oxydant ⁴⁴: Les monosaccharides sont auto-oxydés dans les conditions physiologiques en la présence de traces d'ions métaux et génèrent des radicaux libres ⁵¹.

L'hyperglycémie entraîne un surcroît de production d'ions superoxydes au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie entraînant une augmentation des ROS ⁴⁴ au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses ⁷⁴. Cette élévation du stress oxydant entraîne une dysfonction de l'endothélium, étape initiale et majeure de la formation de la plaque d'athérome.

La formation d'AGE, ainsi que leurs liaisons à leur récepteur, contribuent fortement à la production de radicaux libres ^{75,76}.

Cependant, l'utilisation d'antioxydants comme la vitamine E, La vitamine C, la N-acetyl cysteine et le probucol, pour prévenir la dysfonction endothéliale et l'apparition des complications liées au diabète, ont trouvé des résultats contradictoires et dans l'ensemble décevants ⁶⁷⁻⁷³.

Un traitement intensif du diabète diminue les marqueurs du stress oxydant.

Malgré la correction de l'hyperglycémie, il persiste chez le diabétique de type 2, un risque élevé de maladie cardio-vasculaire. Ceci est en parti dû aux autres facteurs de risque cardio-vasculaires associés comme la dyslipidémie mixte qui participent aussi à l'élévation du stress oxydant dans cette pathologie ^{24,77}.

Les anomalies du métabolisme lipidique fréquemment retrouvées, associent un taux de triglycérides (TG) élevé à jeun et surtout post prandial, à un taux de HD-C bas. Ces deux anomalies sont

considérées comme des facteurs de risque indépendants dans l'apparition de la maladie athéromateuse.

Le taux de LDL, en général, n'est pas modifié. Cependant, on observe une redistribution de ces particules au profit des LDL petites et denses, plus sensibles à l'oxydation ⁷⁸.

1.3. Les particules HDL

Les particules HDL ont suscité dernièrement un intérêt allant croissant. En effet, un taux de HDL-C bas est maintenant clairement reconnu comme un facteur de risque cardio-vasculaire indépendant, même si les études, cherchant à prouver l'efficacité de l'élévation du taux de HDL-C sur la diminution de la mortalité cardio-vasculaire, restent encore limitées.

Les particules HDL ont, en effet, un puissant potentiel anti-athérogène et outre leur rôle bien connu dans le transport inverse du cholestérol, les particules HDL possèdent des propriétés antioxydantes, mais aussi des propriétés antiinflammatoires, antithrombotiques et sont protectrices contre la dysfonction endothéliale.

1.2.1. HDL et maladie cardio-vasculaire

Un taux de HDL-C inférieur à 35 mg/dl est associé à un risque de maladie cardio-vasculaire multiplié par 4 ⁷⁹. Aux Etats Unis, 58% des patients atteints de maladie cardio-vasculaire ont un HDL-C inférieur au 10^e percentile ⁸⁰.

1.2.1.a. Les études de population

L'association entre un taux diminué de HDL-C et l'augmentation de l'incidence de la maladie cardio-vasculaire a été bien validé dans des études cas témoins mais aussi par des études prospectives à grande échelle comme l'étude Framingham (Framingham Heart Study, FHS) ^{2,5,19},

l'étude PROCAM (PROspective Cardiovascular Munster) ⁷⁹ et l'étude MRIFT Multiple Risk Factor Intervention Trial ⁸¹⁻⁸³.

Une méta-analyse de 4 études : Framingham Heart Study (FHS), Lipid Research Clinics prevalence mortality Follow-up Study (LRCF), Coronary Primary Prevention Trial (CPPT), et Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT), retrouve que chaque augmentation du HDL-C de 1 mg/dl est suivie d'une diminution du risque cardio-vasculaire de 2% chez les hommes et de 3% chez les femmes ¹.

De la même façon, une relation inverse a été retrouvée entre le taux d'apolipoprotéine A-I et l'incidence de la maladie cardio-vasculaire ⁸⁴⁻⁸⁸.

Les familles de patients hyperalphalipoprotéïnémiques semblent vivre plus longtemps, protégées contre les maladies cardio-vasculaires, par comparaison à la population générale ^{89,90}.

Cependant, les familles de patients présentant une hypoalphalipoprotéïnémie d'origine génétique présentent, de façon inconstante, selon l'étiologie, une élévation de l'incidence de la maladie cardio-vasculaire.

1.2.1.b. Les études d'intervention

Des essais cliniques, utilisant les fibrates pour élever le niveau de HDL-C, comme l'étude VA-HIT (Veterans Administration HDL Intervention Trial) ^{80,91}, l'étude « Helsinki Heart Study » ⁹², et l'étude BIP (Bezafibrate Infarction Prevention) ⁹³, ont prouvé que chaque augmentation de 1% du HDL-cholestérol était liée avec une diminution de 3-4% du risque de maladie cardio-vasculaire. Ces études ne sont cependant pas toutes convaincantes puisque l'étude BIP était négative sur le critère principal ainsi que plus récemment l'étude FIELD avec le fénofibrate, bien que l'augmentation du HDL-C, dans cet essai, soit restée très modeste. Plusieurs études utilisant l'acide nicotinique et l'inhibiteur de la CETP torcetrapid, afin d'augmenter le taux de HDL-C, sont en cours ⁹⁴.

1.2.1.c. Les modèles animaux

Ces observations sont renforcées par les modèles animaux d'athérosclérose, souris et lapins, transgéniques pour l'apoA-I, chez qui l'élévation du taux d'HDL-C protège contre le développement de la plaque d'athérome^{85,95-98}.

Récemment l'injection de particules HDL reconstituées, d'apoA-I, d'apoA-I milano ou de peptides mimant l'action de l'apoA-I, ont démontré chez l'animal comme chez l'homme une efficacité hautement significative sur la prévention, mais aussi sur le traitement de la maladie athéromateuse⁹⁹⁻¹⁰⁵.

1.2.2. *Hétérogénéité des particules HDL*

Les particules HDL sont un groupe hétérogène de particules qui sont les plus petites et les plus denses des lipoprotéines plasmatiques. Elles sont composées d'un cœur hydrophobe qui contient des esters de cholestérol et des triglycérides entourés d'une couche simple de phospholipides contenant du cholestérol non estérifié et des apolipoprotéines.

Les particules HDL sont en constant remodelage par des enzymes plasmatiques ou hépatiques comme la lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT), la cholesterol ester transfer protein (CETP), la phospholipid transfer protein (PLTP), la lipase endothéliale (EL) et la lipase hépatique (HL) (tableau 2). Ce remodelage permanent est responsable de l'hétérogénéité des particules HDL avec une population de particules qui varie en taille, densité, conformation, composition et charge (figure 1, tableau 1). Cette hétérogénéité confère aux HDL ces propriétés antiathérogènes très variées.

1.2.2.a. Caractérisations et isolement des particules HDL

Les particules HDL sont secrétées dans le plasma sous forme de particules discoïdales, qui sont rapidement converties en particules sphériques par l'enzyme LCAT après estérification du cholestérol libre. En *gel d'agarose*, on peut isoler ces particules selon leur charge entre les particules ayant une migration pré- β (particules discoïdales) et les particules ayant une migration α

et γ (particules sphériques), les particules ayant une migration α sont les plus abondantes dans le plasma.

Ces particules sphériques peuvent être divisées en 5 sous-populations selon leur taille par *électrophorèse* et *FPLC* (Fast Protein Liquid Chromatography) dont le diamètre varie entre 7.4 et 12.0 nm ¹⁰⁶.

Par *immunoaffinité*, les particules HDL diffèrent par leur composition en apolipoprotéines entre les HDL contenant l'apoA-I mais pas l'apoA-II, les HDL contenant l'apoA-II mais pas A-I et les HDL contenant à la fois l'apoA-I et l'apoA-II.

D'autres apolipoprotéines comme l'apoA-IV, l'apoA-V, l'apoC-I, apoC-II et l'apoC-III, l'apoD, l'apoE, l'apoJ, l'apoL et l'apoM sont aussi associées aux particules HDL ¹⁰⁷ (Figure 1, tableau 1 et 2).

Ces particules peuvent aussi être séparées selon leur densité par *ultracentrifugation* en HDL-2, HDL2a et 2b, (densité comprise entre 1.063 et 1.125 g/ml) et HDL-3, HDL3a, 3b et 3c, (densité comprise entre 1.125 et 1.21g/ml) ¹⁰⁸.

1.2.3. Les HDL par leurs hétérogénéités possèdent des propriétés antiathérogènes variées

1.2.3.a. Le transport inverse du cholestérol

La plus connue des propriétés antiathérogènes des particules HDL est leur habilité à conduire le **transport inverse du cholestérol**, ramenant le cholestérol des cellules périphériques et notamment des macrophages spumeux contenus dans la plaque d'athérome vers le foie où il est éliminé dans la bile ou recyclé.

C'est durant ce transport que les particules HDL sont remodelées et recyclées (figure 2, tableau 2):

La première étape consiste en la formation et l'excrétion de particules HDL discoïdales (migration pré- β), pauvre en lipides, contenant les lipoprotéines associées au HDL en particulier l'apoA-I, la principale apolipoprotéine, formée pour 30% dans l'intestin et 70% par le foie.

Ces particules s'enrichissent en PL, apolipoprotéine et cholestérol au contact des VLDL et des remnants hydrolysés par la lipoprotein lipase, LPL.

Ces particules discoïdales sont de très bon accepteur de cholestérol libre et de PL venant des tissus périphériques mettant en jeu des transporteurs tels que l'ATP-binding cassette transporter sub-family A, member 1 (ABCA-1) et l'ATP-binding cassette transporter sub-family G, member 1, (ABCG-1). Cette étape est fondamentale, car les particules HDL ne pouvant être lipidées, comme c'est le cas, par exemple dans la maladie de Tangier (déficit en ABCA-1), sont très vite éliminées de la circulation.

Le cholestérol libre, ainsi acquis, est estérifié par l'enzyme LCAT entraînant une migration des esters de cholestérol dans le cœur hydrophobe de la particule et transformant les particules discoïdales en particules sphériques, ayant une migration α et représentant la majorité des particules HDL isolées dans le plasma.

Les esters de cholestérol retournent au foie, soit directement après captage des particules HDL par le foie utilisant le récepteur SR-B1, soit indirectement après échange des esters de cholestérol contre des triglycérides avec les particules riches en triglycérides, VLDL, conduit par la CETP.

1.2.3.b. Les propriétés antioxydantes

Les particules HDL ont la capacité d'inhiber l'oxydation des lipides et des protéines contenus dans les membranes cellulaires et les lipoprotéines plasmatiques en particulier les LDL et de traiter les LDL et autres lipides des membranes cellulaires oxydés, biologiquement actifs, grâce à leurs capacités **anti-oxydantes** ^{109,110}. Les HDL assurent le clivage et la séquestration des lipides hydroperoxydés qui sont pro-inflammatoires ^{111,112}. Les particules HDL sont les principaux transporteurs de lipides hydroperoxydés in vivo ¹¹³ et les particules HDL, contenant les lipides hydroperoxydés, sont rapidement reconnues et éliminées par le foie. Les particules HDL peuvent aussi piéger et éliminer les ROS.

Les propriétés antioxydantes des particules HDL viennent des protéines, enzymes et apolipoprotéines, liées à ces particules:

⇒ **Enzyme:** - La paraoxonase, PON, présentant plusieurs isoformes dont la plus fréquente est la PON1¹¹⁴, est une enzyme calcium dépendante, capable d'hydrolyser les phospholipides oxydés associés aux LDL et aux membranes biologiques, de les transformer en lyso-phospholipides, favorisant leur élimination. Les souris Knock out pour la PON1 ont une augmentation des lésions athéromateuses^{115,116} alors que les souris transgéniques pour le gène de la PON1 humaine montre un ralentissement de la formation de la plaque d'athérome¹¹⁷.

- La PAF AH (Platelet Activating Factor Acetyl Hydrolase)¹¹⁸ est aussi une enzyme calcium indépendante clivant préférentiellement les acyls courts en position *sn*-2 de la phosphatidylcholine ainsi que d'autres substances comme le PAF ou d'autres lipides oxydés ce qui lui confère un rôle antiinflammatoire et anti-athéromateux.

- La LCAT joue un rôle fondamental dans le transport inverse du cholestérol en estérifiant le cholestérol libre, transférant un groupe acyl de la position *sn*-2 de la phosphatidyl choline vers le cholestérol libre. Elle possède de plus des capacités antioxydantes en favorisant le transfert des lipides oxydés des LDL vers les HDL^{119,120}. La LCAT est très fragile et rapidement inhibée par de faibles taux de lipides hydroperoxydés.

⇒ **Apolipoprotéines:** Apo AI¹⁰², Apo AII¹²¹⁻¹²³, Apo A IV¹²⁴ (capables de piéger les lipides oxydés).

⇒ **Antioxydants :** une quantité minime d'antioxydants comme la vitamine E, les caroténoïdes ainsi que certains acides gras polyinsaturés sont aussi associés aux particules HDL^{125,126}.

1.2.3.c. Les autres propriétés antiathérogènes

Les particules HDL peuvent inhiber la réponse inflammatoire qui entraîne la migration des monocytes dans la plaque d'athérome et leur transformation en macrophages actifs par leur **capacité antiinflammatoire** ³.

Les HDL sont aussi reconnues pour leur potentiel **antithrombotique** ^{127,128} et agissent sur la **dysfonction endothéliale** ¹²⁹ qui représente l'étape initiale de la formation de la plaque d'athérome. On retrouve des altérations de toutes ces propriétés chez le patient diabétique.

1.2.4. Propriétés anti-athérogènes des HDL et diabète

Dans le diabète de type 2, l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie et l'hypertriglycéridémie conduisent à une modification du niveau, de la composition, et de la fonction des particules HDL ¹³⁰⁻¹³⁷.

L'insulino-résistance entraîne un hyperinsulinisme et une baisse de l'efficacité de l'insuline au niveau des tissus périphériques. L'insuline inhibe physiologiquement la lipase hormono-sensible du tissu adipeux, elle favorise le stockage des acides gras (AG) et évite leur élévation dans la circulation. En condition d'insulino-résistance, on observe une élévation des AG circulants qui, au niveau du foie, stimulent la synthèse de particules riches en TG. De plus, l'insuline est capable d'inhiber directement la synthèse des VLDL au niveau hépatique, là encore cette action est modifiée. L'élévation des particules riches en triglycérides entraîne une augmentation de l'activité de la CETP. La CETP conduit l'échange d'esters de cholestérols, EC, contre des TG entre les particules riches en TG et les particules HDL. Elle provoque un enrichissement des particules HDL en TG et un appauvrissement en EC ^{130,138}. Ces changements de composition retentissent sur la forme et la fonctionnalité des particules HDL ¹³⁹.

De plus il est maintenant établi que les protéines membranaires et plasmatiques, y compris, les apolipoprotéines comme l'apoA-I subissent la glycoxydation dans un contexte d'hyperglycémie ^{139,140}. Ces modifications retentissent aussi sur la fonction et les propriétés anti-athérogènes des particules HDL : sur leur habilité à capter le cholestérol libre des cellules ^{134,141-143} et sur leur

capacité à assurer le transport du cholestérol vers le foie ^{137,143-147}. La glycoxydation des particules HDL impacte leurs propriétés antioxydantes: les particules HDL isolées de sujets diabétiques seraient plus sensibles aux modifications oxydatives et plus chargés en lipides hydroperoxydés ¹⁴⁸. Les LDL circulantes, au niveau de l'intima de la paroi artérielle, sont aussi soumis aux modifications par la glycation. Les LDL glyquées seraient plus sensible au stress oxydant. Les modifications entraînées par la glycoxydation rendent les LDL pro-athérogènes et pro-inflammatoires (recrutement de macrophages, formation de cellules spumeuses, modification de l'homéostasie endothéliale) ^{53,149,150}.

Des travaux préliminaires réalisés par le Dr Kontush et son équipe INSERM U 551, Pitié-Salpêtrière, Paris, avec qui, le présent travail a été réalisé, ont consisté à mieux caractériser les HDL en étudiant le pouvoir antioxydant de ses sous-fractions sur des LDL en cours d'oxydation chez des sujets normolipidémiques, non diabétiques. Ces travaux ont retrouvé une hétérogénéité des propriétés antioxydantes des sous fractions isolées par ultracentrifugation, la fraction HDL3c, petite et dense, étant la plus protectrice contre l'oxydation des LDL, en corrélation avec son contenu en paraoxonase ¹⁵¹.

L'objectif de ce travail est de caractériser, chez le sujet diabétique de type 2 ayant un bon contrôle glycémique, les différentes sous fractions d'HDL isolées par ultracentrifugation et d'analyser leurs capacités antioxydantes sur des LDL en cours d'oxydation.

Mieux connaître le rôle des HDL dans l'athérosclérose permettra de trouver des moyens efficaces de lutter contre cette maladie, en particulier chez des sujets à risque comme le patient diabétique.

2. MATERIEL ET METHODE

2.1. Critères de sélection des patients diabétiques et contrôles

20 patients diabétiques de type 2, selon les critères de la WHO (World Health Association) et de l'ADA (American Diabetes Association), ont été recrutés dans le service du professeur A.Grimaldi, Hôpital la Pitié-Salpêtrière, Paris. Le diabète était bien équilibré sous antidiabétiques oraux (à l'exception des glitazones) ou régime seul sans insulinothérapie avec pour objectif une HbA1c < 7.5%.

Les patients étaient non obèses (BMI < 30), normotendus ou bien équilibrés sous traitement (tension artérielle systolique, TAS < 140 mm de mercure et tension artérielle diastolique, TAD < 90 mm de mercure).

Au niveau du bilan lipidique, ces patients présentaient une dyslipidémie mixte modérée, associée au diabète de type II, ils ne devaient pas prendre de traitement hypolipémiant. Le LDL-C devait être <1,60g/l, le taux de TG < 3g/l, le taux de HDL-C < 0.55g /l.

En comparaison 10 sujets témoins, non diabétiques, normolipidémiques, normotendus ont été recrutés parmi le personnel de la Pitié-Salpêtrière .

Aucun des différents sujets ne fume, ne boit en excès, ni ne prend de traitement influençant le métabolisme des sucres ou des graisses.

Les femmes recrutées sont ménopausées et ne prennent pas de traitement hormonal substitutif.

Aucun sujet n'est atteint de pathologie thyroïdienne, d'insuffisance rénale, d'insuffisance hépatique ou cardiaque.

2.2. Traitement du plasma et du sérum

Pour chaque sujet, il a été prélevé le matin à jeun : 1 tube EDTA permettant d'obtenir environ 3 ml de plasma, après avoir été centrifugé 20 min à 2000 tours/min puis 5 min à 4500 tours/min et 2 tubes secs permettant d'obtenir 6 à 7 ml de sérum, après centrifugation pendant 10 min à 2500 tours/min.

Les prélèvements ont été aliquotés en échantillon de 1 ml après addition de saccharose (à concentration finale 0.6%, qui permet la stabilité des échantillons et limite l'oxydation) et fermeture des tubes sous azote avec du parafilm ¹⁵². Puis les échantillons ont été immédiatement congelés à – 80°C.

2.3. Mesure des marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation systémique

La mesure des 8-isoprostanes, produits de l'oxydation non-enzymatique de l'acide arachidonique, a été utilisée comme marqueur du stress oxydant systémique ⁵⁰. Dans 1 ml de plasma, cette mesure a été réalisée par méthode ELISA en utilisant un kit commercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; les coefficients de variation inter et intra mesure étant respectivement 8.0 et 11.1%).

Comme marqueur de l'inflammation, la protéine C réactive ultra sensible, CRP_{us}, a été mesurée par immunonéphélométrie (les coefficients de variation inter et intra mesure étant <5%)¹⁵³.

2.4. Isolement des sous-fractions d'HDL et de LDL

Dans le plasma, les lipides (cholestérol, triglycérides et phospholipides) sont transportés sous la forme de lipoprotéines pour être solubilisés. Les lipides et les protéines amphiphiles sont reliés par des liaisons non covalentes. Tenant compte de la différence de densité entre lipides purs (0.9 g/cm³)

et protéines pures (1.35 g/cm³), à chaque lipoprotéine correspond une densité selon sa composition.

L'objectif de cette ultracentrifugation est d'obtenir un équilibre isopycnic des lipoprotéines à leur densité dans un gradient de densités ^{108,125}.

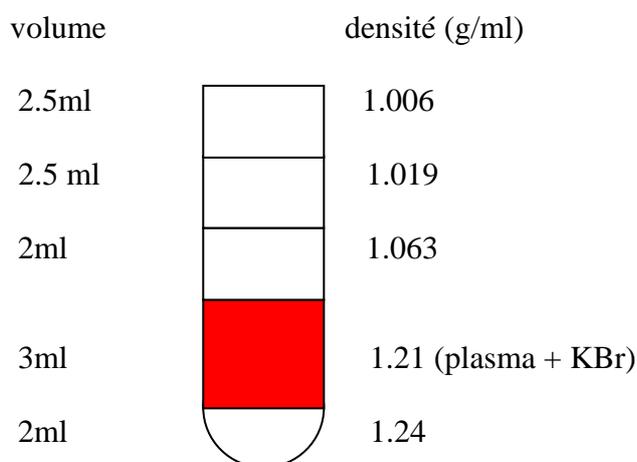
Après décongélation des échantillons, la première étape est d'ajuster la densité plasmatique à 1.21 g/cm³ en utilisant la méthode de Radding et Steinberg, à l'aide du KBr (d=2.75 g/cm³) (1,98 g pour 6 ml de plasma).

Le poids de sel (m) à ajouter à un volume (V) de solution pour ajuster sa densité de d1 à d2 se calcule selon la formule :

$$m = V \frac{d_2 - d_1}{1 - v d_2}$$

v = volume partiel spécifique de sel à une température donnée.

Puis la seconde étape est de déposer soigneusement dans des tubes Beckman Ultraclear, volume 13.2 ml, le plasma mélangé au KBr puis une à une sans les mélanger, les solutions de différentes densités afin de créer un gradient de densité.

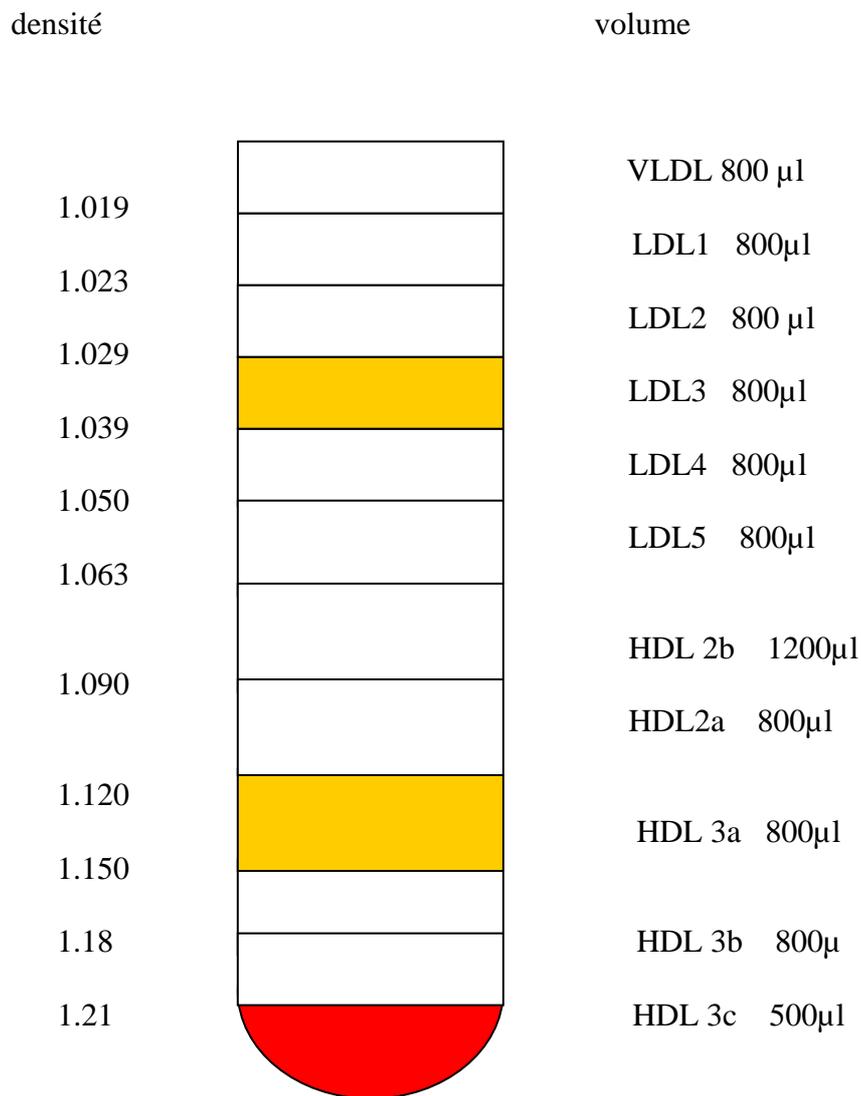


Puis les tubes sont mis en ultracentrifugation (Beckman, rotor SW41-Ti) pendant 48 heures, à 40000 tours/min, 15°C.

Les sous-fractions sont récupérées après 48 heures par pipetage précis, après élimination des VLDL:

On récupère : - 5 sous fractions LDL (1 à 5)

- 5 sous fractions HDL (2a, 2b, 3a, 3b, 3c) :



Répartition des différentes sous-fractions de LDL et de HDL dans le tube Ultraclear après ultracentrifugation.

Après leur récupération les différentes sous-fractions sont mises en dialyse dans du PBS (phosphate-buffered saline) Dulbecco, 1X, pH 7.4 pendant 48h afin d'éliminer le KBr et l'EDTA à 4°C, sous agitation (changement du bain de dialyse 2 fois, respectant un écart minimum de 8 heures entre 2 changements).

Une fois récupérés, les échantillons sont conservés à 4°C et utilisés dans les 10 jours.

2.5. Caractérisation des différentes sous fractions d'HDL

2.5.1. *Composition chimique par méthodes enzymatiques et révélation en spectro-photométrie (Dynex)¹⁰⁸:*

Dosage : - des **protéines totales (PT)** (utilisant le BCA protein assay, s'appuyant sur la réaction du Biuret, Pierce).

- du **Cholestérol total (CT)** (Roche/Hitachi Cholestérol CHOD-PAP (cholestérol oxidase-phenol aminophenazone peroxydase).

- du **Cholestérol libre (CL)** (Kit Wako, Free Cholesterol C CHOD-PAP (glycerol phosphate oxidase-phénol aminophenazone peroxidase).

- des **Phospholipides (PL)** et des **triglycérides (TG)** (kit BioMérieux).

Pour chaque dosage, on utilise 20 µl d'échantillons et de solutions servant à établir la gamme étalon sauf pour le cholestérol libre 50 µl (en raison de sa faible concentration).

Calcul du **cholestérol estérifié (CE)** selon la formule: $CE = CT - CL \times 1.67$

Pour chaque composant, on calcule la concentration pour la sous-fraction d'HDL dans le volume sanguin total en multipliant par la quantité de sous-fractions présente après ultracentrifugation (1,2 ml pour HDL2b et 0,8 ml pour HDL2a, 3a, 3b, 3c) et division par la quantité de plasma ou sérum dans le tube d'ultracentrifugation (3 ml - volume occupé par le KBr (densité 2,75 g/cm³))

Le Dosage de l'apoAI et l'apoAII a été réalisé sur automate KONELAB par immunonéphélométrie.

2.5.2. Mesures des concentrations d'ApoE et d'Apo C (CI, C II et C III)

Elles ont été obtenues en utilisant un gel d'acrylamide à 12%, en condition dénaturante : **SDS-PAGE** (Sodium Dodécyl Sulfate- PolyAcrilamide Gel Électrophorèse) :

La quantité de chaque sous-fraction d'HDL a été calculée pour obtenir un total de 15 µg de protéines par puits et un volume total de 50 µl. Ces échantillons ont été traités par le DTT (1,4-dithiothreitol) pour détruire les ponts disulfures des protéines et permettre leur migration en condition dénaturante selon leur poids moléculaire. A chaque échantillon sont rajoutés, 8 µl de tampon 6X pH 6.8 et 2 µl de bleu de bromophénol, qui permet de suivre la migration de l'échantillon et de l'alourdir pour faciliter le dépôt.

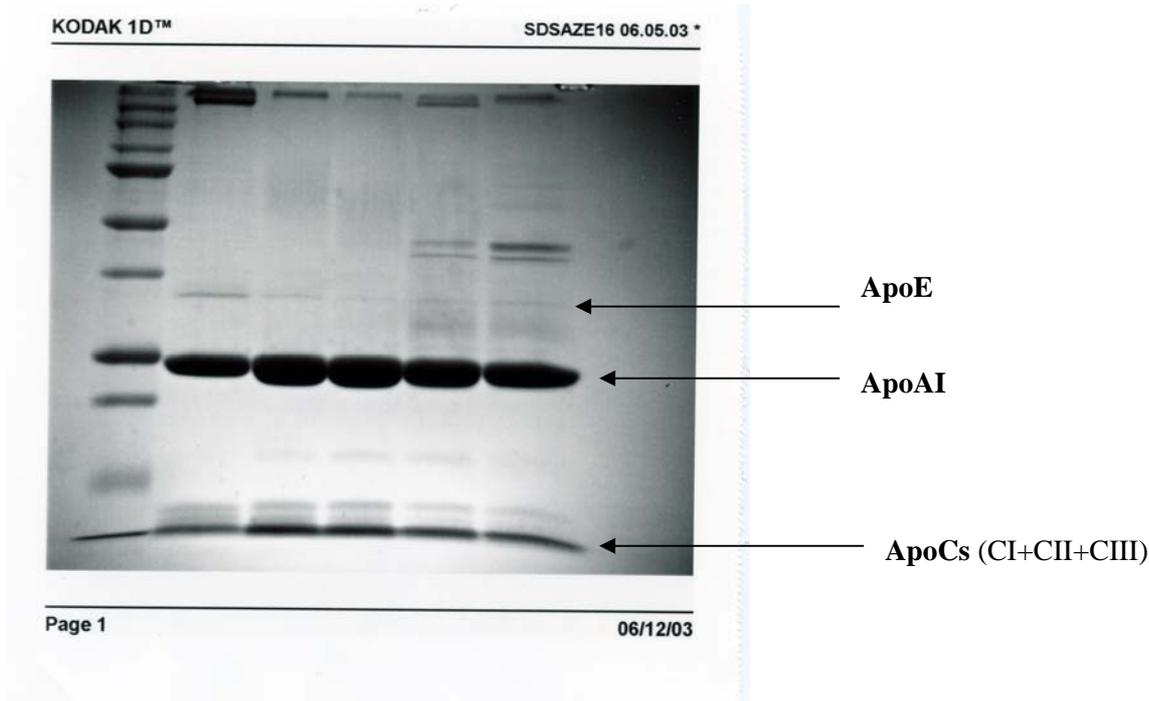
Ensuite chaque préparation est chauffée à 95°C pendant 3 minutes (pour parfaire la dénaturation des protéines par le DTT) avant la migration en cuve d'électrophorèse dans du tampon Laemmli 1X, 30 mA/gel (voltage maximal, 900 V) pendant environ 1h30.

On utilise comme standard de poids moléculaire le Precision Plus Protein standard de Bio-Rad.

La migration finie, les gels sont colorés par le bleu de Coomassie (R250 BioMed), pour permettre la lecture sur Kodak 1D3.5 network, permettant la représentation des apoprotéines comparées à l'ensemble des protéines de l'échantillon en pourcentage, selon l'intensité du signal.

L'apoC se divise en 3 sous classes CI, CII et CIII, leurs poids moléculaires étant compris entre 6000 et 9000 Da.

L'apoE a un poids moléculaire aux alentours de 34000 Da.



Gels SDS-PAGE après coloration par le bleu de coomassie, localisation des principales apoprotéines.

2.6. La mesure de l'activité de la paraoxonase^{154,155}

On mesure l'activité hydrolase de la paraoxonase dans chaque sous-fraction d'HDL, après ultracentrifugation du sérum, en utilisant le phényl acétate comme substrat en présence de chlorure de calcium (enzyme calcium dépendante).

La préparation des échantillons:

Dans un volume final de 250 μ l, on ajoute :

- Les sous-fractions d'HDL pour une concentration finale de 10 μ g de protéine totale/ml.
- Tampon Tris HCL (pH8.0)
- CaCl₂ 1 mM.

Juste avant la mesure de l'activité de la PON1, on ajoute 10 μ l d'une solution de phényl acétate à 0,4% (concentration finale de 1 mM) puis on mesure l'apparition du phénol (produit d'hydrolyse du phényl acetate par la paraoxonase) à 270 nm au spectrophotomètre. La mesure de l'activité est dynamique sur 3 min (5 mesures/min).

Cette mesure est corrigée par le blanc (solution contenant uniquement le tampon Tris, le chlorure de calcium et le phényl acétate).

On obtient une activité en U/mg de protéine totale (1 unité= 1µmol phényl acetate hydrolysée/min).

2.7. Mesure de l'activité de la LCAT

Pour mesurer l'activité de la LCAT, on utilise un substrat (PL fluorescent) émettant à 470 nm, qui, après hydrolyse par la LCAT, émet à 390 nm (kit "LCAT assay" (CALBIOCHEM)).

La concentration en HDL est 10 µg/ml de protéine totale dans 100 µl de tampon + du PBS Chelex (PBS Dulbecco traité avec 1g de résine échangeuse d'ions , le Chelex 100, Biorad, pendant 1 heure) pour un volume final de 150 µl + 0.5 µl de substrat.

On incube la préparation à 37°C pendant 5 heures puis on ajoute le révélateur (150 µl)

Dans une plaque 96 puits, on dépose 250 µL de cette solution puis lecture en mesurant l'émission à 470 nm (le substrat non hydrolysé restant) après excitation à 340 nm sur fluorimètre, VICTOR. De même, on mesure deux blancs en double: 1 blanc sans substrat et 1 blanc avec substrat.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de substrat hydrolysé (PL fluorescent), rapporté au blanc avec substrat après avoir soustrait le blanc sans substrat (pour l'échantillon mesuré et le blanc + substrat) : activité LCAT= (blanc avec substrat – blanc sans)/(blanc avec substrat– HDL)*100.

2.8. Mesure de l'activité de la PAF-AH ¹⁵⁶

On utilise un substrat fluorescent de la PAF-AH, le C6NBD-PC (1 palmitoyl-2-6[7-nitrobenzoxadiazoxyl]aminocaproylphosphatidylcholine), phospholipide possédant un groupement acyl à chaîne courte en position *sn*-2 contenant un fluorochrome (C6NBD).

On ajoute 15 µl d'une solution à 200 µM de C6NBD-PC (concentration finale de 10 µmol/L), à chaque sous-fraction d'HDL (concentration finale de 20 µg de protéine total/ml).

Le volume est ajusté à 300µl par du PBS Chelex. Le mélange est ensuite incubé 45 minutes à 37°C. Ensuite on extrait les lipides à l'aide d'un mélange chloroforme/méthanol (300µl de chaque).

On vortex pendant 1 minute puis les échantillons sont centrifugés à 2500 tours/minute pendant 10 minutes.

200 µl du surnageant sont prélevés (phase aqueuse dans laquelle se trouve l'acide gras portant le fluorochrome, C6NBD, libéré lors de la réaction) puis déposé sur plaque 96 puits. La lecture est faite en fluorescence à 470/533 nm sur fluorimètre VICTOR.

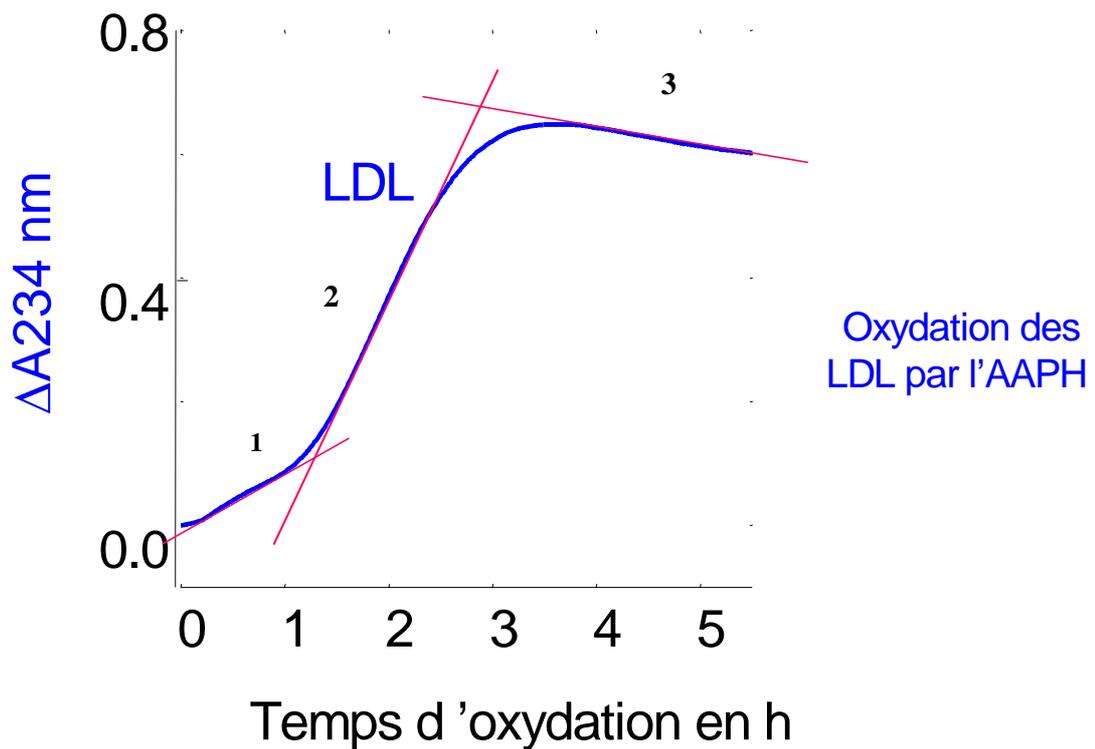
On rapporte les mesures à une gamme étalon réalisée à partir du C6NBD dilué dans un mélange 1/1 de PBS et méthanol pour obtenir une activité en nmol de C6NBD/mg de protéine totale/minute.

2.9. Mesure des paramètres de l'oxydation des lipoprotéines ¹⁵⁷⁻¹⁶⁰

2.9.1. Mesure de l'oxydation des LDL en présence des particules HDL

On étudie l'oxydation d'un pool de 5 sous-fractions de LDL natives, provenant d'un même sujet référent pour toutes les oxydations. Les LDL du sujet référent sont préparées dans les mêmes conditions que les HDL des patients, à partir du plasma (voir paragraphe 2.3.). On étudie l'oxydation du pool de LDL seul puis en présence de chaque sous-fraction d'HDL. La concentration de LDL utilisée est de 10 mg de cholestérol total/dl.

On incube à 37°C dans du PBS Chelex, le mélange de LDL ± les différentes sous-fractions de HDL en présence d'AAPH, 1mM (2,2'-azobis-(2-amidinopropane/hydrochloride)), un azo-initiateur hydrophile de l'oxydation. On mesure l'apparition des diènes (lipides hydroperoxydés) au spectrophotomètre pendant 16 heures (cinétique : 1 mesure/ 10 min/16h), l'absorbance maximale étant à une longueur d'onde de 234 nm. L'oxydation est stoppée à 20 heures par addition d'1µl d'EDTA 0,1 M et 1µl de BHT 2% (butylated hydroxytoluène) comme antioxydant.



Courbe d'apparition des diènes lors de l'oxydation des LDL par l'AAPH, mesurée au spectrophotomètre à 234 nm

La structure des lipides hydroperoxydés est la suivante :



La double-double liaison (diène) résulte de la peroxydation des lipides, elle absorbe les UV à 234 nm. En général l'apparition des diènes est parallèle à l'apparition des produits d'oxydation les TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances).

On obtient une courbe présentant 3 phases :

- La **phase de latence (1) (lag phase)** correspondant à la déplétion des LDL en antioxydants, peu d'oxydation durant cette phase.

- La **phase de propagation (2)** Où se produit une réaction en chaîne entraînant la peroxydation des lipides. C'est la phase où interviennent les HDL.
- La **phase de décomposition des hydroperoxydes (3)**

On s'intéresse essentiellement aux deux premières phases (1 et 2), en déterminant à l'aide de droite de régression : - La **vitesse d'oxydation**

- La **durée de la phase**

De même, on mesure la **concentration maximale en diènes** à la fin de la deuxième phase **2**.

Les mélanges HDL+LDL oxydés sont ensuite congelés à - 80°C pour mesurer les TBARS et REM dans un intervalle de temps maximum de deux mois.

2 types d'oxydation sont étudiées :

L'activité antioxydante spécifique : Elle correspond à la capacité intrinsèque de chaque sous-fraction d'HDL à protéger les LDL de l'oxydation .

On ajoute chaque sous-fraction pour une concentration finale de 10 mg de masse totale/dl afin d'obtenir un ratio HDL : LDL physiologique (2-6 mol/mol)

L'activité antioxydante totale : Chaque sous-fraction est ajoutée à la même dilution (1/6 de la concentration initial): Elle reflète l'activité de chaque sous-fraction en tenant compte de leur répartition plasmatique.

La vitesse d'oxydation des LDL dépend de la composition des LDL en substrats oxydables, en particulier en acide gras poly-insaturés: l'acide linoléique (18:2) et l'acide arachidonique (20:4) contenu dans les PL, les TG et les esters de cholestérol. Selon le régime, les traitements, les pathologies sous-jacentes qui modifient leur composition, les LDL présentent une susceptibilité différente à l'oxydation. Cette méthode a prouvé une bonne reproductibilité.

2.9.2. Dosage des TBARS (*thiobarbituric acid reactives substances*)^{157,160}

Les phospholipides sont les composants principaux à l'interface des milieux intra et extracellulaires. Ces phospholipides disposés régulièrement en monocouche (lipoprotéines) ou bicouche (membranes cellulaires) favorisent par auto-oxydation la propagation de la peroxydation lipidique. Parmi les aldéhydes formés, le plus important, est le malone dialdéhyde (MDA), beta-dialdehyde tricarboné, produit principalement lors de la coupure des acides gras polyinsaturés possédant au moins 3 doubles liaisons (acide arachidonique, acide eicopentaénoïque, acide docosapentaénoïque, acide gamma-linolénique).

Le MDA est le principal produit de la peroxydation lipidique mesuré par cette méthode, on mesure aussi d'autres aldéhydes qui réagissent avec l'acide thiobarbiturique.

Le MDA réagit avec 2 molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), à chaud et en milieu acide pour former un pigment dosé à 532 nm. On mesure le MDA présent préexistant mais aussi celui formé pendant la réaction d'oxydation.

Après avoir décongelés les produits d'oxydation, on précipite les protéines en mélangeant 50 µl du mélange HDL/LDL post-oxydation avec 52 µl de réactif 1 (200 µl d'EDTA 0.1 M + 200 µl de BHT 0.1 M + 5 ml de TCA (acide trichloro-acétique)). Les échantillons sont vortexés puis centrifugés à 1300 tours /min pendant 3 minutes, ce qui permet la précipitation des protéines (afin d'éviter toutes interférences lors de la lecture finale à 530 nm).

On récupère 50 µl de surnageant et on y ajoute 150µl du réactif 2 (acide sulfurique 0.05 M + TBA (acide thiobarbiturique 0.67%), volume/volume). Le mélange est mis dans un bain marie à 95°C pendant 15 minutes puis dans la glace afin de stopper la réaction.

On récupère 150 µl de la solution pour la disposer dans une plaque 96 puits pour la lecture à 530 nm au spectrophotomètre.

Parallèlement, on prépare à partir d'une solution de malone dialdéhyde, une gamme étalon s'échelonnant de 0.625µM à 5µM. On obtient des résultats en µM.

2.9.3. Dosage des REM (Relative Electrophoretic Mobility) ¹⁵⁷

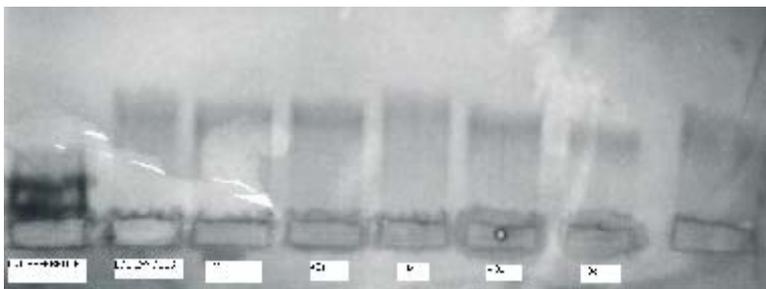
Durant l'oxydation, la charge négative des LDL augmente proportionnellement à l'oxydation de l'apoprotéine B.

On mesure sur gels d'agarose 0.83% + BSA (bovine sérum albumin) la migration des LDL oxydées seules et au contact de chaque sous-fraction d'HDL ainsi que la migration de LDL natives, non oxydées. La migration s'effectue pendant 6 minutes à 400V dans du tampon barbital (pH 8.6).

Les gels sont ensuite fixés dans une solution de méthanol/éthanol/acide acétique /eau (475/30/100/475, v/v/v/v) avant d'être colorés par le noir soudan 0.1% (coloration des lipides) puis décoloration par une solution à 45% d'éthanol. La lecture s'effectue à l'aide du Kodak 1D3.5 network .

Pour obtenir les REM, on mesure le ratio entre la mobilité électrophorétique des LDL oxydées en absence ou en présence des sous-fractions d'HDL et celle d'un pool de LDL natives non oxydées.

La mobilité électrophorétique représente la distance parcourue entre le point de départ et le milieu du pic de migration des LDL.



LDL	LDL	+HDL	+HDL	+HDL	+HDL	+HDL	LDL
Réf.	oxydées	2b	2a	3a	3b	3c	oxydées
	seules						seules

Mesure des REM des LDL oxydées en présence et en absence des sous-fractions d'HDL sur gel d'agarose.

2.10. Test statistique

Pour être reproductible, la majorité des données concernant l'oxydation, les REM et les TBARS, sont rapportées en pourcentage des LDL oxydées seules.

Les différences entre le groupe contrôle et le groupe diabétique sont étudiées par :

- le t-test pour variable indépendante de Student pour les variables continues
- le test de Fischer pour les variables discontinues.

Pour évaluer les relations entre les différentes variables, on calcule des coefficients de corrélation selon Pearson.

Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm la déviation standard.

III. RESULTATS

3.1. Les Caractéristiques cliniques et biologiques des sujets diabétiques de type 2 et des sujets contrôles, non diabétiques

Les patients diabétiques (n=20) ne présentent pas de différences significatives, au niveau de l'âge et du sexe, par rapport aux sujets contrôles (n=10).

Par contre, on retrouve chez les sujets diabétiques de type 2, la dyslipidémie accompagnant classiquement le diabète de type 2, associant un taux de TG 2.2 fois plus élevé comparé aux sujets contrôles ($p<0.01$) et un taux de HDL-C et d'apoA-I diminué (respectivement -19% , $p<0.01$ et -15% , $p<0.01$). Le taux de LDL-C est comparable dans les deux groupes, cependant le taux d'apoB tant à être plus élevé dans le groupe de patients diabétiques ($+17\%$, $p>0.05$), reflétant la concentration plus élevée de particules riches en TG (Tableau 3).

De plus le ratio TC/ HDL-C est plus élevé dans le groupe des patients diabétiques, comparé aux sujets contrôles (4.40 ± 1.03 vs. 3.45 ± 0.72 , $p<0.05$) en faveur d'un profil lipidique athérogène.

L'équilibre glycémique du groupe de sujets diabétiques est globalement bon, l'hémoglobine glyquée moyenne étant mesurée à $7.0 \pm 1.1\%$. La glycémie à jeun est cependant plus élevée dans le groupe des patients diabétiques, que dans le groupe de sujets contrôles ($+43\%$, $p<0.01$) (Tableau 3).

Pour finir, on retrouve un indice de masse corporelle, IMC, significativement plus élevé chez les diabétiques ($p<0.01$).

Dans le groupe de patients diabétiques, 18 patients /20 prennent des hypoglycémiantes (16 patients prennent de la metformine, 7 des sulfamides hypoglycémiantes), 3 patients sont sous anti-hypertenseurs (2 sous inhibiteurs de l'enzyme de conversion, IEC, 1 sous inhibiteurs calciques.)

Les sujets témoins ne prennent aucun traitement.

3.2. Marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation systémique

Le niveau de 8-isoprostanes , utilisé comme marqueur du stress oxydant systémique est 2.9 fois plus élevé dans la population de diabétique de type 2 comparé à la population contrôle (Tableau 1).

Le degré d'inflammation chronique évalué par le niveau de CRP_{us} est similaire dans les deux groupes: mesuré à 40 nmol/L (9-192) dans la population de sujets diabétiques et à 42 nmol/L (8-64) dans la population de sujets contrôles.

Corrélations

Le niveau de 8-isoprostanes est positivement corrélé avec le niveau de HbA1c, la glycémie à jeun, et le ratio TC/HDL-C (respectivement $r=0.52$, $p<0.05$; $r=0.41$, $p<0.05$; $r=0.42$, $p<0.05$) et, est négativement corrélé avec le niveau de HDL-C ($r=-0.46$, $p<0.05$) (figure 5).

3.3. Concentrations plasmatiques et compositions chimiques des sous-fractions d'HDL

3.3.1. Concentration et répartition des sous-fractions de HDL dans le plasma

Les concentrations molaires et le poids moléculaire des fractions HDL3 ne diffèrent pas entre les deux populations (Tableau 4). Par contre les concentrations molaires des sous-fractions HDL2a et HDL2b tendent à être diminuées (respectivement -11% et -5% , $p>0.05$) dans la population de sujets diabétiques par comparaison à la population de sujets contrôles.

En ce qui concerne la distribution plasmatique de ces sous-fractions, on ne retrouve pas de différence entre les sujets diabétiques et contrôles : $HDL2b \cong HDL2a \cong HDL3a > HDL3b > HDL3c$ dans les deux groupes, les HDL 2 prédominent sur les HDL 3.

3.3.2. Composition chimique des sous-fractions HDL :

Les sous-fractions de HDL isolées des sujets diabétiques diffèrent de celles isolées des sujets contrôles par leur composition chimique : Le taux de cholestérol total est diminué de la même façon dans les HDL2 et HDL3 des sujets diabétiques (-27% et - 26%, respectivement) par comparaison aux sujets contrôles (figure 6). Le contenu en ester de cholestérol est diminué au sein de toutes les sous-fractions de HDL des sujets diabétiques alors que le taux de TG a toujours été retrouvé plus élevé par comparaison aux sous-fractions de HDL des sujets contrôles. Le taux de cholestérol libre est significativement diminué dans les sous-fractions HDL2a, 3a et 3b des sujets diabétiques alors que le taux de PL est plus élevé dans les sous-fractions HDL2b, 2a,3a et 3b de ces mêmes sujets (Tableau 4).

La concentration en protéine totale est identique dans les deux groupes sauf dans les sous-fractions HDL3c des sujets diabétiques où elle est plus élevée (Tableau 4). Les concentrations en apoAI et apoAII sont identiques entre les deux groupes.

En ce qui concerne le dosage des apoC (somme de la concentration en apoCI+CII+CIII) et de l'apo E par gels SDS, l'intensité relative étant très faible par rapport aux autres protéines des HDL (en particulier l'apo AI), les valeurs retrouvées sont souvent inquantifiables chez la plupart des sujets contrôles.

On retrouve une augmentation significative de l'apoC dans la sous fraction HDL3c (18.2 ± 8.0 vs 7.5 ± 9.0 mg/dl, $p < 0.01$) et de l'apoE dans les sous-fractions HDL2a (8.8 ± 9.1 vs 1.4 ± 3 mg/dl, $p < 0.05$) et HDL3c (3.7 ± 3.0 vs 0.9 ± 1.1 mg/dl, $p < 0.05$) des sujets diabétiques.

On peut donc dire que la composition chimique des HDL des sujets diabétiques est modifiée par rapport aux sujets contrôles. Les sous-fractions de HDL des sujets diabétiques sont globalement appauvries en cholestérol estérifié et libre, et enrichies en triglycérides et phospholipides. Ces données sont en accord avec les données trouvées dans la littérature¹³¹. Par contre on ne note pas de différence au niveau de leurs masses totales et de leur composition en apoAI et apoAII.

3.3.3. *Corrélations*

Le taux plasmatique de 8-isoprostanes est négativement corrélé, de façon significative, avec le contenu en cholestérol des sous-fractions de HDL, en particulier avec le pourcentage d'EC dans les HDL3b et 3c et le pourcentage de cholestérol libre dans les HDL2a et 3a.

3.4. **Protection des LDL de l'oxydation par les différentes sous-fractions d'HDL**

En accord avec les résultats retrouvés dans une précédente étude, conduite chez des sujets normolipidémiques, non diabétiques ¹⁵¹, les sous-fractions de HDL petites et denses, les HDL3c, des deux groupes, sont les plus puissantes pour inhiber l'oxydation des particules LDL, induite par l'AAPH (Figure 7 a,b).

Dans les conditions employées pour mesurer l'activité antioxydante spécifique (chaque sous-fraction est ajoutée pour une concentration finale de 10 mg de masse totale/dl afin d'obtenir un ratio HDL : LDL physiologique (2-6 mol/mol)), les sous-fractions HDL3b et HDL3c des sujets diabétiques ont une capacité antioxydante significativement diminuée (-19% à -34%, $p < 0.05$) comparés aux sujets contrôles. (Figure 7 b et c)

Chez les sujets diabétiques, seules les sous-fractions HDL3c diminuent significativement l'oxydation des LDL par l'AAPH pendant la phase de propagation (-39%, $p < 0.01$). Aucune des sous-fractions de HDL prolongent significativement cette phase.

Dans la population contrôle, les trois sous-fractions de HDL, petites et denses, HDL3a, 3b et 3c diminuent le taux d'oxydation des particules LDL pendant la phase de propagation : HDL3a (-13%, $p < 0.01$) < HDL3b (-37%, $p < 0.01$) < HDL3c (-58%, $p < 0.001$). De plus HDL3b et 3c prolongent de façon significative cette phase : HDL3b (+28%, $p < 0.001$) < HDL3c (+47%, $p < 0.001$) (Figure 7).

Dans les conditions utilisées pour mesurer l'activité antioxydante totale, chaque sous-fraction est ajoutée à la même dilution. Elle reflète l'activité de chaque sous-fraction en tenant compte de leur répartition plasmatique.

On retrouve de même une diminution des capacités antioxydantes des sous-fractions petites et denses, HDL3 des sujets diabétiques. Les sous-fractions HDL3b et 3c isolées des sujets diabétiques sont moins efficaces pour atténuer d'une part, la vitesse d'oxydation des LDL par comparaison aux sujets contrôles (-23%, $p < 0.05$ et -36%, $p < 0.01$, respectivement) (Figure 8), et d'autre part de prolonger la phase de propagation (-33% et -43%, $p < 0.05$, respectivement) (Figure 8).

Par conséquent, les capacités antioxydantes des sous-fractions HDL3b et HDL 3c sont diminuées chez le sujet diabétique de type 2; ces sous-fractions étant les plus efficaces contre l'oxydation des LDL chez des sujets contrôles ne présentant aucun trouble métabolique.

De façon consistante avec ces résultats, les TBARS et les REM, marqueurs d'oxydation avancés des lipides et des protéines, sont plus élevés dans le groupe de sujets diabétiques. L'accumulation des TBARS est significativement plus importante dans le mélange de LDL-C en présence des sous-fractions HDL3b et 3c isolées des patients diabétiques (+41% et +47% respectivement, $p < 0.05$) par comparaison aux sous-fractions isolées des sujets contrôles.

La protection des particules LDL de l'oxydation par les sous-fractions de HDL s'effectuent surtout aux phases tardives de l'oxydation (Figure 7, a et b), confirmant que les propriétés antioxydantes des HDL sont surtout en rapport avec l'inactivation de l'hydropéroxydation des lipides.

Cependant les sous-fractions d'HDL3c isolées des patients diabétiques et contrôles prolongent la phase de latence de l'oxydation des LDL (+39% et +63% respectivement) ; la différence entre les deux groupes n'est pas significative.

L'augmentation apparente du taux de formation des diènes en présence des sous-fractions HDL2b, 2a et 3a des sujets diabétiques comme des sujets contrôles (Figure 7, a et b) est probablement due à l'oxydation des lipides contenus dans les sous-fractions HDL elles-mêmes¹⁵².

Quand les LDL isolées des sujets diabétiques et des sujets contrôles sont oxydées en absence de sous-fractions HDL, aucune différence, au niveau des paramètres de l'oxydation, n'est retrouvée entre les deux groupes.

Corrélations

Le taux de 8-isoprostanes plasmatiques, de façon générale, est corrélé positivement avec la vitesse d'oxydation des particules LDL pendant la phase de propagation en présence de HDL 3a ($r=0.51$, $p<0.05$), HDL3b ($r=0.68$, $p<0.001$) et HDL3c ($r=0.80$, $p<0.001$) (Figure 9) et négativement corrélé avec la durée de la phase de propagation en présence des sous-fractions HDL3a ($r=-0.41$, $p<0.05$), HDL3b ($r=-0.50$, $p<0.05$) et HDL3c ($r=-0.49$, $p<0.05$).

Le taux de 8-isoprostanes est aussi positivement corrélé avec l'accumulation de TBARS en présence des sous-fractions HDL3b ($r=0.61$, $p<0.01$) et HDL3c ($r=0.51$, $p<0.05$).

Ces corrélations persistent si l'on étudie la population de sujets diabétiques, individuellement, elles disparaissent si l'on prend la population de sujets contrôles uniquement.

La glycémie à jeun est positivement corrélée avec la vitesse d'oxydation des particules LDL en présence des sous-fractions HDL3b ($r=0.53$, $p<0.01$) et HDL3c ($r=0.55$, $p<0.01$) et avec l'accumulation de TBARS en présence d'HDL3b ($r=0.41$, $p<0.05$) et HDL3c ($r=0.48$, $p<0.05$).

Le taux plasmatique de TG est corrélé positivement avec la vitesse d'oxydation des LDL en présence d'HDL3b ($r=0.38$, $p<0.05$) et HDL3c ($r=0.39$, $p<0.05$), ces corrélations persistent dans la population de sujets diabétiques pris individuellement, mais pas dans la population de sujets contrôles.

Une corrélation négative est observée entre la glycémie à jeun ou le niveau de TG, et la durée de la phase de propagation en présence de la sous-fraction HDL3c.

Les troubles métaboliques, retrouvés dans le diabète non insulino-dépendant, participent à la diminution de l'effet antioxydant des particules HDL.

3.5. Activité enzymatique des principales enzymes antioxydantes liées au HDL

3.5.1. Activité de la paraoxonase

l'activité de la PON1 a été mesurée en utilisant le phényl acétate comme substrat. Son activité est retrouvée diminuée, au sein de toutes les sous-fractions d'HDL isolées des sujets diabétiques par comparaison aux sous-fractions isolées des sujets contrôles (jusqu'à -46%). La différence d'activité de la PON1 n'est cependant significative que pour la sous-fraction HDL3a (Tableau 4).

En ce qui concerne la répartition de l'activité enzymatique dans les sous-fractions d'HDL, elle est identique pour les sujets diabétiques et contrôles: majoritaire dans les HDL3c > HDL3b > HDL3a > HDL2b > HDL2a ($p < 0.001$) (Tableau 4).

Environ 90% de l'activité de la PON1 se trouve dans les sous-fractions HDL3b et 3c, petites et denses.

3.5.2. Activité de la PAF-AH

L'activité de la PAF-AH a été mesurée dans un échantillon de 14 patients diabétiques et 8 sujets contrôles. On utilise un substrat fluorescent de la PAF-AH, le C6NBD-PC, phospholipide possédant un groupement acyl à chaîne courte en position *sn*-2 contenant un fluorochrome (C6NBD). Après hydrolyse par la PAF-AH le fluorochrome est libéré et mesuré.

On retrouve une activité de la PAF-AH diminuée significativement dans la sous-fraction HDL3c chez les sujets diabétiques, comparée à la sous-fraction HDL3c des sujets contrôles ($p < 0.05$) sans autre différence significative entre les 2 groupes (Tableau 4)

On retrouve une répartition différente de cette enzyme entre les sujets diabétiques et les sujets contrôles : l'activité enzymatique chez les diabétiques est plus élevée dans les sous-fractions HDL2b et HDL3c $>$ HDL3b ($p < 0.01$) $>$ HDL3a et HDL2a ($p < 0.001$).

L'activité enzymatique des sujets témoins est plus élevée dans les fractions petites et denses HDL3c $>$ HDL3b et HDL2b ($p < 0.001$) $>$ HDL2a et HDL3a ($p < 0.01$) (Tableau 4)

3.5.3. *Activité de la LCAT*

Comme pour le dosage de l'activité de la PAF-AH, le dosage de l'activité de la LCAT a été effectué dans un échantillon de 14 sujets diabétiques et 8 sujets contrôles. La LCAT, hydrolyse un groupe acyl de la position *sn*-2 de la phosphatidylcholine et le transfère vers le cholestérol libre pour entraîner son estérification. Pour mesurer l'activité de LCAT, on utilise un substrat (PL fluorescent) émettant à 470 nm, qui, après hydrolyse par la LCAT, émet à 390 nm.

L'activité de la LCAT a tendance à être plus élevée dans toutes les sous-fractions isolées des sujets diabétiques par comparaison aux sous-fractions isolées des sujets contrôles. Cette différence est significative pour les particules HDL3b (Tableau 4).

On retrouve une distribution à peu près similaire de l'activité enzymatique de la LCAT dans la population de sujets diabétiques et la population de sujets contrôles: elle est la plus élevée dans la sous-fraction HDL3c chez les sujets contrôles comme chez les sujets diabétiques, HDL3c, 3b et 2b présentent une activité supérieure à celle des sous-fractions HDL3a ($p < 0.05$) et HDL2a ($p < 0.01$) (Tableau 4).

3.5.4. *Corrélations*

Quand les paramètres de l'oxydation, en présence des différentes sous-fractions de HDL, sont corrélées avec l'activité des différentes enzymes antioxydantes, on retrouve une corrélation très fortement significative avec la PON 1. En effet, l'activité de la PON1 est corrélée positivement avec la durée de la phase de latence et de la phase de propagation ($p < 0.001$) (Tableau 5) et de façon négative avec la vitesse d'oxydation des particules HDL et le montant maximum de diènes à la fin de la phase de propagation ($p < 0.001$) (Tableau 5).

Une corrélation moins évidente, à la limite de la significativité, est retrouvée avec l'activité de la PAF-AH, n'atteignant la significativité que pour une corrélation positive entre la durée de la phase de latence et l'activité de la PAF-AH ($p < 0.05$) (Tableau 5).

En ce qui concerne la LCAT, on retrouve une corrélation positive entre la durée de la phase de propagation et l'activité de l'enzyme LCAT, et une corrélation négative de l'activité de la LCAT avec la vitesse d'oxydation des particules LDL ($p < 0.05$), et avec le taux maximum de diènes accumulés à la fin de la phase de propagation ($p < 0.05$) (Tableau 5).

IV. DISCUSSION

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux capacités des sous-fractions HDL de sujets diabétiques de type 2, ayant un bon contrôle glycémique, isolées par ultracentrifugation, à protéger les particules LDL de l'oxydation. Nous avons comparé ces propriétés antioxydantes à celles de sujets contrôles ne présentant aucun trouble métabolique ni pathologie particulière.

Ce travail a mis en évidence que les HDL petites et denses, en particulier les sous-fractions HDL3b et 3c, isolées des sujets diabétiques, voient leurs capacités à protéger les LDL de l'oxydation, altérées (jusqu'à -52%), par comparaison aux sujets contrôles, normolipidémiques, non diabétiques. Ces HDL petites et denses, dysfonctionnelles, présentent des anomalies de composition, autant, au niveau de leur cœur lipidique (TG et EC) que de leur surface (FC et PL). Les sous-fractions de HDL isolées des patients diabétiques sont appauvries en ester de cholestérol et en cholestérol libre et enrichies en TG et phospholipides.

D'autre part, les enzymes antioxydantes telles que la paraoxonase 1, en particulier, et la PAF-AH associées aux sous-fractions des sujets diabétiques ont une activité enzymatique diminuée par comparaison aux enzymes associées aux sous-fractions HDL des sujets contrôles.

Comme précédemment décrit, que ce soit chez les sujets diabétiques ou les sujets contrôles, les sous-fractions de HDL petites et denses, HDL3, exercent la plus grande habilité à protéger les LDL de l'oxydation ^{151,161,162}.

4.1. L'élévation du stress oxydant dans le diabète de type 2 est reliée aux anomalies métaboliques caractéristiques de cette pathologie

Le stress oxydant, résultant du déséquilibre entre facteurs pro et antioxydants, joue un rôle important dans l'accélération du développement de la maladie athéromateuse qui caractérise le diabète. En effet l'hyperglycémie, la dyslipidémie et l'hyperinsulinémie, associées au diabète de

type II, entraînent une augmentation de la production de produits d'oxydation très réactifs, les ROS, réagissant avec les lipides et les protéines. Ces modifications sont responsables de la dysfonction de l'endothélium vasculaire qui perd ses capacités protectrices et devient proathérogène^{49-51,163-165}.

Dans notre population de sujets diabétiques de type 2, le stress oxydant systémique, mesuré par le taux de 8-isoprostanes plasmatique, est 3 fois plus élevé que dans la population de sujets contrôles. Cette élévation est de plus corrélée avec la glycémie à jeun ainsi qu'avec le profil lipidique athérogène révélé par le rapport CT/ HDL-C élevé. A l'opposé le taux de 8-isoprostanes est négativement corrélé avec le taux de HDL-C.

Le taux de 8-isoprostanes est aussi positivement corrélé aux marqueurs de l'oxydation des particules LDL, reflété par leur vitesse d'oxydation et le taux de TBARS accumulés, en présence des sous-fractions HDL3b et 3c.

Les capacités antioxydantes des HDL 3b et 3c sont négativement corrélées avec la glycémie à jeun et le taux de triglycérides.

Prenant en compte ces résultats, on retrouve donc une relation forte entre la glycémie à jeun, l'hypertriglycéridémie, le stress oxydant et la capacité diminuée des particules HDL petites et denses, HDL3, à protéger les particules LDL de l'oxydation dans le diabète de type 2.

L'élévation de la triglycéridémie (>150 mg/dl), retrouvée dans notre population de sujets diabétiques, est un élément déterminant de la formation de particules HDL petites et riches en triglycérides dont le métabolisme est altéré^{130,138,166,167}. Le temps de résidence diminué des particules HDL, riches en TG chez les patients hypertriglycéridémiques, compte aussi beaucoup dans l'hypoHDLémie souvent constatée chez les sujets diabétiques de type 2 et hypertriglycéridémiques^{130,166}.

Dans ce contexte, on retrouve au niveau des particules LDL une répartition en faveur des particules LDL petites et denses, enrichies en TG et plus susceptibles à l'oxydation¹³⁰.

D'autre part, l'hyperglycémie favorise la modification des protéines (enzymes et apolipoprotéines) par des processus de glycation non enzymatique induit par le glucose et ses dérivés^{140,168}. Ces altérations favorisent et se cumulent aux modifications induites par le stress oxydant entraînant la glycoxydation¹⁶⁸. La glycation des apolipoprotéines en particulier de l'apoA-I, la principale apolipoprotéine des particules HDL, et de l'apoB, l'apolipoprotéine des LDL, entraînent une altération qualitative de leurs capacités. En effet, la glycation des particules HDL altère leurs propriétés anti-athérogènes et accélère leur turn over participant à la baisse quantitative du taux de particules HDL, constatée dans le diabète de type 2^{168,169}.

Les particules LDL glyquées sont proathérogènes¹⁶⁸ et présentent une susceptibilité accrue aux modifications induites par le stress oxydant⁵³.

Dans cette étude, on ne retrouve pas d'élévation de l'inflammation systémique, mesurée par la CRPus, chez les patients diabétiques.

4.2. Les particules HDL isolées des patients diabétiques ont une capacité antioxydante diminuée.

Les particules HDL sont de puissants facteurs antioxydants, cette propriété a été largement démontrée in vitro^{111,112,170} comme in vivo¹⁷¹.

Plusieurs composants associés aux particules HDL participent à ces propriétés antioxydantes comme les apolipoprotéines A-I, A-II et A-IV ainsi que les enzymes PON-1, PAF-AH et LCAT⁴⁵.

Les particules HDL isolées de sujets diabétiques de type 1 ou type 2, en particulier au stade des complications, montrent une activité antioxydante diminuée^{172,173}.

D'autre part, différentes études retrouvent une plus grande susceptibilité des LDL, isolées de sujets diabétiques, à l'oxydation, ces résultats n'étant pas toujours concordants d'une étude à l'autre^{53,174-}

178

Ces deux phénomènes participent à l'élévation du stress oxydant associé au diabète et à la formation de la plaque d'athérome.

Nous retrouvons ici une capacité antioxydante diminuée des particules HDL isolées de sujets diabétiques de type 2 bien équilibrés.

On ne retrouve pas par contre de plus grande susceptibilité de leurs LDL à l'oxydation.

De nombreuses études s'intéressant aux capacités antioxydantes des particules HDL isolées de sujets diabétiques de type 1 ou de type 2, utilisant différents modèles, sont arrivés aux mêmes conclusions :

Hedrick CC. et son groupe ont isolé des particules HDL de sujets diabétiques de type 2 (n=10) atteints de maladie coronarienne et de sujets contrôles (n=12) atteints de maladie coronarienne, non diabétiques. Ils ont testé les capacités de ces particules à inhiber l'activation de l'endothélium par des LDL oxydées. Ils ont retrouvé une capacité antioxydante diminuée des particules HDL isolées des sujets diabétiques par comparaison aux sujets contrôles¹⁹⁴.

Ferreti G et son groupe se sont intéressés aux capacités antioxydantes des particules HDL en testant leur habilité à protéger des membranes d'érythrocytes contre l'oxydation par l'AAPH.

Ils ont testé 31 sujets diabétiques de type 1 mal contrôlés (HbA1c 9.6±2%) et 31 sujets appariés pour l'âge et le sexe non diabétiques¹⁴⁸

En conclusion de cette étude, ils ont trouvé que les HDL isolées de sujets diabétiques sont moins efficaces pour protéger les membranes érythrocytaires de l'oxydation par l'AAPH que les HDL isolées de sujets contrôles.

De même, Kalogerakis G et son groupe ont étudié la capacité des particules HDL isolées de 21 patients diabétiques de type 1 (HbA1c 7.8%) sans complications et de 23 sujets contrôles à traiter des membranes érythrocytaires oxydées en captant les lipides hydroperoxydés de ces membranes.

Ils ont retrouvé une capacité antioxydante diminuée des HDL isolées de sujets diabétiques, comparés au groupe de sujets contrôles¹⁷².

De nombreux travaux, aux résultats parfois contradictoires, ont essayé d'identifier les sous-fractions HDL les plus effectives dans la protection des LDL contre l'oxydation^{161,162,179}. Des travaux antérieurs menés par notre équipe, chez des sujets exempts de toutes pathologies, ont montré une efficacité supérieure des HDL petites et denses (HDL3b et 3c) contre l'oxydation des LDL. Les sous-fractions HDL2b et 2a n'ayant qu'un rôle mineur¹⁸⁰.

Dans ce travail, de façon similaire, les particules de HDL petites et denses sont les plus protectrices contre l'oxydation des LDL par l'AAPH. Ces constatations étant faites dans la population diabétique comme dans la population contrôle.

C'est aussi ces sous-fractions de HDL qui ont leurs capacités antioxydantes altérées chez les sujets diabétiques de type 2. Cette défaillance se manifeste par une vitesse d'oxydation des LDL durant la phase de propagation significativement plus élevée en présence des HDL 3b et 3c des sujets diabétiques comparés aux sujets contrôles, et de façon concordante, une diminution de la durée de cette phase et une augmentation du taux maximum de lipides peroxydés.

Une étude menée par Gowri et son groupe ont regardé la capacité des sous-fractions HDL2 et HDL3 de 20 sujets contrôles et de 18 sujets diabétiques de type 2, mal contrôlés (HbA1c $10.1 \pm 0.6\%$), à protéger les particules LDL de l'oxydation induite par des macrophages THP-1 activés.

Dans cette étude les particules HDL2 isolées des sujets diabétiques sont enrichies en TG et appauvries en EC et présentent une capacité diminuée à protéger les particules de LDL de l'oxydation par comparaison aux HDL2 isolées des sujets contrôles. Cela prouve l'importance de la composition chimique de ces particules dans leurs capacités antioxydantes.

Les particules HDL2, comparées aux HDL3, dans la population de sujets contrôles, mais pas dans la population de sujets diabétiques, sont les plus puissantes pour protéger les LDL de l'oxydation par les macrophages.

Il n'y a pas de différence en ce qui concerne les HDL3 des sujets diabétiques et contrôles, tant en ce qui concerne leurs compositions chimiques que leurs capacités antioxydantes.

Cette discordance avec notre étude peut s'expliquer, par une différence de modèles utilisés avec une efficacité plus importante des particules HDL2, à inhiber les produits d'oxydation venant des macrophages et/ou une sensibilité plus importante de ces particules à l'hyperglycémie ¹⁷³.

On retrouve donc une diminution chez les sujets diabétiques des capacités antioxydantes des particules HDL. Notre étude rapporte qu'il s'agit plus particulièrement des sous-fractions de HDL petites et denses, pour protéger les particules LDL de l'oxydation induite par l'AAPH. Afin d'en comprendre le mécanisme nous nous sommes penchés sur la structure de ces particules :

4.3. L'activité des facteurs antioxydants associés aux HDL des patients diabétiques est altérée.

Comme cité précédemment, les HDL sont un ensemble hétérogène de particules composées de plusieurs facteurs potentiellement antioxydants. Parmi eux, nous avons étudié plusieurs enzymes : la paraoxonase ¹⁸¹ en particulier, la PAF-AH ¹⁸² et la LCAT ¹⁸³.

4.3.1. Activité de la paraoxonase

La paraoxonase 1 est une enzyme majoritairement liée aux particules HDL (90%), retrouvée en quantité minime liée aux VLDL et aux chylomicrons (2% environ), et 5% dans le plasma. Par son activité estérase/ lactonase, elle a la capacité, entre autre, de cliver les lipides hydroperoxydés et de les rendre inactifs.

Il existe 3 isoformes connues de paraoxonase: la PON 3 qui n'est pas liée aux HDL, la PON 2 inactive envers le phenyl acétate et la PON 1 liée aux HDL qui est l'isoforme étudiée ici.

Cette enzyme, liée à l'apo AI est connue pour ses capacités antioxydantes, et son activité est négativement corrélée à l'évolution de la maladie athéromateuse ^{184,185}. La PON1 agit contre le développement de la plaque d'athérome en protégeant les LDL, les HDL et les macrophages contre le stress oxydant ^{115,186,187}, mais aussi en diminuant le captage des LDL oxydées par les

macrophages ¹⁸⁸, en inhibant la synthèse du cholestérol par les macrophages ¹⁸⁹ et en stimulant l'efflux de cholestérol des macrophages vers les particules HDL ¹⁹⁰.

Dans notre étude, conformément à ce qui est déjà publié, la majorité de l'activité enzymatique est associée aux HDL petites et denses (90% de l'activité est liée aux HDL 3b + 3c) ¹⁹¹. Cette répartition est retrouvée aussi bien chez les sujets diabétiques que chez les sujets contrôles.

Dans les différentes études portant sur le sujet, on retrouve de façon consistante une diminution de l'activité de la paraoxonase dans le diabète de type 2, avec ^{192,193} ou non présence de maladie cardiovasculaire ¹⁹⁴, et dans le diabète de type 1 ^{53,172,195,196}.

Cependant, l'étude s'étant intéressée à l'activité de la PON, en cas de diabète débutant ou d'intolérance aux hydrates de carbone, n'a pas retrouvé d'altération de son activité ¹⁹⁷.

La plupart de ces études constatent une baisse d'activité de la paraoxonase chez le sujet diabétique indépendamment de son phénotype et de sa concentration protéique.

De façon concordante, dans notre étude, l'activité de la paraoxonase 1, dont 90% est retrouvée dans les HDL petites et denses (HDL3b + HDL3c), est abaissée dans toutes les sous-fractions isolées des sujets diabétiques comparés aux sujets contrôles. On ne trouve pas, chez les patients diabétiques de corrélation directe entre l'HbA1c ou la glycémie à jeun et l'activité de la PON1, mais l'élévation de la glycémie à jeun est négativement corrélée avec la capacité antioxydante des sous-fractions HDL3. Certaines études ont retrouvé une corrélation négative entre la glycémie à jeun et l'activité de la PON1 dans le diabète ¹⁹⁵.

Un des mécanismes évoqués serait une altération de l'activité de la paraoxonase par glycation ou glycoxydation de la protéine ^{148,172,194,196} :

En effet, dans leur étude, Hedrick CC et al., ont isolé des HDL de sujets contrôles et les ont incubées avec du glucose dans des conditions n'évitant pas l'oxydation. Au bout d'une semaine les particules HDL incubées avec le glucose présentaient un niveau significatif de produit de la glycoxydation. En parallèle, l'activité de la PON, associée à ces particules, a été diminuée de 65%, corrélée à la diminution de ses capacités antioxydantes, comparées aux particules témoins incubées en absence de glucose. Dans leur population de sujets diabétiques de type 2 (n=10) atteints de maladie coronarienne, ils retrouvent une diminution de l'activité de la PON, comparée au groupe de sujets contrôles, non diabétiques, atteints de maladie coronarienne (n=12) ¹⁹⁴.

Dans leur étude, Ferreti G et al. se sont intéressés à des particules HDL isolées de sujets contrôles divisées en HDL ayant une haute activité de la paraoxonase et celles ayant une basse activité de la paraoxonase. Ils ont incubé ces particules avec différentes concentrations de glucose. Après trois jours, un niveau significatif de produits de la glycoxydation est apparu au sein de ces particules par comparaison aux particules contrôles, incubées en absence de glucose. Les particules HDL isolées des sujets ayant une activité de la PON plus faible sont plus sensibles à la glycoxydation et présentent, en base, une concentration plus élevée de lipides oxydés.

La glycoxydation des HDL et notamment de ses apolipoprotéines, entraîne une modification de leurs conformations retentissant sur leurs interactions avec la PON et expliquant aussi la diminution de son activité ¹⁴⁸.

Kalogerakis G et al. ont confirmé que la glycoxydation in vitro de particules HDL, isolées de sujets contrôles, entraînait une diminution de l'activité de la PON1 et de la capacité de ces HDL glycoxydées à capter les lipides hydroperoxydés des membranes biologiques oxydées. En parallèle, dans leur population de 21 patients diabétiques de type 1 (HbA1c 7.8%) sans complication, l'activité de la PON1 a tendance à être diminuée ainsi que leur capacité à capter les lipides hydroperoxydés des membranes érythrocytaires oxydées, comparée au groupe de 23 sujets contrôles ¹⁷².

L'activité de la PON1 est très fortement corrélée dans notre étude à la capacité des particules HDL à protéger les LDL de l'oxydation, suggérant une contribution très importante de la PON1 dans les capacités antioxydantes des HDL petites et denses.

D'autres facteurs contribuent efficacement aux propriétés antioxydantes des particules HDL. Parmi ces facteurs, la PAF-AH et la LCAT ont aussi été étudiées.

4.3.2. Etude des autres facteurs aux propriétés antioxydantes liés aux HDL: la PAF-AH, la LCAT et les apolipoprotéines

La PAF-AH est une sérine estérase qui hydrolyse les chaînes acyls courtes en position sn-2 des phospholipides oxydés. Par ces propriétés, la PAF-AH associée aux particules HDL, peut traiter les LDL oxydées inhibant leur potentiel proinflammatoire¹¹⁸. L'activité de la PAF-AH est diminuée de façon significative, dans les sous-fractions HDL3c isolées des patients diabétiques. On constate chez les sujets diabétiques, par rapport aux sujets contrôles, une redistribution de cette enzyme vers les sous-fractions les moins denses et plus larges. Son activité est significativement élevée dans les HDL2b des sujets diabétiques par rapport aux sujets contrôles. Paradoxalement cette sous-fraction est la moins efficace contre l'oxydation. Chez les sujets contrôles, la majeure partie de l'activité de cette enzyme se trouve dans les HDL 3b et 3c. Cette modification de répartition peut entraîner une altération de la spécificité de cette enzyme et de ses propriétés antiathérogènes.

La LCAT, outre son rôle majeur dans le transport inverse du cholestérol en estérifiant le cholestérol libre, a prouvé son habilité à protéger les particules LDL de l'oxydation¹¹⁹. Dans notre étude, l'activité d'hydrolyse des phospholipides de la LCAT est augmentée dans toutes les sous-fractions d'HDL isolées des sujets diabétiques, par comparaison aux sujets contrôles. Ces constatations laissent à penser que la LCAT n'est pas un élément majeur participant aux capacités antioxydantes des sous-fractions HDL3. Chez les sujets diabétiques, l'activité de la LCAT, selon la méthode utilisée, est retrouvée augmentée¹⁹⁸, non modifiée^{199,200} ou diminuée²⁰⁰⁻²⁰².

L'activité de la LCAT et celle de la PAF-AH sont aussi corrélées avec la capacité des sous-fractions d'HDL à inhiber l'oxydation des LDL, de façon moins évidente cependant que la PON1.

En ce qui concerne les facteurs antioxydants non-enzymatiques, les apolipoprotéines, aucune différence n'est retrouvée concernant les concentrations plasmatiques d'apo AI ou AII entre la population de sujets contrôles et diabétiques. Cependant les apolipoprotéines, comme l'apoA-I, dans le diabète, subissent des modifications liées à l'hyperglycémie et l'augmentation du stress oxydant ^{140,168} qui peuvent entraîner une altération de leurs propriétés, comme co-facteurs des enzymes antioxydantes mais aussi en tant qu'accepteur de lipides hydroperoxydés. Il a été démontré que la glycation in vivo ou in vitro de l'apoA-I altère sa capacité à être lipidée ²⁰³⁻²⁰⁵, à induire le transport du cholestérol des cellules vers les particules HDL ^{135,136}, à activer l'enzyme LCAT ^{137,143,144,146,147}, et augmente son élimination par le rein ¹⁶⁹.

Même en l'absence de différence quantitative, la glycation des apolipoprotéines liées aux HDL peut expliquer la diminution de leurs capacités antioxydantes.

4.4. La modification de la composition chimique des HDL entraîne des remaniements structurels altérant ses fonctions.

La composition lipidique des particules HDL peut influencer ses capacités antioxydantes par des mécanismes directs et indirects. Comme souvent décrit dans le diabète de type II, les sous-fractions HDL des patients diabétiques sont globalement appauvries en cholestérol libre et conjugué ^{130,131}. En compensation, et c'est ce qui explique la conservation de la masse totale par rapport aux sujets contrôles, le taux de TG est augmenté et le taux de phospholipides a tendance à être plus élevé. Ces anomalies de composition semblent corrélées au risque cardio-vasculaire ^{131,206}.

L'activité plus élevée de la CETP dans le diabète de type 2 est à l'origine de l'appauvrissement du cœur hydrophobe des particules HDL en EC et de son enrichissement en TG^{131,132,166,167,207}. Ces changements entraînent des modifications de la conformation des apolipoprotéines avec notamment une pénétration diminuée des régions, centrales et C-terminales, de l'apoA-I dans la phase lipidique entraînant des dissociations de l'apoA-I¹³⁹. De même ces particules sont de mauvais accepteurs du cholestérol cellulaire^{134,137} et leur capacité à accepter les EC, le CL et les PL oxydés des particules LDL est diminuée¹⁸⁰. De récents travaux, non publiés, réalisés par notre groupe ont démontré que les particules HDL3 petites et denses isolées de sujets contrôles, enrichies in vitro en TG et déplétées en EC, voient leur capacité à protéger les particules LDL de l'oxydation abolie.

La modification de la composition chimique des HDL a aussi un impact direct sur le fonctionnement de la PON1. En effet dans une étude récemment publiée par Rosenblat M. et son groupe, ils expliquent la plus faible activité de la PON1 retrouvée chez les sujets diabétiques par une dissociation de cette enzyme des HDL et un manque de sa stabilisation²⁰⁸. En effet, l'environnement lipidique et l'apoA-I sont censés stabiliser cette enzyme, afin d'assurer son bon fonctionnement^{209,210}. On retrouve une corrélation entre l'activité de la PON et la concentration de cholestérol libre dans la sous-fraction HDL3c.

Les sous-fractions de HDL isolées des sujets diabétiques présentent des modifications de leur composition chimique, qui associées aux modifications de l'apoA-I, entraînent une dissociation de la PON1 et une altération de son fonctionnement par manque de stabilité.

Dernier élément, les particules HDL sont les plus importants transporteurs de lipides hydroperoxydés dans le plasma¹¹³. En raison du stress oxydant plus élevé associé au diabète, les HDL isolées de sujets diabétiques, ont un contenu en lipides hydroperoxydés plus élevé, que des HDL isolées de sujet non diabétique^{148,172}. Cette élévation des lipides hydroperoxydés, à son tour,

inhibe la PON1 et la LCAT rendant les particules HDL encore plus susceptibles à l'oxydation et les rendant incapables de protéger les LDL de l'oxydation ^{119,211,212}.

CONCLUSION

Cette étude révèle le dysfonctionnement des sous-fractions petites et denses des HDL, HDL3c et 3b, provenant de sujets diabétiques de type 2. Ces sous-fractions ont prouvé dans les études précédentes leur rôle prédominant dans la protection des LDL contre l'oxydation ¹⁵¹. Ce dysfonctionnement est intimement lié avec le degré d'hyperglycémie et d'hypertriglycéridémie et participe à l'élévation du stress oxydant systémique.

L'altération des capacités antioxydantes de ces HDL3 chez le sujet diabétique, résulte d'une anomalie de la composition lipidique de ces particules. Associées aux modifications des protéines liées à l'hyperglycémie, ces anomalies de la composition, entraîneraient une modification de la conformation et de la fonction de l'apoA-I ainsi qu'une diminution de l'activité et de la liaison des enzymes antioxydantes liées aux HDL, en particulier la paraoxonase1 mais aussi, dans une moindre mesure de la PAF-AH et de la LCAT.

La maladie cardio-vasculaire est la première cause de morbidité et mortalité chez le diabétique de type 2 ^{13,14,213}. En plus de l'hyperglycémie, des anomalies du métabolisme lipidique combinant un taux de TG élevé et un taux d'HDL-C bas, y sont souvent associées. Ces deux anomalies étant considérées comme des facteurs de risque d'athérosclérose indépendant ⁷⁸.

Le défaut de protection des LDL de l'oxydation par les HDL chez le sujet diabétique est un facteur supplémentaire pouvant expliquer l'apparition précoce et sévère de la maladie cardio-vasculaire. Les LDL oxydées représentent un élément majeur de la formation de la plaque d'athérome et un facteur participant à son évolution ^{149,150}.

De cette étude, on peut donc déduire un nouveau mécanisme physiopathologique dans l'apparition précoce des complications athéromateuses chez le sujet diabétique de type 2 impliquant le dysfonctionnement de ses HDL.

En effet, les HDL présentent des anomalies quantitatives mais surtout qualitatives : elles n'exercent plus correctement leur activité antioxydante, en particulier les HDL petites et denses (HDL3b et HDL3c), sur les LDL (plus susceptibles à l'oxydation, chez les sujets diabétiques par leur modification de structure et l'élévation du stress oxydant).

Pour la pratique clinique, cette étude renforce notre attitude thérapeutique visant à obtenir un strict équilibre glycémique, dans la mesure du possible, mais aussi à prendre en charge efficacement les facteurs de risque cardio-vasculaires associés. Elle renforce l'idée que le traitement et la prévention de la maladie cardio-vasculaire dans le diabète de type 2 doit inclure le traitement des anomalies du bilan lipidique et notamment de l'hypertriglycéridémie et des anomalies qualitatives et quantitatives des HDL.

D'autre part, le stress oxydant étant plus élevé chez les patients diabétiques, une alimentation équilibrée, riche en antioxydants, est recommandée même si elle n'a pas réellement fait preuve de son efficacité.

PERSPECTIVES :

Ces travaux ont été réalisés dans un groupe de sujets diabétiques de type 2 ayant un équilibre glycémique correct, il serait intéressant de contrôler les capacités antioxydantes des sous-fractions de HDL dans un groupe de diabétiques de type 2 mal contrôlés mais aussi dans un groupe de patients diabétiques de type 1 bien équilibrés et un groupe de patients diabétiques de type 1 mal équilibrés. Ces différentes études permettraient de faire la part des choses entre les troubles métaboliques associés au diabète de type 2 et de l'hyperglycémie.

Il serait aussi intéressant de trouver un traitement qui corrigerait les anomalies fonctionnelles et structurelles des HDL.

Une classe récente d'anti-diabétiques oraux, les glitazones (agonistes des PPAR γ) agissent à la fois sur le métabolisme des graisses et des sucres en régulant les éléments clés de ces deux grandes voies métaboliques. PPAR γ régule les gènes actifs dans la différenciation adipocytaire et interfère dans le métabolisme des lipides.

Elles permettent de diminuer l'insulino-résistance et ont prouvé leur efficacité dans l'obtention de l'équilibre glycémique seules ou en association avec les autres anti-diabétiques oraux.

Elles ont de même des capacités antioxydantes.

Par toutes ces interactions, elles sont le candidat idéal pour tester leur action sur la capacité antioxydante des HDL dans le diabète de type 2.

D'autre part, Il serait intéressant d'évaluer les effets d'une alimentation équilibrée, enrichie en antioxydants, sur les capacités antioxydantes des particules HDL, chez les sujets diabétiques de type 2, en tenant compte du stress oxydant systémique et du retentissement sur le niveau de triglycérides.

BIBLIOGRAPHIE

1. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989;**79**(1):8-15.
2. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977;**62**(5):707-14.
3. Barter PJ, Rye KA. High density lipoproteins and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1996;**121**(1):1-12.
4. Yaari S, Goldbourt, Even-Zohar S, Neufeld HN. Associations of serum high density lipoprotein and total cholesterol with total, cardiovascular, and cancer mortality in a 7-year prospective study of 10 000 men. *Lancet* 1981;**1**(8228):1011-5.
5. Wilson PW, Abbott RD, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis* 1988;**8**(6):737-41.
6. Zimmet P, Alberti K, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001;**414**(6865):782.
7. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes - Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;**27**(5):1047.
8. association Ad. Diabetes vital statistics, 1996.
9. Colhoun HM, Taskinen MR, Otvos JD, van den Berg P, O'Connor J, Van Tol A. Relationship of phospholipid transfer protein activity to HDL and apolipoprotein B - Containing lipoproteins in subjects with and without type 1 diabetes. *Diabetes* 2002;**51**(11):3300.
10. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2005;**28**:S4.
11. Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *Jama-Journal of the American Medical Association* 2001;**286**(10):1195.
12. Rocchini AP. Childhood obesity and a diabetes epidemic. *New England Journal of Medicine* 2002;**346**(11):854.
13. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *Jama* 1979;**241**(19):2035-8.
14. Miettinen H, Lehto S, Salomaa V, et al. Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. The FINMONICA Myocardial Infarction Register Study Group. *Diabetes Care* 1998;**21**(1):69-75.
15. Pyorala K, Laakso M, Uusitupa M. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev* 1987;**3**(2):463-524.
16. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;**339**(4):229-34.
17. Bierman EL. George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb* 1992;**12**(6):647-56.
18. Malmberg K, Yusuf S, Gerstein HC, et al. Impact of diabetes on long-term prognosis in patients with unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction: results of the OASIS (Organization to Assess Strategies for Ischemic Syndromes) Registry. *Circulation* 2000;**102**(9):1014-9.
19. Abbott RD, Donahue RP, Kannel WB, Wilson PW. The impact of diabetes on survival following myocardial infarction in men vs women. The Framingham Study. *Jama* 1988;**260**(23):3456-60.
20. Bloomgarden ZT. American Diabetes Association annual meeting 1996: cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1996;**19**(12):1459-61.
21. Himmelmann A, Hansson L, Svensson A, Harmsen P, Holmgren C, Svanborg A. Predictors of Stroke in the Elderly. *Acta Medica Scandinavica* 1988;**224**(5):439.

22. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, Other Risk-Factors, and 12-Yr Cardiovascular Mortality for Men Screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993;**16**(2):434.
23. Trautner C, Haastert B, Giani G, Berger M. Incidence of lower limb amputations and diabetes. *DIABETES CARE* 1996;**19**(9):1006-1009.
24. Turner RC, Millns H, Neil HAW, et al. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United kingdom prospective diabetes study (UKPDS : 23). *British Medical Journal* 1998;**316**(7134):823.
25. Laakso M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in Type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;**48**(5):937.
26. Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. *Diabetes Care* 1999;**22**(2):233.
27. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. Recent Progress in Hormone Research, Vol 56, 2001: 1.
28. Uusitupa M, Niskanen L, Siitonen O, Voutilainen E, Pyorala K. Ten-year cardiovascular mortality in relation to risk factors and abnormalities in lipoprotein composition in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetologia* 1993;**36**(11):1175-84.
29. Kuusisto J, Mykkanen L, Pyorala K, Laakso M. Niddm and Its Metabolic Control Predict Coronary Heart-Disease in Elderly Subjects. *Diabetes* 1994;**43**(8):960.
30. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;**352**(9131):837-53.
31. Haffner SM. Epidemiological studies on the effects of hyperglycemia and improvement of glycemic control on macrovascular events in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999;**22**:C54.
32. Wild SH, Dunn CJ, McKeigue PM, Comte S. Glycemic control and cardiovascular disease in Type 2 diabetes: a review. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews* 1999;**15**(3):197.
33. Effect of intensive blood glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34) (vol 352, pg 854, 1998). *Lancet* 1998;**352**(9139):1558.
34. Nathan DM, committee DEw. Intensive diabetes treatment and cardiovascular Disease in patient with type 1 diabetes. *New England Journal of Medicine* 2005;**353**(25):2643-53.
35. Engel S, Martinez H, Shamoon H, et al. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 2003;**348**(23):2294.
36. Nathan DM, Lachin J, Cleary P, et al. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2003;**348**(23):2294-303.
37. Gabbay KH, Mayman C, Henshaw E, Field R. Sorbitol Pathway and Complications of Diabetes. *New England Journal of Medicine* 1973;**288**(16):831.
38. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998;**47**(6):859.
39. Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL. Characterization of the Mechanism for the Chronic Activation of Diacylglycerol-Protein Kinase-C Pathway in Diabetes and Hypergalactosemia. *Diabetes* 1994;**43**(9):1122.
40. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *Journal of Clinical Investigation* 1998;**101**(1):160.
41. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;**97**(22):12222.

42. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju QD, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *Journal of Clinical Investigation* 2001;**108**(9):1341.
43. King GL, Wakasaki H. Theoretical mechanisms by which hyperglycemia and insulin resistance could cause cardiovascular diseases in diabetes. *Diabetes Care* 1999;**22 Suppl 3**:C31-7.
44. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;**414**(6865):813-20.
45. Navab M, Ananthramiah GM, Reddy ST, et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *Journal of Lipid Research* 2004;**45**(6):993.
46. Ross R. Mechanisms of disease - Atherosclerosis - An inflammatory disease. *New England Journal of Medicine* 1999;**340**(2):115.
47. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: Does it hold for humans? *Trends in Cardiovascular Medicine* 2001;**11**(3-4):93.
48. Brennan ML, Wu WJ, Fu XM, et al. A tale of two controversies - Defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *Journal of Biological Chemistry* 2002;**277**(20):17415.
49. Maxwell SRJ, Thomason H, Sandler D, et al. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation* 1997;**27**(6):484.
50. Mezzetti A, Cipollone F, Cucurullo F. Oxidative stress and cardiovascular complications in diabetes: isoprostanes as new markers on an old paradigm. *Cardiovascular Research* 2000;**47**(3):475.
51. Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 1987;**245**(1):243-50.
52. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;**407**(6801):233.
53. Jenkins AJ, Best JD, Klein RL, Lyons TJ. 'Lipoproteins, glycooxidation and diabetic angiopathy'. *Diabetes Metab Res Rev* 2004;**20**(5):349-68.
54. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury - Part II: Animal and human studies. *Circulation* 2003;**108**(17):2034.
55. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury - Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003;**108**(16):1912.
56. Hink U, Li HG, Mollnau H, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation Research* 2001;**88**(2):E14.
57. Best JD, Kalogerakis G, Baker A, et al. Oxidative stress and high density lipoprotein function in type 1 diabetes. *Diabetes* 2002;**51**:A151.
58. Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radical Biology and Medicine* 2003;**34**(12):1563.
59. Odetti P, Garibaldi S, Noberasco G, et al. Levels of carbonyl groups in plasma proteins of type 2 diabetes mellitus subjects. *Acta Diabetologica* 1999;**36**(4):179.
60. Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews* 2001;**17**(3):189.
61. Onozato ML, Tojo A, Goto A, Fujita T, Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: Effects of ACEI and ARB. *Kidney International* 2002;**61**(1):186.
62. Kim YK, Lee MS, Son SM, et al. Vascular NADH oxidase is involved in impaired endothelium-dependent vasodilation in OLETF rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;**51**(2):522.

63. Kanie N, Kamata K. Effects of chronic administration of the novel endothelin antagonist J-104132 on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rat. *British Journal of Pharmacology* 2002;**135**(8):1935.
64. Polidori MC, Pratico D, Savino K, Rokach J, Stahl W, Mecocci P. Increased F-2 isoprostane plasma levels in patients with congestive heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity. *Journal of Cardiac Failure* 2004;**10**(4):334.
65. Ceriello A. Hyperglycaemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Nutrition & Metabolism* 1999;**12**(1):42.
66. Vijayalingam S, Parthiban A, Shanmugasundaram KR, Mohan V. Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 1996;**13**(8):715.
67. Gazis A, White DJ, Page SR, Cockcroft JR. Effect of oral vitamin E (alpha-tocopherol) supplementation on vascular endothelial function in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 1999;**16**(4):304.
68. Heygate KM, Lawrence IG, Bennett MA, Thurston H. Impaired endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1995;**116**(8):3251-9.
69. Keegan A, Walbank H, Cotter MA, Cameron NE. Chronic Vitamin-E Treatment Prevents Defective Endothelium-Dependent Relaxation in Diabetic Rat Aorta. *Diabetologia* 1995;**38**(12):1475.
70. Palmer AM, Gopaul N, Dhir S, Thomas CR, Poston L, Tribe RM. Endothelial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats is not reversed by dietary probucol or simvastatin supplementation. *Diabetologia* 1998;**41**(2):157.
71. Pieper GM, Siebeneich W. Oral administration of the antioxidant, N-acetylcysteine, abrogates diabetes-induced endothelial dysfunction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1998;**32**(1):101.
72. Tesfamariam B, Cohen RA. Free-Radicals Mediate Endothelial-Cell Dysfunction Caused by Elevated Glucose. *American Journal of Physiology* 1992;**263**(2):H321.
73. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation* 1996;**97**(1):22.
74. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *British Journal of Pharmacology* 2000;**130**(5):963.
75. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications - A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999;**48**(1):1.
76. Khechai F, Ollivier V, Bridey F, Amar M, Hakim J, de Prost D. Effect of advanced glycation end product-modified albumin on tissue factor expression by monocytes. Role of oxidant stress and protein tyrosine kinase activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;**17**(11):2885-90.
77. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *Bmj* 1998;**317**(7160):703-13.
78. Fontbonne A, Eschwege E, Cambien F, et al. Hypertriglyceridemia as a Risk Factor of Coronary Heart-Disease Mortality in Subjects with Impaired Glucose-Tolerance or Diabetes - Results from the 11-Year Follow-up of the Paris Prospective-Study. *Diabetologia* 1989;**32**(5):300.
79. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996;**124** Suppl:S11-20.
80. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, et al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans

- Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 1999;**341**(6):410-8.
81. Martin MJ, Browner WS, Wentworth D, Hulley SB, Kuller LH. Serum-Cholesterol, Blood-Pressure, and Mortality - Implications from a Cohort of 361 662 Men. *Lancet* 1986;**2**(8513):933.
 82. Neaton JD, Wentworth D. Serum-Cholesterol, Blood-Pressure, Cigarette-Smoking, and Death from Coronary Heart-Disease - Overall Findings and Differences by Age for 316099 White Men. *Archives of Internal Medicine* 1992;**152**(1):56.
 83. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is Relationship between Serum-Cholesterol and Risk of Premature Death from Coronary Heart-Disease Continuous and Graded - Findings in 356 222 Primary Screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (Mrfit). *Jama-Journal of the American Medical Association* 1986;**256**(20):2823.
 84. BigotCorbel E, AmoryTouz MC, Mainard F. HDL-cholesterol or apolipoprotein AI: How to choose? *Annales De Biologie Clinique* 1996;**54**(10-11):349.
 85. Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, et al. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation* 1996;**94**(4):713.
 86. Fager G, Wiklund O, Olofsson SO, Wilhelmsson C, Bondjers G. Serum Apolipoprotein Levels in Relation to Acute Myocardial-Infarction and Its Risk-Factors - Apolipoprotein a-I Levels in Male Survivors of Myocardial-Infarction. *Atherosclerosis* 1980;**36**(1):67.
 87. Forte TM, Subbanagounder G, Berliner JA, et al. Altered activities of anti-atherogenic enzymes LCAT, paraoxonase, and platelet-activating factor acetylhydrolase in atherosclerosis-susceptible mice. *Journal of Lipid Research* 2002;**43**(3):477.
 88. Puchois P, Kandoussi A, Fievet P, et al. Apolipoprotein a-I Containing Lipoproteins in Coronary-Artery Disease. *Atherosclerosis* 1987;**68**(1-2):35.
 89. Glueck CJ, Gartside P, Fallat RW, Sielski J, Steiner PM. Longevity Syndromes - Familial Hypobeta and Familial Hyperalpha Lipoproteinemia. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1976;**88**(6):941.
 90. Castelli WP, Abbott RD, McNamara PM. Summary Estimates of Cholesterol Used to Predict Coronary Heart-Disease. *Circulation* 1983;**67**(4):730.
 91. Robins SJ, Collins D, Wittes JT, et al. Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events - VA-HIT: A randomized controlled trial. *Jama-Journal of the American Medical Association* 2001;**285**(12):1585.
 92. Manninen V, Elo MO, Frick MH, et al. Lipid alterations and decline in the incidence of coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Jama* 1988;**260**(5):641-51.
 93. Schlesinger Z, Vered Z, Friedenson A, et al. Secondary prevention by raising HDL cholesterol and reducing triglycerides in patients with coronary artery disease - The bezafibrate infarction prevention (BIP) study. *Circulation* 2000;**102**(1):21.
 94. McIntyre JA, Castaner J. Torcetrapib - Atherosclerosis therapy cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitor. *Drugs of the Future* 2005;**30**(4):344.
 95. Benoit P, Emmanuel F, Caillaud JM, et al. Somatic gene transfer of human apoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models. *Circulation* 1999;**99**(1):105.
 96. Plump AS, Scott CJ, Breslow JL. Human Apolipoprotein-a-I Gene-Expression Increases High-Density-Lipoprotein and Suppresses Atherosclerosis in the Apolipoprotein E-Deficient Mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;**91**(20):9607.
 97. Paszty C, Maeda N, Verstuyft J, Rubin EM. Apolipoprotein Ai Transgene Corrects Apolipoprotein-E Deficiency-Induced Atherosclerosis in Mice. *Journal of Clinical Investigation* 1994;**94**(2):899.
 98. Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of Early Atherogenesis in Transgenic Mice by Human Apolipoprotein-a-I. *Nature* 1991;**353**(6341):265.

99. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes - A randomized controlled trial. *Jama-Journal of the American Medical Association* 2003;**290**(17):2292.
100. Shah PK, Kaul S, Nilsson J, Cercek B. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins - An idea whose time for testing is coming, Part II. *Circulation* 2001;**104**(20):2498.
101. Nicholls SJ, Dusting GJ, Cutri B, et al. Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation* 2005;**111**(12):1543.
102. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, et al. Human apolipoprotein A-I and A-I mimetic peptides: potential for atherosclerosis reversal. *Current Opinion in Lipidology* 2004;**15**(6):645.
103. Miyazaki A, Sakuma S, Morikawa W, et al. Intravenous-Injection of Rabbit Apolipoprotein-a-I Inhibits the Progression of Atherosclerosis in Cholesterol-Fed Rabbits. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1995;**15**(11):1882.
104. Li XJ, Chyu KY, Neto JRF, et al. Differential effects of apolipoprotein A-I-mimetic peptide on evolving and established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 2004;**110**(12):1701.
105. Chiesa G, Monteggia E, Marchesi M, et al. Recombinant apolipoprotein A-I-Milano infusion into rabbit carotid artery rapidly removes lipid from fatty streaks. *Circulation Research* 2002;**90**(9):974.
106. Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of Human High-Density Lipoproteins by Gradient Gel-Electrophoresis. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1981;**665**(3):408.
107. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 2001;**294**(5540):169.
108. Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, Laplaud PM. A Density Gradient Ultra-Centrifugal Procedure for the Isolation of the Major Lipoprotein Classes from Human-Serum. *Journal of Lipid Research* 1981;**22**(2):339.
109. Klimov AN, Kozhevnikova KA, Kuzmin AA, Kuznetsov AS, Belova EV. On the ability of high density lipoproteins to remove phospholipid peroxidation products from erythrocyte membranes. *Biochemistry-Moscow* 2001;**66**(3):300.
110. Mackness MI, Durrington PN. Paraonase: another factor in NIDDM cardiovascular disease. *Lancet* 1995;**346**(8979):856.
111. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *Journal of Lipid Research* 2000;**41**(9):1495.
112. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *Journal of Lipid Research* 2000;**41**(9):1481.
113. Bowry VW, Stanley KK, Stocker R. High-Density-Lipoprotein Is the Major Carrier of Lipid Hydroperoxides in Human Blood-Plasma from Fasting Donors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;**89**(21):10316.
114. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraonase - Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation* 1995;**96**(6):2882.
115. Shih DM, Xia YR, Wang XP, et al. Combined serum paraonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Journal of Biological Chemistry* 2000;**275**(23):17527.
116. Shih DM, Gu LJ, Xia YR, et al. Mice lacking serum paraonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998;**394**(6690):284.

117. Tward A, Xia YR, Wang XP, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 2002;**106**(4):484.
118. Watson AD, Navab M, Hama SY, et al. Effect of Platelet-Activating Factor-Acetylhydrolase on the Formation and Action of Minimally Oxidized Low-Density-Lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation* 1995;**95**(2):774.
119. Vohl MC, Neville TAM, Kumarathasan R, Braschi S, Sparks DL. A novel lecithin-cholesterol acyltransferase antioxidant activity prevents the formation of oxidized lipids during lipoprotein oxidation. *Biochemistry* 1999;**38**(19):5976.
120. Peelman F, Vandekerckhove J, Rosseneu M. Structure and function of lecithin cholesterol acyl transferase: new insights from structural predictions and animal models. *Current Opinion in Lipidology* 2000;**11**(2):155.
121. Garner B, Witting PK, Waldeck AR, Christison JK, Raftery M, Stocker P. Oxidation of high density lipoproteins - I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol. *Journal of Biological Chemistry* 1998;**273**(11):6080.
122. Garner B, Waldeck AR, Witting PK, Rye KA, Stocker P. Oxidation of high density lipoproteins - II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *Journal of Biological Chemistry* 1998;**273**(11):6088.
123. Boisfer E, Stengel D, Pastier D, et al. Antioxidant properties of HDL in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II. *Journal of Lipid Research* 2002;**43**(5):732.
124. Ostos MA, Conconi M, Vergnes L, et al. Antioxidative and antiatherosclerotic effects of human apolipoprotein A-IV in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2001;**21**(6):1023.
125. Goulinet S, Chapman MJ. Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols oxygenated and hydrocarbon carotenoids - Relevance to oxidative resistance and atherogenesis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1997;**17**(4):786.
126. Hasselwander O, McEneny J, McMaster D, et al. HDL composition and HDL antioxidant capacity in patients on regular haemodialysis. *Atherosclerosis* 1999;**143**(1):125.
127. Tselepis AD, John Chapman M. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl* 2002;**3**(4):57-68.
128. Sugatani J, Miwa M, Komiyama Y, Ito S. High-density lipoprotein inhibits the synthesis of platelet-activating factor in human vascular endothelial cells. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling* 1996;**13**(1):73.
129. Calabresi L, Gomaraschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins - From bench to bedside. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2003;**23**(10):1724.
130. Taskinen MR. Diabetic dyslipidemia. *Atheroscler Suppl* 2002;**3**(1):47-51.
131. Syvanne M, Ahola M, Lahdenpera S, et al. High-Density-Lipoprotein Subfractions in Non-Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus and Coronary-Artery Disease. *Journal of Lipid Research* 1995;**36**(3):573.
132. Scheffer PG, Bos G, Volwater H, Dekker JM, Heine RJ, Teerlink T. Associations of LDL size with in vitro oxidizability and plasma levels of in vivo oxidized LDL in Type 2 diabetic patients. *Diabetic Medicine* 2003;**20**(7):563.
133. Julier K, Mackness MI, Dean JD, Durrington PN. Susceptibility of low- and high-density lipoproteins from diabetic subjects to in vitro oxidative modification. *Diabetic Medicine* 1999;**16**(5):415.
134. Igau B, Castro G, Clavey V, et al. In vivo glucosylated LpA-I subfraction - Evidence for structural and functional alterations. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1997;**17**(11):2830.

135. Duell PB, Oram JF, Bierman EL. Nonenzymatic glycosylation of HDL and impaired HDL-receptor-mediated cholesterol efflux. *Diabetes* 1991;**40**(3):377-84.
136. Duell PB, Oram JF, Bierman EL. Nonenzymatic glycosylation of HDL resulting in inhibition of high-affinity binding to cultured human fibroblasts. *Diabetes* 1990;**39**(10):1257-63.
137. Cavallero E, Brites F, Delfly B, et al. Abnormal Reverse Cholesterol Transport in Controlled Type-II Diabetic-Patients - Studies on Fasting and Postprandial Lpa-I Particles. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1995;**15**(12):2130.
138. Guerin M, Le Goff W, Lassel TS, Van Tol A, Steiner G, Chapman MJ. Proatherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL1 and dense LDL in type 2 diabetes - Impact of the degree of triglyceridemia. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2001;**21**(2):282.
139. Curtiss LK, Bonnet DJ, Rye KA. The conformation of apolipoprotein A-I in high-density lipoproteins is influenced by core lipid composition and particle size: a surface plasmon resonance study. *Biochemistry* 2000;**39**(19):5712-21.
140. Schleicher E, Deufel T, Wieland OH. Non-Enzymatic Glycosylation of Human-Serum Lipoproteins - Elevated Epsilon-Lysine Glycosylated Low-Density Lipoprotein in Diabetic-Patients. *Febs Letters* 1981;**129**(1):1.
141. Dullaart RPF, van Tol A. Twenty four hour insulin infusion impairs the ability of plasma from healthy subjects and Type 2 diabetic patients to promote cellular cholesterol efflux. *Atherosclerosis* 2001;**157**(1):49.
142. Fievet C, Theret N, Shojaee N, et al. Apolipoprotein a-I Containing Particles and Reverse Cholesterol Transport in Iddm. *Diabetes* 1992;**41**:81.
143. Passarelli M, Catanozi S, Nakandakare ER, et al. Plasma lipoproteins from patients with poorly controlled diabetes mellitus and "in vitro" glycation of lipoproteins enhance the transfer rate of cholesteryl ester from HDL to apo-B-containing lipoproteins. *Diabetologia* 1997;**40**(9):1085-93.
144. Gugliucci A, Stahl AJ. In vitro glycation of human apolipoprotein AI reduces its efficiency in lecithin:cholesterol acyltransferase activation. *Clin Chim Acta* 1991;**204**(1-3):37-42.
145. Quintao EC, Medina WL, Passarelli M. Reverse cholesterol transport in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 2000;**16**(4):237-50.
146. Fournier N, Myara I, Atger V, Moatti N. Reactivity of lecithin-cholesterol acyl transferase (LCAT) towards glycated high-density lipoproteins (HDL). *Clin Chim Acta* 1995;**234**(1-2):47-61.
147. Calvo C, Ulloa N, Delpozo R, Verdugo C. Decreased Activation of Lecithin - Cholesterol Acyltransferase by Glycated Apolipoprotein-a-I. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1993;**31**(4):217.
148. Ferretti G, Bacchetti T, Marchionni C, Caldarelli L, Curatola G. Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity. *Acta Diabetologica* 2001;**38**(4):163.
149. Kontush A, Chancharme L, Escargueil-Blanc I, et al. Mildly oxidized LDL particle subspecies are distinct in their capacity to induce apoptosis in endothelial cells: role of lipid hydroperoxides. *Faseb Journal* 2002;**16**(13).
150. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998;**141**(1):1.
151. Kontush A, Chantepie S, Nobecourt E, et al. Small dense HDL particles exert potent protection of LDL against oxidative stress which is impaired in atherogenic dyslipidemias. *Atherosclerosis Supplements* 2004;**5**(1):38.
152. Kleinveld HA, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Failure of N-Acetylcysteine to Reduce Low-Density-Lipoprotein Oxidizability in Healthy-Subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1992;**43**(6):639.

153. Blackburn R, Giral P, Bruckert E, et al. Elevated C-reactive protein constitutes an independent predictor of advanced carotid plaques in dyslipidemic subjects. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2001;**21**(12):1962.
154. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, Ladu BN. Purification of Human Serum Paraoxonase Arylesterase - Evidence for One Esterase Catalyzing Both Activities. *Drug Metabolism and Disposition* 1991;**19**(1):100.
155. Tsimihodimos V, Karabina SAP, Tambaki AP, et al. Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dyslipidemias of type IIA and type IIB. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2002;**22**(2):306.
156. Steinbrecher UP, Pritchard PH. Hydrolysis of Phosphatidylcholine During Ldl Oxidation Is Mediated by Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase. *Journal of Lipid Research* 1989;**30**(3):305.
157. Kontush A, Hubner C, Finckh B, Kohlschutter A, Beisiegel U. Antioxidative Activity of Ubiquinol-10 at Physiological Concentrations in Human Low-Density-Lipoprotein. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism* 1995;**1258**(2):177.
158. Puhl H, Waeg G, Esterbauer H. Methods to Determine Oxidation of Low-Density Lipoproteins. *Oxygen Radicals in Biological Systems, Pt C*, 1994: 425.
159. Esterbauer H, Zollner H. Methods for Determination of Aldehydic Lipid-Peroxidation Products. *Free Radical Biology and Medicine* 1989;**7**(2):197.
160. Chancharne L, Therond P, Nigon F, Lepage S, Couturier M, Chapman MJ. Cholesteryl ester hydroperoxide lability is a key feature of the oxidative susceptibility of small, dense LDL. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1999;**19**(3):810.
161. Huang JM, Huang ZX, Zhu W. Mechanism of high-density lipoprotein subfractions inhibiting copper-catalyzed oxidation of low-density lipoprotein. *Clinical Biochemistry* 1998;**31**(7):537.
162. Yoshikawa M, Sakuma N, Hibino T, Sato T, Fujinami T. HDL3 exerts more powerful anti-oxidative, protective effects against copper-catalyzed LDL oxidation than HDL2. *Clinical Biochemistry* 1997;**30**(3):221.
163. Baynes JW, Thorpe SR. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 2000;**28**(12):1708-16.
164. Arcaro G, Cretti A, Balzano S, et al. Insulin causes endothelial dysfunction in humans - Sites and mechanisms. *Circulation* 2002;**105**(5):576.
165. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases - The role of oxidant stress. *Circulation Research* 2000;**87**(10):840.
166. Rashid S, Uffelman KD, Lewis GF. The mechanism of HDL lowering in hypertriglyceridemic, insulin-resistant states. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2002;**16**(1):24.
167. Borggreve SE, de Vries R, Dullaart RPF. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin : cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *European Journal of Clinical Investigation* 2003;**33**(12):1051.
168. Lyons TJ, Jenkins AJ. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Curr Opin Lipidol* 1997;**8**(3):174-80.
169. Witztum JL, Fisher M, Pietro T, Steinbrecher UP, Elam RL. Nonenzymatic glucosylation of high-density lipoprotein accelerates its catabolism in guinea pigs. *Diabetes* 1982;**31**(11):1029-32.
170. Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High-Density-Lipoprotein Inhibits the Oxidative Modification of Low-Density-Lipoprotein. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1990;**1044**(2):275.
171. Klimov AN, Gurevich VS, Nikiforova AA, et al. Antioxidative Activity of High-Density-Lipoproteins In vivo. *Atherosclerosis* 1993;**100**(1):13.
172. Kalogerakis G, Baker AM, Christov S, et al. Oxidative stress and high-density lipoprotein function in Type I diabetes and end-stage renal disease. *Clinical Science* 2005;**108**(6):497.

173. Gowri MS, Van der Westhuyzen DR, Bridges SR, Anderson JW. Decreased protection by HDL from poorly controlled type 2 diabetic subjects against LDL oxidation may be due to the abnormal composition of HDL. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1999;**19**(9):2226.
174. Beaudoux JL, Guillausseau PJ, Peynet J, et al. Enhanced Susceptibility of Low-Density-Lipoprotein to in-Vitro Oxidation in Type-1 and Type-2 Diabetic-Patients. *Clinica Chimica Acta* 1995;**239**(2):131.
175. Leinonen JS, Rantalaiho V, Solakivi T, et al. Susceptibility of LDL to oxidation is not associated with the presence of coronary heart disease or renal dysfunction in NIDDM patients. *Clinica Chimica Acta* 1998;**275**(2):163.
176. Rabini RA, Fumelli P, Galassi R, et al. Increased Susceptibility to Lipid Oxidation of Low-Density Lipoproteins and Erythrocyte-Membranes from Diabetic-Patients. *Metabolism-Clinical and Experimental* 1994;**43**(12):1470.
177. Tsai EC, Hirsch IB, Brunzell JD, Chait A. Reduced Plasma Peroxyl Radical Trapping Capacity and Increased Susceptibility of Ldl to Oxidation in Poorly Controlled Iddm. *Diabetes* 1994;**43**(8):1010.
178. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Current Opinion in Lipidology* 1998;**9**(5):471.
179. Ikeda T, Obayashi H, Hasegawa G, et al. Paraoxonase gene polymorphisms and plasma oxidized low-density lipoprotein level as possible risk factors for exudative age-related macular degeneration. *American Journal of Ophthalmology* 2001;**132**(2):191.
180. Kontush A, de Faria EC, Chantepie S, Chapman MJ. Antioxidative activity of HDL particle subspecies is impaired in hyperalphalipoproteinemia: Relevance of enzymatic and physicochemical properties. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2004;**24**(3):526.
181. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2001;**21**(4):473.
182. Tselepis AD, Chapman MJ. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atherosclerosis Supplements* 2002;**3**(4):57.
183. Goyal J, Wang KW, Liu M, Subbaiah PV. Novel function of lecithin-cholesterol acyltransferase - Hydrolysis of oxidized polar phospholipids generated during lipoprotein oxidation. *Journal of Biological Chemistry* 1997;**272**(26):16231.
184. Getz GS, Reardon CA. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Current Opinion in Lipidology* 2004;**15**(3):261.
185. Mackness M, Durrington P, Mackness B. Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology* 2004;**15**(4):399.
186. Rozenberg O, Rosenblat M, Coleman R, Shih DM, Aviram M. Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: Studies in PON1-knockout mice. *Free Radical Biology and Medicine* 2003;**34**(6):774.
187. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice. *Atherosclerosis* 2005;**181**(1):9.
188. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis* 2002;**161**(2):307.
189. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis - Possible role for its phospholipase-A(2)-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2003;**23**(3):461.

190. Rosenblat M, Vaya J, Shih D, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 2005;**179**(1):69.
191. Bergmeier C, Siekmeier R, Gross W. Distribution spectrum of paraoxonase activity in HDL fractions. *Clinical Chemistry* 2004;**50**(12):2309.
192. Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. Serum Paraoxonase Activity, Concentration, and Phenotype Distribution in Diabetes-Mellitus and Its Relationship to Serum-Lipids and Lipoproteins. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1995;**15**(11):1812.
193. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, et al. Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1998;**139**(2):341.
194. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, et al. Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia* 2000;**43**(3):312.
195. Kordonouri O, James RW, Bennetts B, et al. Modulation by blood glucose levels of activity and concentration of paraoxonase in young patients with type 1 diabetes mellitus. *Metabolism-Clinical and Experimental* 2001;**50**(6):657.
196. Mackness B, Durrington PN, Boulton AJM, Hine D, Mackness MI. Serum paraoxonase activity in patients with type I diabetes compared to healthy controls. *European Journal of Clinical Investigation* 2002;**32**(4):259.
197. Kopprasch S, Pietzsch J, Kuhlisch E, Graessler J. Lack of association between serum paraoxonase 1 activities and increased oxidized low-density lipoprotein levels in impaired glucose tolerance and newly diagnosed diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003;**88**(4):1711.
198. Riemens S, van Tol A, Sluiter W, Dullaart R. Elevated plasma cholesteryl ester transfer in NIDDM: relationships with apolipoprotein B-containing lipoproteins and phospholipid transfer protein. *Atherosclerosis* 1998;**140**(1):71.
199. Scherthaner G, Kostner GM, Dieplinger H, Prager R, Muhlhauser I. Apolipoproteins (a-I, a-II, B), Lp(a) Lipoprotein and Lecithin-Cholesterol Acyltransferase Activity in Diabetes-Mellitus. *Atherosclerosis* 1983;**49**(3):277.
200. Hughes TA, Gaber AO, Amiri HS, et al. Lipoprotein Composition in Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus with Chronic Renal Failure - Effect of Kidney-Pancreas Transplantation. *Transplantation Proceedings* 1994;**26**(2):500.
201. Ohta T, Nishiyama S, Nakamura T, Saku K, Maung KK, Matsuda I. Predominance of large low density lipoprotein particles and lower fractional esterification rate of cholesterol in high density lipoprotein in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *European Journal of Pediatrics* 1998;**157**(4):276.
202. Tinoco I Jr SK, Wang J., Puglisi JD. Enzymes Kinetics. Physical chemistry principles and applications in biological systems 4th ED. new jersey USA: Prentice Hall, 2002: 400-435.
203. Calvo C, Talussot C, Ponsin G, Berthezene F. Non Enzymatic Glycation of Apolipoprotein-a-I - Effects on Its Self-Association and Lipid-Binding Properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1988;**153**(3):1060.
204. Calvo C, Ponsin G, Berthezene F. Characterization of the Non Enzymatic Glycation of High-Density Lipoprotein in Diabetic-Patients. *Diabetes & Metabolism* 1988;**14**(3):264.
205. Calvo C, Verdugo C. Association Invivo of Glycated Apolipoprotein-a-I with High-Density-Lipoproteins. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1992;**30**(1):3.
206. Ahnadi CE, Masmoudi T, Berthezene F, Ponsin G. Decreased Ability of High-Density-Lipoproteins to Transfer Cholesterol Esters in Non-Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus. *European Journal of Clinical Investigation* 1993;**23**(8):459.

207. Biesbroeck RC, Albers JJ, Wahl PW, Weinberg CR, Bassett ML, Bierman EL. Abnormal Composition of High-Density Lipoproteins in Non-Insulin-Dependent Diabetics. *Diabetes* 1982;**31**(2):126.
 208. Rosenblat M, Karry R, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: Relevance to diabetes. *Atherosclerosis* 2006;**187**(1):74.
 209. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids - Apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1999;**19**(9):2214.
 210. James RW, Deakin SP. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radical Biology and Medicine* 2004;**37**(12):1986.
 211. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radical Biology and Medicine* 2004;**37**(9):1304.
 212. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, et al. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 1999;**26**(7-8):892.
 213. Pyorala K, Laakso M, Uusitupa M, Stamler J. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view
- Inaugural George Entwisle lecture in hypertension: the comparative impact of diastolic and systolic blood pressure on cardiovascular risk. *Diabetes Metab Rev* 1987;**3**(2):463-524.

Titre de thèse : Les propriétés antiathérogènes des particules HDL sont altérées chez les patients diabétiques de types 2

RESUME

L'hyperglycémie du diabète de type 2 est souvent associée à une dyslipidémie caractérisée par une hypertriglycéridémie et un taux de HDL-C diminué. Tous ces facteurs contribuent à l'élévation du stress oxydant participant à l'incidence précoce et élevée de la maladie athéromateuse. L'objectif de ce travail est d'analyser les propriétés antioxydantes des sous-fractions de HDL dans le diabète de type 2. Les résultats rapportent que les propriétés antioxydantes des HDL petites et denses sont altérées chez les sujets diabétiques de type 2, même s'ils bénéficient d'un équilibre glycémique correct. L'altération de ces propriétés antioxydantes est intimement liée à l'hypertriglycéridémie, la glycémie à jeun, et aux marqueurs du stress oxydant systémique. On retrouve donc une altération quantitative mais aussi qualitative des particules HDL, reconnues comme hautement antiathérogènes. Cela peut expliquer en partie l'incidence élevée de la maladie cardio-vasculaire associée au diabète.

MOTS-CLES

DIABETE DE TYPE 2, HDL, ANTIOXYDANTS, HYPERTRIGLYCERIDEMIE, STRESS OXYDANT, ATHEROSCLEROSE