

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 1996

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 096298 8

THESE N° 6011

**MODIFICATION DE L'ACTIVITE
PARAOXONASE/ARYLESTERASE SERIQUE AU COURS DE
L'INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

présentée et soutenue publiquement le 25 Octobre 1996

PAR

Thierry DANTOINE
né le 22 Juillet 1967 à Toulouse



EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur	Claude LEROUX-ROBERT	Président
M. le Professeur	Jean-Claude ALDIGIER	Juge
M. le Professeur	Louis MERLE	Juge
M. le Docteur	Jean-Pierre CHARMES	Juge
M. le Docteur	Jean DEBORD	Membre invité
M.	Bernard VERNEUIL	Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 1996

THESE N° 60

**MODIFICATION DE L'ACTIVITE
PARAOXONASE/ARYLESTERASE SERIQUE AU COURS DE
L'INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**



présentée et soutenue publiquement le 25 Octobre 1996

PAR

Thierry DANTOINE
né le 22 Juillet 1967 à Toulouse

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur	Claude LEROUX-ROBERT	Président
M. le Professeur	Jean-Claude ALDIGIER	Juge
M. le Professeur	Louis MERLE	Juge
M. le Docteur	Jean-Pierre CHARMES	Juge
M. le Docteur	Jean DEBORD	Membre invité
M.	Bernard VERNEUIL	Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur PIVA Claude

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude

Monsieur le Professeur DENIS François

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

ADENIS Jean-Paul * (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Luc (C.S)	CHIRURGIE INFANTILE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise	MEDECINE INTERNE B
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
BARTHE Dominique (C.S)	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGENETIQUE
BAUDET Jean (C.S)	CLINIQUE OBSTETRICALE ET GYNECOLOGIE
BENSAID Julien (C.S)	CLINIQUE MEDICALE CARDIOLOGIQUE
BERNARD Philippe	DERMATOLOGIE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François (C.S)	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie (C.S)	DERMATOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
BOULESTELX Jean (C.S)	PEDIATRIE
BOUQUIER Jean-José	CLINIQUE DE PEDIATRIE
BOUTROS-TONI Fernand	BIOSTATISTIQUE ET INFORMATIQUE MEDICALE
BRETON Jean-Christian (C.S)	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
CAIX Michel	ANATOMIE
CATANZANO Gilbert (C.S)	ANATOMIE PATHOLOGIQUE
CHASSAIN Albert	PHYSIOLOGIE
CHRISTIDES Constantin	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COGNE Michel	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre (C.S)	UROLOGIE
CUBERTAFOND Pierre (C.S)	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S)	PEDIATRIE
DENIS François (C.S)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DESCOTTES Bernard (C.S)	ANATOMIE
DUDOGNON Pierre	REEDUCATION FONCTIONNELLE
DUMAS Jean-Philippe	UROLOGIE
DUMAS Michel (C.S)	NEUROLOGIE
DUMONT Daniel	MEDECINE DU TRAVAIL
DUPUY Jean-Paul (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
FEISS Pierre (C.S)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
GAINANT Alain	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
GASTINNE Hervé	REANIMATION MEDICALE
GAY Roger (C.S)	REANIMATION MEDICALE
GERMOUTY Jean	PATHOLOGIE MEDICALE ET RESPIRATOIRE
HUGON Jacques	HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE-CYTOGENETIQUE
LABROUSSE Claude (C.S)	REEDUCATION FONCTIONNELLE
LABROUSSE François	ANATOMIE PATHOLOGIQUE

LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LAUBIE Bernard (C.S)	ENDOCRINOLOGIE ET MALADIES METABOLIQUES
LEGER Jean-Marie (C.S)	PSYCHIATRIE D'ADULTES
LEROUX-ROBERT Claude (C.S)	NEPHROLOGIE
LIOZON Frédéric	CLINIQUE MEDICALE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MENIER Robert (C.S)	PHYSIOLOGIE
MERLE Louis	PHARMACOLOGIE
MOREAU Jean-Jacques (C.S)	NEUROCHIRURGIE
MOULIES Dominique	CHIRURGIE INFANTILE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
OUTREQUIN Gérard	ANATOMIE
PECOUT Claude (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
PERDRISOT Rémy	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
PILLEGAND Bernard (C.S)	HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
PIVA Claude (C.S)	MEDECINE LEGALE
PRALORAN Vincent (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
RAVON Robert (C.S)	NEUROCHIRURGIE
RIGAUD Michel	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
ROUSSEAU Jacques (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
SAUTEREAU Denis	HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
SAUVAGE Jean-Pierre (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
TABASTE Jean-Louis (C.S)	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
TREVES Richard (C.S)	RHUMATOLOGIE
TUBIANA-MATHIEU Nicole	CANCEROLOGIE
VALLAT Jean-Michel	NEUROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VANDROUX Jean-Claude (C.S)	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
VIDAL Elisabeth (C.S)	MEDECINE INTERNE
WEINBRECK Pierre (C.S)	MALADIES INFECTIEUSES

PROFESSEUR ASSOCIE A MI-TEMPS

MOULIN Jean-Louis 3ème CYCLE DE MEDECINE GENERALE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

* C.S = Chef de Service

A M. le Pr. LEROUX-ROBERT, dont l'humanisme m'a éclairé sur ce que doit être mon rôle de praticien, n'ayant pour seul et unique but que de soulager le malade.

A M. le Dr. CHARMES, qui m'a appris à ne jamais négliger le moindre détail et m'a donné le goût d'apporter avec rigueur une explication à chacune de mes interrogations.

A M. le Pr. ALDIGIER, dont le charisme rassurant m'a conforté dans ma vocation de soignant.

A M. le Pr. MERLE, qui m'a accueilli dans son service.

A M. le Dr. DEBORD, qui a levé le voile ésotérique que représentaient pour moi Mathématiques et Sciences appliquées, me montrant combien elles sont indispensables à la compréhension de l'Homme et de la Maladie.

A M. COMTE, technicien, qui a su, avec patience, m'initier à la recherche.

A tous ceux qui, par leur don de sang, m'ont si gentiment permis de réaliser ce travail.

A M. VERNEUIL, Maître de conférence, avec qui je vais bientôt avoir le plaisir de travailler.

A M. VAUSSENAT, ingénieur, dont le dynamisme et la passion ont été autant de motivation pour mon travail.

A ma mère et à mon père dont le dévouement envers les patients restera toujours un exemple.

A mon épouse et à mes enfants, dont l'amour me donne, chaque jour, l'énergie et la foi nécessaires à l'accomplissement de ma vocation.

PLAN

PLAN

INTRODUCTION

L'ARYLESTERASE

I. NATURE ET STRUCTURE

I.1. Classification de l'enzyme

I.2. Substrats de l'enzyme

I.3. Structure

I.4. Métabolisme

II. PROPRIETES

II.1 Polymorphisme génétique de l'arylestérase

*II.1.a. Répartition trimodale de l'activité arylestérase
chez l'homme*

*II.1.b. Intérêt du calcul du rapport « activité paraoxonase
/ activité arylestérase »*

II.2. Autres propriétés

III. IMPLICATIONS PATHOLOGIQUES

III.1. Arylestérase et toxicologie

III.2. Arylestérase et athéromatose

III.3. Arylestérase et risque cardio-vasculaire

MATERIEL ET METHODES

I. SUJETS

II. METHODES

III. TECHNIQUES DE DOSAGES

III.1. *Dosage de l'activité arylestérase utilisant le phénylacétate
comme substrat*

III.2. *Dosage de l'activité arylestérase utilisant le 4-nitrophénylacétate
comme substrat*

III.3. *Dosage de l'activité arylestérase utilisant le paraoxon
comme substrat*

IV. TRAITEMENT STATISTIQUE

RESULTATS

I. ACTIVITE ARYLESTERASE DE LA POPULATION TEMOIN

II. ACTIVITE ARYLESTERASE DES MALADES INSUFFISANTS RENAU X CHRONIQUES NON DIALYSES, DIALYSES ET TRANSPLANTES

DISCUSSION

I. ARYLESTERASE ET VIEILLISSEMENT VASCULAIRE

II. ARYLESTERASE ET INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE

II.1 Athéromatose et insuffisance rénale chronique

II.2. Activité arylestérase au cours de l'insuffisance rénale chronique

II.3. Activité arylestérase au cours de l'insuffisance rénale chronique après transplantation rénale

CONCLUSION

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La maladie cardio-vasculaire est la première cause de mortalité lors de l'évolution de l'insuffisance rénale chronique.

Parmi les nombreux facteurs pouvant participer au développement de « l'athérosclérose accélérée » du patient urémique, les troubles du métabolisme lipidique, de par leur fréquence et leur importance, semblent aujourd'hui prépondérants.

De nombreux travaux actuels tentent de mettre en évidence les mécanismes physiopathologiques par lesquels se développent les dyslipidémies de l'insuffisant rénal chronique: ces dernières sont, en effet, multiples et variables selon le stade de l'insuffisance rénale et la néphropathie initiale. Elles sont, de plus, fortement influencées par le traitement (dialyse ou transplantation).

Récemment, des physiologistes s'intéressant particulièrement à l'athérogénèse, ont mis en évidence une activité enzymatique, présente à la surface des lipoprotéines de type HDL. Cette enzyme, connue depuis plus de 40 ans en toxicologie est nommée paraoxonase ou arylestérase. Elle agirait en diminuant la peroxydation des lipoprotéines de type LDL et son activité a été retrouvée abaissée chez les patients présentant des lésions d'athérosclérose importantes et précoces (diabétiques, coronariens).

Ce travail est le premier à s'intéresser à l'activité arylestérase sérique au cours de l'insuffisance rénale chronique et a pour but d'évaluer cette activité sérique au sein de cette population à haut risque cardio-vasculaire.

L'ARYLESTERASE

L'ARYLESTERASE

I. NATURE ET STRUCTURE

I.1. *Classification de l'enzyme*

Selon la classification d'ALDRIDGE et REINER [4,5,6], l'arylestérase (ou aryldialkylphosphatase, E.C.3.1.8.1) est une estérase du groupe A. Cela signifie que, contrairement aux estérases du groupe B telles que la cholinestérase, l'arylestérase *n'est pas inhibée* par les **composés organophosphorés** [74] comme le paraoxon qu'elle peut hydrolyser d'où son autre nom, plus communément utilisé, de **paraoxonase**.

I.2. *Substrats de l'enzyme*

- Le substrat physiologique de l'arylestérase n'est pas encore connu.
- Par contre, l'arylestérase hydrolyse de nombreux substrats de synthèse comme les carbamates [64,74] ou les composés organophosphorés dont le **paraoxon** ou diéthyl-4-nitrophénylphosphate [37,137,138], le chlorpyrifos oxon [44] et le diisopropylfluorophosphate [47]. L'arylestérase est également capable d'hydrolyser des esters de synthèse comme le **phénylacétate**, le **4-nitrophénylacétate** et le **2-naphtylacétate** [15,59].

- Des études récentes suggèrent que la paraoxonase hydrolyse les lipides biologiquement actifs contenus dans les lipoprotéines de basse densité (LDL) moyennement oxydées [130]. Cette propriété est à l'origine de cette étude.

I.3. Structure

- L'arylestérase est une **glycoprotéine** de poids moléculaire 45000 Da [46] contenant 354 acides aminés (schéma 1). L'électrophorèse de l'arylestérase humaine purifiée a mis en évidence quatre sites de glycosylation [45] et des variations de migration probablement liées à une teneur en sucres variable.

- Sa synthèse est codée par un gène qui existe sous deux formes alléliques nommées A et B. Ce gène est situé sur le chromosome 7 en position q21,22 [38,43,103].

L'expression de ce gène est à l'origine de la synthèse de **deux isozymes**, également nommées A et B [37,38] qui ne diffèrent que par l'acide aminé situé en position **191** de la protéine [77]:

◇ si l'acide aminé 191 est une Glutamine (Gln), l'isozyme formée est l'arylestérase de type A

◇ si l'acide aminé 191 est une Arginine (Arg), l'isozyme formée est l'arylestérase de type B.

Cette modification de structure est secondaire à la substitution d'une seule base nucléotidique (en un seul codon) en position 572 de l'ADN codant [76,77].

Longtemps l'on a cru que l'activité d'hydrolyse du paraoxon (dite paraoxonase) et

l'activité d'hydrolyse du phénylacétate (dite arylestérase) étaient liées à deux enzymes distinctes [37,81]. Grâce à la biologie moléculaire et au « clonage/décodage » de l'ADN codant pour l'enzyme [1,37,54], on a prouvé que la paraoxonase et l'arylestérase sont une seule et même enzyme qui existe dans le sérum humain sous la forme des deux isozymes A et B [77].

L'étude chimique et biologique de l'enzyme a montré que *l'isozyme B* a une activité d'hydrolyse du paraoxon *plus forte* et est plus sensible à la stimulation par une solution molaire de chlorure de sodium (NaCl) que l'isozyme A. Par contre, l'activité d'hydrolyse vis-à-vis du phénylacétate est identique pour les isozymes A et B. Le **paraoxon** est donc un **substrat discriminant** pour les deux isozymes. Nous verrons plus loin l'importance de cette propriété dans la caractérisation génétique phénotypique de l'enzyme.

Ces variations d'activité secondaires à une unique variation de structure de l'enzyme en position 191 incitent à supposer que le **site actif** de l'arylestérase vis-à-vis des deux substrats paraoxon et phénylacétate se situe autour de l'acide aminé 191 [2,60].

- L'arylestérase présente un second site variable en position 54 qui ne semble pas avoir d'influence sur l'activité d'hydrolyse paraoxonase/arylestérase (schéma 1) [77].
- L'arylestérase est particulièrement riche en acides aminés hydrophobes : son extrémité N-terminale renferme en effet trois Valines (Val) et deux Leucines (Leu) (cf. schéma 2) [77]. Grâce à cette composante hydrophobe, l'enzyme sérique interagit très étroitement et sans liaison covalente avec les lipoprotéines circulantes de haute densité (HDL) [24,80].

Il est également intéressant de noter que la séquence d'acides aminés de l'extrémité N-terminale est typique des séquences retrouvées dans les protéines sécrétées [45].

- L'arylestérase contient trois Cystéines :

◇ deux sont situées à chacune des extrémités de la protéine et sont liées entre elles par un pont disulfure.

la troisième est située en position 283, au centre de la molécule, et pourrait donc représenter le **site actif biologique** de l'enzyme (schéma 1) [77].

I.4. Métabolisme

Le métabolisme de l'arylestérase n'a jamais été étudié.

L'ADN codant de l'arylestérase a été mis en évidence dans les cellules hépatiques [54] et ne s'exprimerait pas dans les cellules rénales.

II. PROPRIETES

II.1 Polymorphisme génétique de l'arylestérase

II.1.a. Répartition trimodale de l'activité arylestérase chez l'homme

- Dans les populations caucasiennes, l'activité arylestérase vis-à-vis du paraoxon se répartit en trois groupes [37,48], définis par trois phénotypes:

◇ Phénotype A (génotype homozygote AA) qui est le plus répandu (47% de la population totale) et dont l'activité d'hydrolyse du paraoxon est basse (inférieure à 200 nmol.min⁻¹.ml⁻¹).

◇ Phénotype AB (génotype hétérozygote AB) qui est largement répandu (43% de la population totale) et dont l'activité d'hydrolyse du paraoxon est intermédiaire (comprise entre 200 et 600 nmol. min⁻¹. ml⁻¹).

◇ Phénotype B (génotype homozygote BB) qui est le moins répandu (10% de la population totale) et dont l'activité d'hydrolyse du paraoxon est élevée (supérieure à 600 nmol.min⁻¹. ml⁻¹).

- L'étude du mode de transmission du caractère « activité arylestérase » au sein de mêmes familles, a montré une **transmission autosomique codominante** conforme à la loi de Mendel [37].

- Cette répartition phénotypique est variable selon la race et l'ethnie [26]. Dans les populations orientales et aborigènes, par exemple, les phénotypes AB et B prédominent [2,43,49,75,103]. Ces populations présentent donc, des activités enzymatiques arylestérasiques plus élevées que celles des populations caucasiennes.

II.1.b. Intérêt du calcul du rapport «activité Paraoxonase/activité Arylestérase»

- Comme cela a été précisé dans les chapitres précédents, la répartition phénotypique de l'activité arylestérase a été découverte grâce à plusieurs études génétiques qui ont parfaitement caractérisé chaque isozyme et son ADN codant [54,121].

Ces méthodes « directes » restent lourdes et coûteuses et ne peuvent donc pas être utilisées en pratique courante dans tous les laboratoires.

- Eckerson et coll. ont eu l'idée de comparer l'activité enzymatique vis-à-vis du paraoxon et l'activité enzymatique vis-à-vis du phénylacétate pour chaque sujet étudié, en calculant le rapport de ces deux activités. Cela consiste donc à comparer une activité d'hydrolyse d'un substrat spécifique de l'isozyme B de l'arylestérase (le paraoxon) à une activité d'hydrolyse d'un substrat non spécifique d'un isozyme de l'arylestérase (le phénylacétate). Une répartition trimodale a alors été obtenue. Cette répartition s'est révélée être la même qu'avec la méthode génétique et ce, pour chaque sujet [37].

Le rapport $R = \frac{\text{Activité (Paraoxon)}.1000}{\text{Activité (Phénylacétate)}}$ (les activités enzymatiques étant

exprimées en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) permet donc d'obtenir le phénotype du sujet de façon simple et aussi fiable que l'étude directe du gène.

Ainsi, Eckerson a montré qu'un rapport R inférieur à 1,7 définit le groupe homozygote AA, un rapport R compris entre 1,7 et 6 définit le groupe hétérozygote AB, un rapport R supérieur à 6 définit le groupe homozygote BB.

Ces valeurs limites sont toutefois fonction de la technique utilisée (cf. résultats).

II.2. *Autres propriétés*

- L'arylestérase nécessite impérativement du **calcium** pour être active.

Elle est donc inhibée par les agents chélateurs du calcium tels que l'EDTA [40].

- L'arylestérase est inhibée par les réactifs des groupements thiols tels que les composés organomercuriels (p-hydroxy-mercuribenzoate) [23].

- Les inhibitions pharmacologiques de l'arylestérase n'ont jamais été étudiées.

- L'arylestérase est fortement stimulable par les solutions molaires de chlorure de sodium (NaCl) et de sels de potassium (KCl). Comme cela a déjà été précisé, cette stimulation est plus forte pour le phénotype B, intermédiaire pour le phénotype AB et plus faible pour le phénotype A [37].

Les solutions molaires de NaCl sont donc utilisées dans les techniques de dosage de l'activité arylestérase.

- L'hydrolyse du paraoxon est inhibée par le phénylacétate, probablement du fait d'un site actif enzymatique commun pour les deux substrats.

Cette propriété a été utilisée afin de mettre au point une autre méthode de « phénotypage » de l'enzyme [51].

- In vitro, l'arylestérase est inhibée par la chaleur [120]. Il est donc nécessaire de conserver les sérums des sujets dont on veut mesurer l'activité arylestérase au froid.

III. IMPLICATIONS PATHOLOGIQUES

III.1. *Arylestérase et toxicologie*

L'arylestérase a été découverte dans les années 50, lors de l'étude de l'intoxication chronique par les composés organophosphorés, principaux constituants des insecticides et de certains gaz de combat [82]. L'un des plus connus de ces composés est le *parathion*. Après son inhalation, le parathion est métabolisé, dans l'organisme, en son métabolite actif le paraoxon qui, en inhibant la cholinestérase, provoque une accumulation d'acétyl-choline à l'origine de graves troubles neurologiques (hyperactivité du système nerveux parasymphatique voire paralysies).

A l'époque, les toxicologues ont été frappés par la *différence de tolérance au parathion* qui existait au sein de la population générale. Certains individus semblaient plus « résistants » que d'autres. La découverte du mécanisme physiopathologique de cette intoxication rapportera cette différence à l'existence d'une activité arylestérase plus ou moins intense. En effet, l'arylestérase catalyse, dans l'organisme, l'hydrolyse du paraoxon en deux composés peu toxiques, le p-nitrophénol et l'acide diethyl-phosphorique (cf. schéma 3) [5,69,71].

III.2. *Arylestérase et athéromatose*

- En 1961, Uriel rapporte pour la première fois la localisation de l'arylestérase sur les lipoprotéines de type HDL [127]. Cette propriété n'avait alors pas suscité d'interrogation. Personne ne suspectait un rôle potentiel de l'enzyme dans le métabolisme lipidique. Seul son

rôle détoxifiant au cours de l'intoxication chronique au parathion était étudié.

Les rapports des HDL avec l'arylestérase ont été récemment étudiés de façon très précise en biologie moléculaire [24,66] : les HDL entretiennent avec l'arylestérase des liaisons non covalentes très étroites, en particulier une sous-population de lipoprotéines HDL qui contiennent une apoprotéine de découverte récente, **l'apo J ou clusterine**. Cette interaction est spécifique de ce type d'apoprotéine.

L'apo J a été retrouvée dans les lésions d'artériosclérose [65] et serait un facteur protecteur membranaire [24]. Ainsi a été suspecté un rôle des HDL de type 3 dans la prévention des lésions ou la réparation des membranes des cellules endothéliales ou des lipoprotéines endommagées.

- Dans les années 90, plusieurs équipes étudiant la physiopathologie de l'athéromatose proposent une *hypothèse oxydative*.

Selon Whitztum [133,134], l'oxydation des lipoprotéines athérogènes de type LDL circulantes initie la phagocytose de ces LDL modifiées, par les macrophages de la paroi artérielle. Ces derniers en se « surchargeant » en lipides se transforment en cellules spumeuses qui sont à l'origine de la formation de la strie lipidique puis de la plaque d'athérome par agrégation de plusieurs cellules spumeuses (cf. schéma 4) [133].

Plusieurs équipes ont montré que les LDL oxydées ne peuvent plus se fixer sur leurs récepteurs habituels mais se lient aux macrophages sur des récepteurs particuliers, nommés oxLDL, du fait de modifications épitopiques de l'apoB lors de l'oxydation [39, 70,108,124, 126].

L'hypothèse oxydative a été soutenue par d'autres équipes qui ont montré que le taux plasmatique de lipides peroxydés est augmenté chez des patients à haut risque vasculaire,

coronariens [79] ou diabétiques [92], et diminué après administration de vitamine E antioxydante [125] ou de Probucoïl [99].

D'autres équipes [18,104] ont noté que les LDL de ces patients à haut risque vasculaire présentent une susceptibilité plus grande à la peroxydation que les LDL des sujets sans facteur de risque. L'équipe de Salonen [115] a aussi montré une augmentation des autoanticorps antiLDL oxydées chez les coronariens et Steinberg la présence de LDL oxydées au sein même des lésions d'athérosclérose [135].

Dans le même temps, Klimov et coll. [67,68] et Parthasarathy et coll. [100] suggèrent que les lipoprotéines HDL exercent leur rôle anti-athérogène par le biais d'un effet antioxydant sur les lipoprotéines LDL alors que les travaux antérieurs attribuaient ce rôle au transport inverse (des Tissus vers le foie) du cholestérol en excès par les HDL.

En effet, ces deux équipes (ainsi que celle de Mackness [83-88,131]) ont montré que, *in vitro*, les HDL avaient un effet protecteur contre la peroxydation des LDL : l'incubation de LDL dans une solution cuivrique avec des HDL diminue la peroxydation des LDL de 50% par rapport à la même solution sans HDL.

Klimov montrera, par la suite, que les HDL de type 3 exercent, *in vivo*, un effet antioxydant sur les LDL d'animaux rendus hypercholestérolémiques et que le taux plasmatique de HDL est inversement corrélé aux taux de lipoperoxydes produits [68].

- De nombreuses hypothèses concernant le mécanisme d'action par lequel les HDL exercent cet effet antioxydant ont été émises :

- ◊ épuration en ions superoxydes [33] ou chélation des ions métalliques catalyseurs de l'oxydation [72].

◇ épuration des LDL par les HDL des produits de la peroxydation lipidique [100].

- Mackness a par ailleurs, montré qu'il n'y a aucune modification de la teneur en lipoperoxydes au sein des HDL.

La *participation d'une activité enzymatique* dans ces mécanismes a alors été évoquée (d'autant plus facilement que d'autres travaux ont montré la participation d'enzymes telles que la cholestérol-estérase dans la régulation des dépôts de cholestérol au niveau du glomérule chez le rat [107]). Parmi les enzymes présentes à la surface des HDL, l'arylestérase a semblé avoir une activité d'hydrolyse in vitro sur les produits de la lipoperoxydation [88,114].

Actuellement, de nombreuses équipes dans le monde étudient l'activité arylestérase et tentent de découvrir son rôle dans le métabolisme lipidique et dans la physiopathologie de l'athéromatose.

III.3. Arylestérase et risque cardio-vasculaire

Devant les découvertes des propriétés antioxydantes de l'arylestérase vis-à-vis des LDL, plusieurs équipes ont été tentées de parler de nouveau *facteur de risque cardio-vasculaire*: une faible activité pouvant être interprétée comme une diminution de la protection anti-athérogène des HDL sur les LDL.

Ainsi, selon Furlong et coll.[66], le rapport de l'apoprotéine J sérique sur l'activité arylestérase sérique vis-à-vis du paraoxon, serait un bon indicateur des lésions d'athéromatose du sujet.

Hernandez et Coll. [57] ont même tenté de montrer une relation entre l'activité arylestérase présente dans le fluide péricardique et l'importance des lésions vasculaires coronariennes. Cette activité semblait plus basse chez les patients coronariens par rapport aux sujets témoins mais de façon peu significative.

D'autres équipes ont cherché à mettre en évidence un phénotype de l'arylestérase « à risque »:

Mackness et Coll. [83] ont montré que l'activité arylestérase est abaissée au sein des populations de coronariens, diabétiques ou atteints d'hypercholestérolémie familiale. Ils n'ont pas recherché de modifications de la répartition phénotypique.

Plus récemment, deux équipes, l'une franco-suisse [113], l'autre américaine [119] ont tenté de mettre en évidence un phénotype de l'arylestérase « à risque coronarien ».

La première étude de Ruiz et Coll. s'est intéressée à une population de diabétiques non insulino-dépendants (diabète de type 2) et a comparé le phénotype de chaque patient et l'existence d'une insuffisance coronarienne (infarctus du myocarde confirmé ou lésions à la coronarographie). Cette étude a mis en évidence une association significative du phénotype B homozygote avec la maladie coronarienne. Cette découverte semble donc contredire celles de Mackness puisqu'elle attribue un risque de maladie cardio-vasculaire plus élevé pour les patients à forte activité enzymatique. Cependant, cette étude rétrospective étudie l'activité arylestérase alors que la maladie coronarienne est plus ou moins ancienne et l'on peut supposer que tous les sujets ayant présenté une atteinte coronarienne grave et précoce sont morts et donc non recrutés. De plus, on note une différence significative ($p < 0,001$) de l'âge des patients coronariens (63,0 ans d'âge moyen) par rapport aux patients non coronariens plus jeunes (59,5 ans).

La seconde étude de Serrato et Marian [119] a comparé une population de coronariens à

la population générale. Les résultats semblent également montrer une plus forte représentation du phénotype B dans le groupe de malades (18%) par rapport au groupe témoin (11%).

Il est également possible que l'activité arylestérase/paraoxonase soit globalement diminuée chez les coronariens, même si la proportion de phénotype B est augmentée. Malheureusement, les données publiées ne permettent pas de calculer cette activité dans les conditions utilisées par les auteurs, de sorte qu'il n'est pas possible de comparer leurs résultats avec les nôtres.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I.SUJETS

- L'étude a porté sur quatre groupes de sujets:

◇ *195 sujets témoins* (120 femmes, 75 hommes) d'âge moyen de $50,5 \pm 24,5$ ans, avec des extrêmes de 17 à 105 ans. 97 sujets étaient âgés de moins de 65 ans (moyenne d'âge 34,7 ans) et n'avaient pas de pathologie connue ni de traitement. Les autres sujets, âgés de plus de 65 ans, ont été recrutés à la consultation de médecine gériatrique. Aucun d'entre eux n'avait d'hyperlipémie familiale, de diabète ni d'antécédent d'infarctus du myocarde. 8 sujets âgés de plus de 65 ans ne prenaient aucun traitement.

◇ *47 insuffisants rénaux chroniques non dialysés* (20 femmes, 27 hommes), d'âge moyen de $62,6 \pm 17,6$ ans, avec des extrêmes de 17 à 86 ans.

◇ *104 hémodialysés* (40 femmes, 64 hommes), d'âge moyen de $58,7 \pm 15,2$ ans, avec des extrêmes de 20 à 83 ans.

◇ *22 dialysés péritonéaux* (10 femmes, 12 hommes), dont l'âge moyen était de $46,5 \pm 11,9$ ans, avec des extrêmes de 16 à 68 ans.

◇ *132 transplantés rénaux* (62 femmes, 70 hommes), dont l'âge moyen était de $63,0 \pm 18,7$ ans, avec des extrêmes de 23 à 85 ans.

Tous les sujets étaient de race caucasienne et résidents du Limousin. Aucune parenté entre individus n'a été notée.

- Lorsque les sujets prenaient un traitement de façon aiguë ou chronique, les médicaments ont été relevés.

- La fonction rénale résiduelle de chaque sujet a également été notée après calcul de la clairance de la créatinine selon la formule de Cockcroft.

II. METHODES

- Les sérums (5 ml de sang veineux) ont été prélevés sur tube sec le matin, le sujet étant à jeun, puis conservés au froid et dosés le jour même.

- L'activité sérique de l'arylestérase a été mesurée par *spectrophotométrie* à l'aide de trois esters de synthèse, le phénylacétate, le 4-nitrophénylacétate et le paraoxon. Tous les réactifs utilisés provenaient de Sigma. Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible (UV 1205 Shimadzu, France) équipé de cuves thermostatées par effet Peltier.

- Les activités enzymatiques sont exprimées en unités internationales (U) par ml de sérum. Une U correspond à la quantité d'enzyme qui libère 1 μmol de produit (p-nitrophénol) par minute, dans les conditions données de pH et de température. L'hydrolyse spontanée du substrat a toujours été mesurée et prise en compte dans les calculs.

- La répartition phénotypique a été déterminée à l'aide du calcul du rapport

$$R = \frac{\text{Activité (Paraoxon)}.1000}{\text{Activité (Phénylacétate)}} \text{ défini par Eckerson.}$$

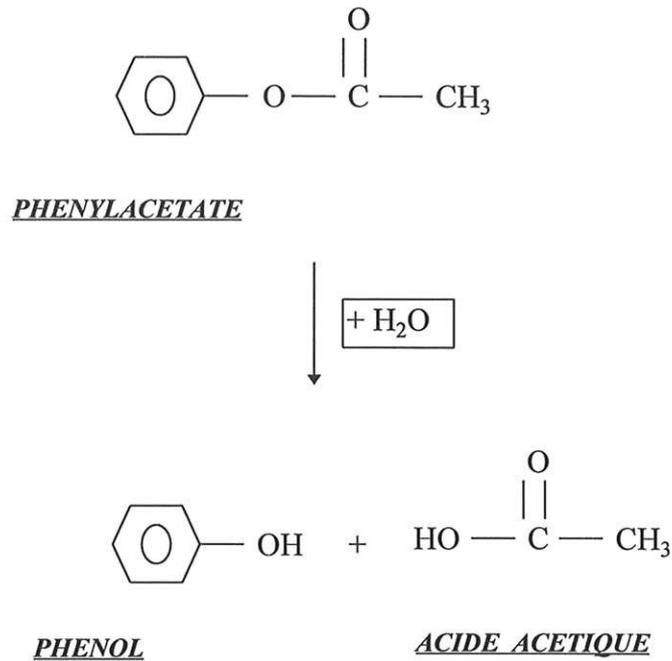
- L'analyse de la répartition phénotypique a été effectuée:
 - ◇ chez les sujets témoins âgés de plus de 65 ans,
 - ◇ chez les sujets témoins âgés de moins de 65 ans,
 - ◇ sur la population témoin totale,
 - ◇ sur la population des insuffisants rénaux chroniques non dialysés,
 - ◇ sur la population hémodialysée,
 - ◇ sur la population des dialysés péritonéaux.

III. TECHNIQUES DE DOSAGES

III.1. Dosage de l'activité arylestérase utilisant le phénylacétate comme substrat

- L'activité a été mesurée selon la méthode décrite par Eckerson et coll. [38].

- Comme décrit par la réaction suivante, l'hydrolyse du phénylacétate aboutit à la formation de phénol:



Le phénol ayant la propriété d'absorber à 270 nm à pH 8, la vitesse initiale d'hydrolyse du phénylacétate (exprimée en U/ml) a été calculée à partir de l'augmentation d'absorbance, à la longueur d'onde de 270 nm (le coefficient d'extinction du phénol étant de $1306 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) selon l'équation (I) suivante:

$$V_0 = (\Delta A \cdot 10^3 \cdot V_f \cdot d) / (\epsilon \cdot V_i) \quad \text{(I)}$$

avec ΔA = variation d'absorbance par minute

d = dilution

V_f = volume du mélange final

V_i = volume du mélange initial

ϵ = coefficient d'extinction

- Le mélange initial (2ml) contenait:
 - ◊ 1,25 mM de phénylacétate
 - ◊ 0,9 mM de Chlorure de Calcium (CaCl_2)
 - ◊ une solution tampon de Tris(hydroxyméthyl)aminométhane / HCl à 9,0 mM , pH=8,00 à 25°C.

- Le mélange initial était préincubé à 25 °C pendant une minute.

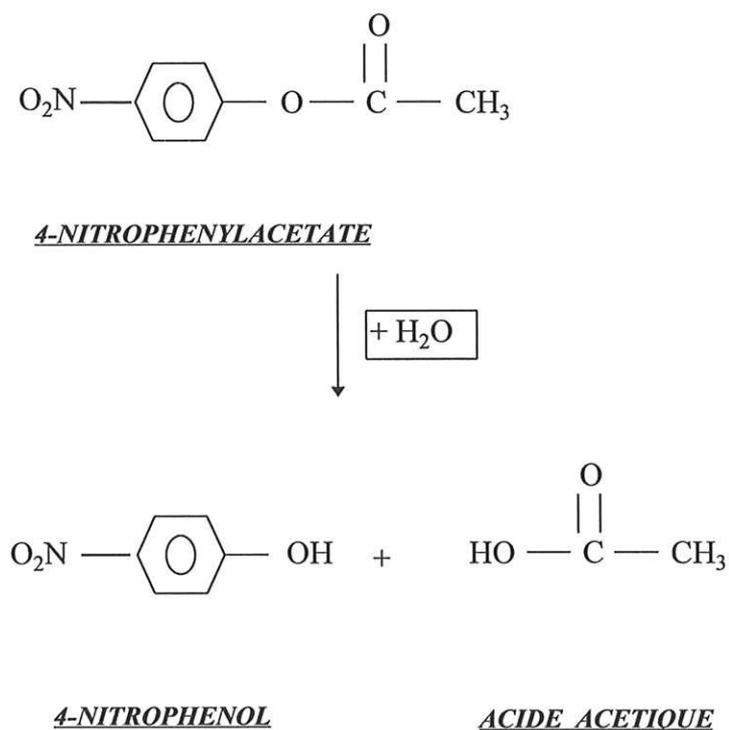
- La réaction était initiée par l'addition de 500 μl de sérum prédilué au 1/100 dans la solution tampon.

- Le temps de réaction était de 30 secondes.

- Les courbes d'absorbance étaient linéaires pendant au moins une minute.

III.2. Dosage de l'activité arylestérase utilisant le 4-nitrophénylacétate comme substrat

- L'activité a été mesurée selon la méthode décrite par Haagen et Brock [51].
- Comme décrit par la réaction suivante, l'hydrolyse du 4-nitrophénylacétate aboutit à la formation de 4-nitrophénol :



Le 4-nitrophénol ayant la propriété d'absorber à 402 nm à pH 7,4, la vitesse initiale d'hydrolyse du 4-nitrophénylacétate (exprimée en U/ml) a été calculée à partir de l'augmentation d'absorbance, à la longueur d'onde de 402 nm (le coefficient d'extinction du 4-nitrophénol étant de $14000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), selon l'équation (I).

- Le mélange initial (2ml) contenait:
 - ◊ 0,625 mM de 4-nitrophénylacétate,
 - ◊ 2,5% de méthanol,
 - ◊ 1,0 mM de CaCl₂
 - ◊ 1,0 M de NaCl
 - ◊ une solution tampon de Triethanolamine/HCl à 25 mM, pH=7,4 à 25°C.

- Le mélange initial était préincubé à 25 °C pendant une minute.

- La réaction était initiée par l'addition de 250 µl de sérum prédilué au 1/20 dans la solution tampon.

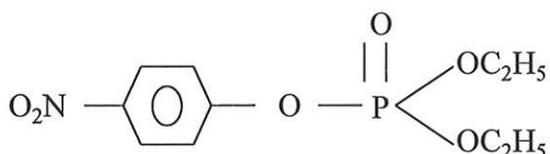
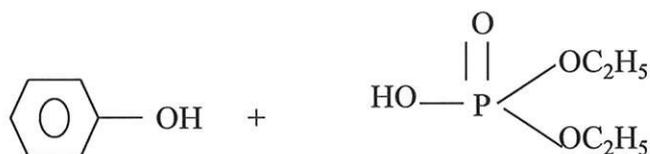
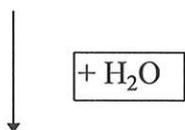
- Le temps de réaction était d'une minute.

- Les courbes d'absorbance étaient linéaires pendant au moins une minute.

III.3. Dosage de l'activité arylestérase utilisant le paraoxon comme substrat

- L'activité a été mesurée selon la méthode décrite par Eckerson et coll. légèrement modifiée [38].

- Comme décrit par la réaction suivante, l'hydrolyse du paraoxon aboutit à la formation de 4-nitrophénol :

**PARAOXON****4-NITROPHENOL****ACIDE DIETHYLPHOSPHORIQUE**

• A pH=10,5, le 4-nitrophénol ayant la propriété d'absorber à 412 nm, la vitesse initiale d'hydrolyse du paraoxon (exprimée en U/ml) a été calculée à partir de l'augmentation d'absorbance, à la longueur d'onde de 412 nm (le coefficient d'extinction du 4-nitrophénol étant alors de 17000 l.mol⁻¹.cm⁻¹), selon l'équation (I).

• Le mélange initial (2 ml) contenait:

- ◇ 1,25 mM de paraoxon
- ◇ 1,0 M de NaCl
- ◇ 1,0 mM de CaCl₂
- ◇ une solution tampon de glycine à 50 mM , pH=10,05 à 25°C.

• Le mélange initial était préincubé à 25 °C pendant une minute.

- La réaction était initiée par l'addition de 500 μ l de sérum prédilué au 2/5 dans la solution tampon.

- Le temps de réaction était d'une minute.

- Les courbes d'absorbance étaient linéaires pendant au moins une minute.

IV. TRAITEMENT STATISTIQUE

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel **S-plus** [123] en utilisant:

- ◇ le *test de χ^2* pour comparer les répartitions phénotypiques

- ◇ le *test de Kolmogorov-Smirnov* pour tester la normalité des distributions:

une transformation logarithmique a été nécessaire afin d'obtenir la distribution la plus proche possible de la loi normale (courbe de Gauss).

- ◇ la *régression linéaire multiple (calcul des coefficients de régression)* avec sélection automatique des variables les plus significatives pour tester l'influence de l'âge, du sexe et de la pathologie ainsi que l'interaction entre le facteur Age et la pathologie (ceci afin de savoir si l'influence de l'âge dépend de la pathologie) :

Dans ce dernier cas, le modèle utilisé était le suivant:

$$\log(U/ml) = a_0 + a_1 \cdot \text{Sexe} + a_2 \cdot \text{Age} + a_3 \cdot \text{IR} + a_4 \cdot \text{HD} + a_5 \cdot \text{DP} + a_6 \cdot \text{TR} + b_3 \cdot \text{Age} \cdot \text{IR} + b_4 \cdot \text{Age} \cdot \text{HD} + b_5 \cdot \text{Age} \cdot \text{DP} + b_6 \cdot \text{Age} \cdot \text{TR}$$

(avec **Sexe** codé 1 pour les sujets masculins ou 0 pour les sujets féminins, **IR**: Insuffisant rénal chronique non dialysé codé 1 ou 0, **HD**: Hémodialysé codé 1 ou 0, **DP**: Dialysé Péritonéal codé 1 ou 0, **TR**: Transplanté Rénal codé 1 ou 0).

Ce modèle a été appliqué aux 500 patients (incluant les 195 sujets *témoins* pour lesquels $IR=HD=DP=TR=0$).

Cette méthode statistique a été choisie du fait des petits effectifs du groupe des insuffisants rénaux chroniques non dialysés ($n = 47$) et du groupe des dialysés péritonéaux ($n = 22$) : il est en effet nécessaire de grouper le maximum de sujets afin d'augmenter la puissance des tests statistiques et donc afin de mieux déceler les faibles différences entre groupes.

⇒ La validité de chaque équation a été appréciée d'après:

- s, l'écart-type résiduel
- r^2 , le rapport des variances expliquée et totale
- F, le rapport des variances expliquée et résiduelle.

⇒ Une équation significative est caractérisée par un faible écart-type, un taux de variance expliquée proche de 100% et un rapport des variances élevé.

⇒ L'influence de chaque paramètre peut être évaluée par la valeur du rapport du coefficient de régression à son écart-type, qui définit une variable t de Student.

⇒ l'obtention d'un coefficient de régression a_i significatif pour l'un des facteurs IR, HD, DP ou TR indique que l'activité arylestérase est modifiée dans l'état correspondant (IR, HD, DP ou TR).

⇒ l'obtention d'un coefficient de régression significatif pour un facteur du type (**Age.IR**) indique que l'influence de l'âge sur l'activité arylestérase est différente dans l'état considéré (ici l'insuffisance rénale) par rapport aux sujets normaux.

Après calcul des coefficients a_i sur l'ensemble des sujets et, après avoir constaté que l'influence du sexe est négligeable (coefficient a_1 non significativement différent de zéro) (cf. résultats), ce modèle nous a permis de calculer les droites de régression propres à chaque catégorie de patients. Par exemple, la droite de régression de l'activité arylestérase avec l'âge chez les hémodialysés ($HD=1$, $IR=DP=TR=0$, le facteur **sexe étant** négligeable donc $a_1=0$) est caractérisée par l'équation suivante:

$$\log(U/ml) = a + b.Age \quad \text{avec } a = a_0+a_4 \text{ et } b = a_2+a_7$$

Ces relations ont été utilisées pour calculer les résultats des tableaux III et IV et de la figure 3.

◊ *la régression linéaire simple* a été utilisée dans le cas des sujets témoins dont l'effectif était suffisant pour calculer directement les droites de régression pour chaque phénotype (sous la forme $\log(U/ml) = a + b.Age$).

RESULTATS

RESULTATS

I. ACTIVITE ARYLESTERASE DE LA POPULATION TEMOIN

- L'activité arylestérase varie selon le substrat, elle est forte avec le phénylacétate (450 fois celle vis-à-vis du paraoxon), modérée avec le 4-nitrophénylacétate et faible avec le paraoxon (tableau I). Ces résultats confirment des résultats de travaux antérieurs [37].

- La dispersion interindividuelle est importante quel que soit le substrat utilisé (et ce de façon plus marquée pour le paraoxon) (tableau I). L'activité arylestérase est variable d'un individu à l'autre non seulement au sein de la population globale (de 10 à 40 fois) du fait de la variation liée au phénotype mais aussi au sein de chaque groupe phénotypique (tableau II).

- La comparaison de la moyenne et de la médiane montre un léger écart à la loi normale pour le paraoxon et le 4-nitrophénylacétate (tableau I). En revanche, si l'on considère le logarithme des activités, le test de Kolmogorov-Smirnov ne montre plus de différence significative par rapport à la loi normale pour tous les substrats. Cela justifie l'utilisation du logarithme des activités arylestérase dans l'étude de corrélation.

- Les activités arylestérase vis-à-vis de chaque substrat sont corrélées de façon significative à l'âge des sujets dans l'ensemble de la population témoin (figure 1).

Les relations activité/âge obtenues par régression linéaire simple sont les suivantes:

- * avec le dosage utilisant le phénylacétate comme substrat:

$$y = -0,0027x + 2,1071 \text{ où } y = \log \text{ activité en U/ ml et } x = \text{âge}$$

$$(r = -0,45; p < 10^{-4})$$

- * avec le dosage utilisant le paraoxon :

$$y = -0,0046x - 0,5421 \text{ où } y = \log \text{ activité en U/ ml et } x = \text{âge}$$

$$(r = -0,32; p < 10^{-4})$$

- * avec le dosage utilisant le 4-nitrophénylacétate :

$$y = -0,0033x + 0,3903 \text{ où } y = \log \text{ activité en U/ ml et } x = \text{âge}$$

$$(r = -0,57; p < 10^{-4})$$

Les pentes des trois droites de régression en fonction du substrat ne sont pas significativement différentes. Les activités arylestérase diminuent donc au fur et à mesure que l'âge augmente.

Les valeurs faibles du coefficient de détermination r^2 (comprises entre 0,1 et 0,3) suggèrent que l'âge n'explique qu'une faible partie de la diminution de l'activité arylestérase entre individus sains.

- Il n'a pas été constaté d'influence significative du sexe, ni des médicaments pris par certains des sujets âgés de plus de 65 ans.

- Dans la population témoin, la répartition des phénotypes (figure 2) calculée par les rapports d'activité vis-à-vis du paraoxon et du phénylacétate (formule d'Eckerson) est la suivante:

- 46% de phénotype A
- 42% de phénotype AB
- 12% de phénotype B

Les répartitions des phénotypes pour les groupes de population d'âge inférieur à 65 ans ou supérieur à 65 ans ne diffèrent pas non plus de cette répartition.

- L'étude de l'activité arylestérase vis-à-vis de chaque substrat au sein des groupes A et AB (Tableau III) a confirmé la corrélation significative avec l'âge.

Ceci est également constaté au sein du groupe B pour le 4-nitrophénylacétate.

Par contre, pour le phénylacétate et le paraoxon, dans le groupe B, l'absence de baisse significative avec l'âge pourrait s'expliquer par le faible nombre de sujets (n=25) dans ce groupe.

- Avec le paraoxon, la pente de la droite de régression du groupe A (-0,0064) est significativement supérieure à celle du groupe AB (-0,0028) ($p < 0,01$), alors qu'il n'y a pas de différence significative avec le phénylacétate (-0,0031 pour A contre -0,0025 pour AB) ou le 4-nitrophénylacétate (-0,0036 pour A contre -0,0030 pour AB). Ainsi, selon le substrat,

l'influence de l'âge en fonction du phénotype semble donc varier: en effet, l'âge semble beaucoup plus diminuer l'activité enzymatique dans la population du phénotype A par rapport au phénotype AB lorsque le paraoxon est utilisé, alors qu'aucune différence significative n'est notée avec le phénylacétate ou le 4-nitrophénylacétate.

II. ACTIVITE ARYLESTERASE DES MALADES INSUFFISANTS RENAUX CHRONIQUES NON DIALYSES, DIALYSES ET TRANSPLANTES

II.1. Malades insuffisants rénaux chroniques non dialysés et dialysés

- Les résultats obtenus avec les trois substrats sont représentés dans le tableau I :

- ◇ Comme pour les sujets témoins, l'activité arylestérase varie selon le substrat : forte vis-à-vis du phénylacétate, modérée vis-à-vis du 4-nitrophénylacétate et faible vis-à-vis du paraoxon.

- ◇ La dispersion interindividuelle au sein de chaque groupe de malades (non dialysés, hémodialysés et dialysés péritonéaux) reste importante quel que soit le substrat comme pour les sujets témoins.

- ◇ La comparaison de la moyenne et de la médiane montre un léger écart à la loi normale pour les trois substrats dans chaque groupe. Ceci justifie donc l'utilisation du logarithme des activités dans l'étude de corrélation, comme pour le groupe témoin.

- L'analyse statistique par régression linéaire multiple sur l'ensemble des sujets a montré que:

- ◊ L'activité arylestérase est corrélée de façon significative avec l'âge (tableau IV), (figure 3). On note en effet une baisse d'activité avec le vieillissement dans chaque groupe (pente de la droite de régression négative), à l'exception des hémodialysés et ce dans les cas particuliers du 4-nitrophénylacétate et du paraoxon où l'activité arylestérase est pratiquement stable (la pente de la droite de régression est même légèrement positive).

- ◊ Chez les sujets insuffisants rénaux, l'activité arylestérase vis-à-vis du 4-nitrophénylacétate est abaissée de façon significative (tableau V) par rapport au groupe témoin, avec une diminution plus faible pour les insuffisants rénaux chroniques non dialysés ($p < 0,05$) et très forte pour les hémodialysés ($p < 0,01$) qui reste très légèrement supérieure à celle des dialysés péritonéaux ($p < 0,01$).

- ◊ Lorsque le paraoxon est le substrat, la variation de l'activité arylestérase n'est pas significative pour les insuffisants rénaux non dialysés mais fortement significative pour les hémodialysés ($p < 0,01$) et les dialysés péritonéaux ($p < 0,05$). Pour le phénylacétate, seul le groupe des hémodialysés a une activité abaissée par rapport au groupe témoin de façon significative ($p < 0,01$) (tableau V).

- ◊ L'activité arylestérase est indépendante du sexe, comme cela est observé dans le groupe témoin.

- La répartition des phénotypes au sein de l'ensemble du groupe des insuffisants rénaux non dialysés et dialysés est comparable à celle des sujets témoins et à la répartition phénotypique de la littérature (test de χ^2) [37] avec 49,7 % d'individus « A », 49,3 % d'individus « AB » et 6,4 % d'individus « B » selon les calculs effectués à partir de la formule d'Eckerson (figure 4).

II.2. Malades transplantés rénaux

- Les résultats obtenus avec les trois substrats sont représentés dans le tableau I :
 - ◇ Comme pour les sujets témoins, l'activité arylestérase varie selon le substrat : forte vis-à-vis du phénylacétate, modérée vis-à-vis du 4-nitrophénylacétate et faible vis-à-vis du paraoxon.
 - ◇ La dispersion interindividuelle au sein du groupe des transplantés reste importante quel que soit le substrat comme pour les sujets témoins.
 - ◇ La comparaison de la moyenne et de la médiane montre un léger écart à la loi normale pour les trois substrats. Ceci justifie donc l'utilisation du logarithme des activités dans l'étude de corrélation comme pour le groupe témoin.
 - ◇ L'analyse statistique par régression linéaire multiple sur l'ensemble des sujets a montré que:
 - ◇ Contrairement aux autres insuffisants rénaux chroniques, l'activité arylestérase vis-à-vis du 4-nitrophénylacétate n'est pas abaissée de façon significative (tableau IV) par rapport au groupe témoin.

⇒ En effet, la droite de régression obtenue par régression multiple dans le cas du 4-nitrophénylacétate, a la même équation que celle des sujets témoins :

$$y = - 0,0033x + 0,3903 \text{ avec } y = \log \text{ activité arylestérase et } x = \text{âge}$$

◇ L'absence d'abaissement significatif de l'activité arylestérase chez les malades transplantés par rapport aux sujets témoins a été également observée avec le paraoxon et le phénylacétate.

◇ L'activité arylestérase est corrélée de façon significative avec l'âge (tableau IV, figure 3). On note en effet une baisse d'activité avec le vieillissement des patients transplantés (pente de la droite de régression négative, droite de régression des transplantés confondue avec celle des sujets témoins).

◇ L'activité arylestérase est indépendante du sexe, comme cela est observé dans le groupe témoin.

- La répartition des phénotypes au sein du groupe des transplantés est comparable à celle des sujets témoins et à la répartition phénotypique de la littérature (test de χ^2) [37] avec 49,7 % d'individus « A », 49,3 % d'individus « AB » et 6,4 % d'individus « B » selon les calculs effectués à partir de la formule d'Eckerson (figure 5).

DISCUSSION

DISCUSSION

I. ARYLESTERASE ET VIEILLISSEMENT VASCULAIRE

L'activité arylestérase sérique mesurée chez 195 sujets âgés de 17 à 105 ans diminue de façon très significative avec l'âge.

Pour la première fois, une influence du vieillissement sur cette activité enzymatique est notée. D'autres études dont celle de Mackness et Coll. [83] n'avaient pas noté de modification d'activité en fonction de l'âge. Ces études portaient sur des effectifs de population non négligeables (environ 80 patients hypercholestérolémiques, 40 diabétiques insulino-dépendants et 80 sujets « contrôle ») mais ayant des répartitions d'âge restreintes (âges extrêmes de 49 à 73 ans avec une moyenne à 51 ans). L'étude actuelle est la première à faire référence à un nombre important d'individus avec une large répartition d'âge (de 17 à 105 ans).

Cette diminution très significative ($p < 0,001$) est une information intéressante lorsque l'on considère l'hypothèse selon laquelle l'arylestérase exerce un rôle dans la physiopathologie de l'athérosclérose [86,88].

En effet, les complications de l'athérosclérose sont fréquentes chez les sujets âgés (HTA, insuffisance coronarienne, accident vasculaire cérébral et néphroangiosclérose) et sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité importantes.

Comme cela a déjà été précédemment évoqué, l'activité arylestérase est diminuée chez les patients coronariens ayant des antécédents d'infarctus du myocarde [89],

chez les patients diabétiques insulino-dépendants [83] et chez les patients présentant certains troubles du métabolisme lipidique tels que l'hypercholestérolémie familiale ou les hypoalphalipoprotéïnémies (telles que la maladie de Tangier) [83,102]. Toutes ces situations pathologiques correspondent à une maladie cardio-vasculaire rapidement évolutive et souvent prématurée.

La constatation de l'abaissement de l'activité arylestérase concomitante avec le vieillissement vasculaire paraît donc intéressante puisqu'elle confirme la relation, fortement suggérée par Mackness, entre la diminution d'activité enzymatique et le développement de la maladie cardio-vasculaire. Cette diminution d'activité constitue une hypothèse enzymatique séduisante quant à l'explication du développement de l'athérosclérose au cours des ans.

Au sein de la population générale caucasienne, l'on sait que l'activité arylestérase se répartit en trois phénotypes [37], A pour des activités paraoxonase basses, AB pour des activités intermédiaires et B pour des activités élevées. Afin de vérifier que la population la plus âgée de cette étude n'était pas représentée en trop fortes proportions par des sujets appartenant aux phénotypes « faibles activités » (groupe A et AB), la répartition phénotypique a été calculée et a montré la même structure phénotypique que les populations caucasiennes ayant servi à établir des valeurs de références [37]: le groupe A représentant, dans la population générale, 47% des sujets, le groupe B 10% des sujets et le groupe AB 43% des sujets.

La figure 2 montre, en effet, les trois groupes A, AB et B et leurs répartitions au sein de la population générale totale. Les deux « sous-populations », comprenant les sujets de moins de 65 ans pour la première et les sujets de plus de 65 ans pour la seconde, n'ont pas montré, non plus, de répartition phénotypique différente. L'influence de l'âge a été retrouvée

dans chaque sous-groupe phénotypique. Cependant, le phénotype A de « basse activité » semble perdre son activité d'hydrolyse du paraoxon plus rapidement que les deux autres phénotypes, ce qui tend à élargir les distributions d'activité arylestérase chez les personnes âgées (tableau III) : Les sujets de phénotype B conservent en effet une activité arylestérase élevée plus longtemps. L'âge n'explique qu'une faible partie des variations d'activité arylestérase (10 à 30% selon le coefficient de détermination r^2). La variation « résiduelle » est probablement due aux différences interindividuelles, dépendant des répartitions phénotypiques des populations, mais aussi à l'intérieur de chaque phénotype à différents facteurs endogènes et exogènes . Il est vraisemblable que de tels facteurs épigénétiques puissent aussi intervenir (alimentation, état nutritionnel).

Jusqu'à une date récente, aucune étude ne permettait de relier le risque cardiovasculaire accru à un phénotype particulier. Les études précédemment citées [83;89;102] ne montraient qu'une diminution d'activité enzymatique acquise dans des populations dont la répartition phénotypique, lorsqu'elle était connue, était conforme à celle de la population de référence. Si l'on considère qu'une forte activité arylestérase protège contre le risque d'athéromatose, cela signifie que l'âge diminue cette protection, que les sujets du phénotype A ont plus de risque que les autres et que l'âge augmente davantage ce risque dans ce phénotype A (diminution plus précoce et rapide).

En revanche, on peut discuter une seconde hypothèse selon laquelle ce serait au contraire une forte activité paraoxonase comme celle présentée par le phénotype B qui exposerait au risque d'athéromatose. On peut verser à l'appui de cette hypothèse deux études épidémiologiques rétrospectives récentes: l'une comparant deux populations de diabétiques non insulino-dépendants caucasiens [113], l'autre [119] comparant une population de

coronariens à la population générale. Ces deux études ont retrouvé par exploration génétique une plus forte proportion de phénotype B dans le groupe atteint d'insuffisance coronarienne que dans le groupe indemne de cette pathologie. Si ces résultats devaient être confirmés, il s'agirait donc là de la première mise en évidence d'une différence génétique d'action cardio-vasculaire de l'arylestérase.

Cependant, une réserve sur les résultats de ces travaux peut être émise: les deux études n'ont concerné que des sujets survivants. Les auteurs de la première étude eux-mêmes évoquent une possibilité de biais de survie. En effet, ces sujets étaient séparés en deux groupes selon qu'ils avaient ou non une insuffisance coronarienne confirmée. On ne peut exclure l'hypothèse, que les sujets décédés de leur insuffisance coronarienne aient préférentiellement appartenu au phénotype A et qu'ainsi, au sein des survivants, le pourcentage de sujets de phénotype B ait pu apparaître supérieur à celui du groupe témoin. Cela rendrait compatible ces résultats avec la première hypothèse énoncée ci-dessus, puisque la surmortalité du groupe A pourrait être expliquée par l'association du risque de la maladie diabétique et du risque cardio-vasculaire propre à ce phénotype. Il est également possible que l'activité arylestérase/paraonase soit globalement diminuée chez les coronariens, même si la proportion de phénotype B est augmentée. Malheureusement, les données publiées ne permettent pas de calculer cette activité dans les conditions utilisées par les auteurs, de sorte qu'il n'est pas possible de comparer leurs résultats avec les nôtres.

L'activité arylestérase semble indépendante du sexe, comme cela a déjà été rapporté [83], ainsi que des traitements reçus. Il serait cependant intéressant de vérifier si d'autres substances pharmacologiques ne pourraient être capables de modifier cette activité.

La comparaison des données de la littérature aux résultats obtenus dans cette étude chez les sujets de moins de 65 ans montre que les niveaux d'activités mesurées dans cette étude sont similaires à ceux d'Eckerson [37,38] pour ce qui concerne l'activité d'hydrolyse du phénylacétate, mais plus faible pour ce qui concerne l'activité d'hydrolyse du paraoxon. De même, les résultats concernant l'activité d'hydrolyse du paranitrophénylacétate montre des valeurs plus faibles que ceux obtenus par Haagen [51]. Ces différences pourraient s'expliquer en partie par une moindre dilution du sérum dans nos techniques, l'enzyme pouvant alors subir des phénomènes d'association qui tendraient à réduire son activité spécifique. Les dilutions utilisées dans cette étude ont été choisies pour minimiser l'hydrolyse spontanée du substrat par rapport à l'hydrolyse enzymatique.

Quoi qu'il en soit, la diminution de l'activité arylestérase et donc l'éventuelle perte de son rôle protecteur contre l'athérosclérose avec l'âge, pourrait constituer un facteur important du vieillissement vasculaire.

II. ARYLESTERASE ET INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE

II.1. Athéromatose et insuffisance rénale chronique

La maladie cardio-vasculaire est la première cause de mortalité de l'insuffisant rénal chronique (IRC) [13]. Ce risque augmente considérablement avec le traitement par dialyse [53] quelle que soit la méthode d'épuration utilisée: la dialyse prévient en effet la mort par urémie mais le taux de survie de ces patients reste très bas (espérance de vie moyenne de

9,3 ans pour un IRC pris en dialyse à 40 ans et 4,3 ans pour un IRC pris en dialyse à 59 ans aux USA) (United States Renal Data System 1995) et 50% des décès sont dus à des complications cardio-vasculaires [62,63,106]. Ainsi, Ritz et coll. ont noté, en 1985, que le risque d'infarctus du myocarde mortel du patient dialysé est de 9 à 170 fois supérieur à celui de la population générale du même âge [106]. Des prélèvements post mortem d'artères iliaques et rénales de patients urémiques ont confirmé la présence de lésions d'athéromatose accélérée par rapport à une population contrôle [63,129].

Parmi les nombreux facteurs contribuant à cette athérosclérose accélérée, les anomalies lipidiques semblent jouer un rôle majeur: lors de l'IRC, des troubles du métabolisme lipidique quantitatifs et qualitatifs [98] apparaissent :

- l'hypertriglycémie est fréquente, elle est retrouvée chez 50 à 75% des dialysés [21,25,27,30,42,50,52,62,73,91,97,105] et augmente au fur et à mesure de l'altération de la filtration glomérulaire chez l'IRC [9,11,13,19,20,25,28,42,50,56,61,78,95,96,122,136]. L'hypertriglycémie est associée à une augmentation du taux de lipoprotéines VLDL et IDL.

- l'hypercholestérolémie totale est rare mais une redistribution du cholestérol au détriment des lipoprotéines HDL est observée, le taux de HDL est abaissé en particulier les fractions 2 et 3 [17,52,97,112] et le rapport HDL/LDL diminue [13,21,27,30,62,93]. Enfin, la Lp(a) est augmentée.

- les modifications qualitatives des lipoprotéines sont nombreuses et variables: diminution des apoprotéines apoB, A₁ et A₂, augmentation modérée des apoB, diminution de l'apoE [11,13,16,50,98]. Ainsi le rapport ApoA₁ / ApoC₃ est abaissé et semble représenter l'anomalie la plus significative de l'IRC. L'urémie semble aussi marquée par un transfert des apo B, C et E des HDL vers les VLDL et IDL.

Toutes ces modifications sont déjà présentes à un stade assez précoce de l'IRC [12,13,50,128] et se confirment en s'aggravant au stade de la dialyse.

Ces anomalies lipidiques du sujet urémique et du dialysé ont été jusqu'ici attribuées à plusieurs mécanismes complémentaires :

◇ diminution de l'épuration des triglycérides [27,117]

◇ diminution du catabolisme des VLDL [22,27-31,34,55,56,78,79] [90,94,95,97,109,110,116,117], secondaire à des diminutions voire pertes d'activités enzymatiques lipolytiques, telles que la *triglycéride-lipase hépatique* [3,7,10,30,31,101], la *lipoprotéine-lipase* [13,30,105,117], la *Lécithin-Cholestérol-Acyl-Transférase* (LCAT) [13,35]. Ces diminutions d'activités ont été rattachées à une possible insulino-résistance [111], à l'hyperparathyroïdie, aux toxines urémiques, aux modifications des apoprotéines [8,41,90] ou à l'anticoagulation par héparine au long cours lors des séances d'hémodialyse [28,32,61,118].

◇ augmentation de production de triglycérides par erreurs diététiques, ingestion de sucres [14], par des apports de glucose par le dialysat et par hyperinsulinisme [9,19,29]

◇ diminution de l'estérification du cholestérol [35] et diminution du transport inverse du cholestérol vers le foie du fait d'un taux d'apoE élevé [13,58].

◇ existence d'un stress oxydant aboutissant à la synthèse de lipoperoxydes

Après transplantation rénale, des anomalies du métabolisme lipidique sont fréquemment retrouvées [73]. Malgré la normalisation de la fonction rénale après la greffe, une hyperlipidémie peut apparaître : l'hypertriglycéridémie est souvent présente bien que chez certains patients, une hypercholestérolémie isolée ait pu être constatée. Comme pour les

insuffisants rénaux chroniques non transplantés, ces troubles du métabolisme lipidique peuvent avoir des conséquences cliniques importantes: en effet, plusieurs études ont montré une plus grande incidence des complications cardio-vasculaires chez les transplantés rénaux présentant une dyslipidémie [36].

Parmi les multiples facteurs pouvant contribuer à la constitution des troubles du métabolisme lipidique du transplanté rénal, il est important de connaître le facteur iatrogène représenté par certains médicaments immunosuppresseurs, tels que la ciclosporine (augmentation de la cholestérolémie de 0,77 à 0,92 mmol/l en moyenne, hypertriglycéridémie et augmentation de la lipoprotéine(a)), le tacrolimus et les corticoïdes (dont l'arrêt entraîne une baisse de la cholestérolémie totale de 17 % environ) [36].

Devant les découvertes récentes concernant le rôle éventuel de l'arylestérase dans la protection contre l'athérosclérose, il était intéressant d'étudier cette enzyme lors de l'IRC et après transplantation rénale.

II.2. Activité arylestérase au cours de l'insuffisance rénale chronique

Cette étude est la première à s'intéresser à l'activité arylestérase chez l'insuffisant rénal chronique.

Comme l'avait montré Mackness dans des populations à haut risque cardio-vasculaire (coronariens, diabétiques, hypercholestérolémie familiale) [80-88], cette étude montre que l'activité arylestérase est abaissée de façon significative au cours de l'IRC (de 5 à 25 % selon le substrat) et qu'elle est effondrée lors des traitements par hémodialyse (de 25 à 43 %) ou dialyse péritonéale (de 5 à 25% selon le substrat) par rapport aux sujets

« contrôles ».

Lorsque l'on compare l'âge moyen de la population témoin (50 ans) et l'âge moyen des populations des malades (59 ans), un biais de sélection des sujets peut être suspecté (les malades étant de 10 ans plus vieux que les témoins), l'abaissement d'activité arylestérase pouvant alors être attribué à l'âge. Ceci a pu être écarté grâce à l'analyse statistique par régression linéaire multiple qui permet de comparer chaque groupe par tranches d'âge tout en intégrant la diminution d'activité liée au facteur âge.

L'étude de la répartition phénotypique de chaque groupe n'a, de plus, pas montré de différence significative par rapport aux données de la littérature concernant des populations caucasiennes (prédominance des phénotypes A d'activité arylestérase basse (47%) et AB d'activité intermédiaire (43%) dans des proportions habituelles) (figure 4). Les populations témoins ou malades du Limousin ne constituent donc pas un foyer de population particulier où des sujets prédisposés au phénotype A seraient « sur-représentés ».

L'altération de la filtration glomérulaire semble donc s'accompagner d'une diminution globale d'activité de l'arylestérase, diminution d'autant plus forte que l'insuffisance rénale est terminale et nécessite une méthode de suppléance (HD ou DP). Comme cela a été rappelé dans le chapitre précédent, la première cause de mortalité du sujet urémique est la maladie cardio-vasculaire. Les insuffisants rénaux chroniques représentent donc, une population à haut risque, comme le sont les sujets diabétiques ou atteints d'hypercholestérolémie. Cette étude tend donc, à confirmer les découvertes de Mackness en montrant une corrélation significative entre une activité arylestérase basse et le développement précoce de lésions d'athérosclérose. Par ailleurs, il est intéressant de noter l'existence d'un stress oxydant important, décrit au cours de l'évolution de l'IRC, comme cela est aussi observé chez le diabétique. Certains auteurs ont même attribué à ce stress un rôle

dans la pathogénie des troubles lipidiques de l'insuffisant rénal chronique et ont préconisé l'utilisation de la vitamine E lors du diagnostic d'hyperlipémie voire même en prévention, afin de limiter au maximum ce stress grâce aux propriétés anti oxydantes du tocophérol [125]. Dans ce contexte, la diminution d'activité arylestérase, et donc de son effet antioxydant, chez l'insuffisant rénal chronique tend également à confirmer l'hypothèse de Mackness concernant le rôle préventif de l'enzyme contre l'athérosclérose.

Comment expliquer l'abaissement d'activité arylestérase au cours de l'IRC?

Les toxines urémiques ou autres métabolites en excès lors d'IRC pourraient constituer des *inhibiteurs de l'enzyme* :

- soit par compétition au niveau du site actif

- soit par modification de la structure de l'enzyme, de son site actif, du site d'interaction de l'arylestérase avec les lipoprotéines HDL ou du site d'interaction avec le calcium. Tout ceci, associé à une production accrue de lipoperoxides lors d'urémie (par stress oxydant), pourrait expliquer l'altération précoce et importante des parois vasculaires de l'insuffisant rénal chronique. Cependant, dans le groupe des insuffisants rénaux chroniques non dialysés, l'étude du degré de diminution de la masse néphronique par le calcul de la clairance de la créatinine, selon la formule de Cockcroft, n'a pas montré de corrélation linéaire significative entre la baisse de la clairance et la baisse d'activité enzymatique, quel que soit le substrat. Cette dernière constatation tend à faire émettre l'hypothèse, selon laquelle les méthodes de suppléance rénale pourraient avoir une action inhibitrice sur l'arylestérase plus forte que l'action de l'urémie, en elle-même, sur l'arylestérase (si un phénomène d'inhibition existe...).

II.3. Activité arylestérase au cours de l'insuffisance rénale chronique après transplantation rénale

La restauration de l'activité arylestérase après transplantation rénale amène à trois remarques:

- Tout d'abord, chez le transplanté rénal, une activité arylestérase normalisée ne semble pas toujours s'accompagner d'une disparition des troubles du métabolisme lipidique puisque ces derniers semblent persister ou apparaître après transplantation [36]. Cela incite à la prudence quant à l'importance du rôle attribué à l'arylestérase dans la constitution des dyslipidémies du sujet insuffisant rénal chronique. Cependant, les anomalies lipidiques après transplantation, ne sont en général, pas aussi sévères que pendant la période de dialyse et une étude plus précise de la relation dyslipidémie / activité arylestérase chez le transplanté rénal est indispensable afin de définir le rôle éventuel de l'enzyme dans ce type de pathologie. De plus, comme cela a été précisé précédemment, les anomalies lipidiques dans l'IRC et après transplantation sont multiples, complexes et probablement multifactorielles : on peut supposer, comme dans le chapitre précédent (IRC), que selon le mode de traitement de l'IRC, l'arylestérase joue un rôle plus ou moins important dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

- La seconde remarque concerne le mécanisme, par lequel l'activité arylestérase est restaurée après transplantation et altérée lors des traitements par dialyse. Cette normalisation, concomitante à une « récupération » d'une fonction rénale normale, incite, en effet, à évoquer la survenue d'un phénomène d'inhibition, probablement sérique, lors de la progression de l'insuffisance rénale chronique, maximal lors du traitement par dialyse et

disparaissant après la greffe rénale. On peut évoquer, par exemple, la disparition de certaines toxines urémiques qui n'exerceraient donc plus d'inhibition sur l'enzyme, son site d'interaction avec les HDL ou sur le site d'action du Calcium sur l'enzyme. Cela n'écarte cependant pas la possibilité de la restauration de la synthèse de l'arylestérase par la transplantation rénale : seul un dosage sérique de la protéine (et non plus de l'activité enzymatique) pourrait confirmer avec certitude cette hypothèse.

- Enfin, il ne faut pas oublier l'interaction possible des traitements immunosuppresseurs avec l'arylestérase, compte tenu de la participation de certains (ciclosporine, transportée par les lipoprotéines LDL, corticoïdes ou tacrolimus) dans l'aggravation des troubles lipidiques du transplanté rénal. Ce travail n'a cependant pas observé d'influence des traitements sur l'activité arylestérase. Mais une altération modérée de l'activité après transplantation paraît une hypothèse intéressante concernant le fait, que la restauration de l'activité enzymatique ne s'accompagne parfois de la persistance des troubles lipidiques.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'activité paraoxonase/arylestérase sérique diminue de façon très significative avec l'âge. L'influence du vieillissement sur cette activité enzymatique, parallèle au développement des lésions d'athérosclérose avec l'âge, semble donc confirmer l'hypothèse de la participation de l'arylestérase à l'athérogénèse, même si ce travail est essentiellement épidémiologique et n'étudie pas le statut oxydant des lipoprotéines LDL des sujets témoins.

Au cours de l'insuffisance rénale chronique, l'activité paraoxonase/arylestérase diminue fortement lors d'insuffisance rénale chronique non terminale (25%), et est effondrée lors des traitements par hémodialyse (42%) et par dialyse péritonéale (39,5%) par rapport aux sujets témoins du même âge. Pour la première fois, ce travail met en évidence l'influence de l'urémie chronique sur cette activité enzymatique. Comme pour les diabétiques insulino-dépendants, les patients insuffisants coronariens ou lors d'hyperlipidémie familiale, cette étude montre une baisse significative d'activité arylestérase au sein d'une population à forte athérogénicité. Là encore, cela semble confirmer la participation de l'enzyme dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Cette étude ne permet cependant pas de dire à quel niveau, ni avec quelle importance, l'arylestérase joue (ou, dans le cas des sujets urémiques, perd) son rôle protecteur contre l'athérome. D'autres études sont, en effet, nécessaires afin de répondre à ces questions ainsi qu'aux suivantes :

- la baisse de l'activité arylestérase correspond-elle vraiment à une modification du statut oxydant des lipides lors d'insuffisance rénale et/ou à un profil lipidique particulier ?

- peut-on expliquer la baisse d'activité par des facteurs d'inhibition enzymatique, ou par une diminution de synthèse de l'enzyme lors de l'urémie ?

L'étude de cette activité enzymatique dans ce « modèle pathologique », que représente l'insuffisance rénale chronique, permettra peut-être de mieux connaître la physiopathologie de l'athérogénèse.

Après transplantation rénale, l'activité paraoxonase/arylestérase ne diffère pas de façon significative de l'activité des sujets témoins : elle semble donc être restaurée. La diminution voire la disparition des toxines urémiques s'accompagnent donc d'une augmentation de cette activité. Il paraît alors intéressant d'étudier plus en détail la relation pouvant exister entre arylestérase et dyslipidémies du transplanté rénal.

Enfin, il est important de souligner que l'arylestérase n'ayant suscité de l'intérêt que depuis peu, on ne connaît pas encore son ou ses substrats physiologiques (même si sa participation dans le métabolisme lipidique est suspectée). Son propre métabolisme n'est pas encore élucidé (même si le gène qui la code est connu) et surtout on ne sait pas encore la purifier, étape qui semble aujourd'hui le préalable indispensable à l'étude de cette enzyme et à la découverte de son rôle.

ICONOGRAPHIE

Figure 1 : Activité arylestérase sérique en fonction de l'âge et du substrat (Paraoxon, Phénylacétate (PhAc) et 4-nitrophénylacétate (PNPA)), chez les sujets témoins.

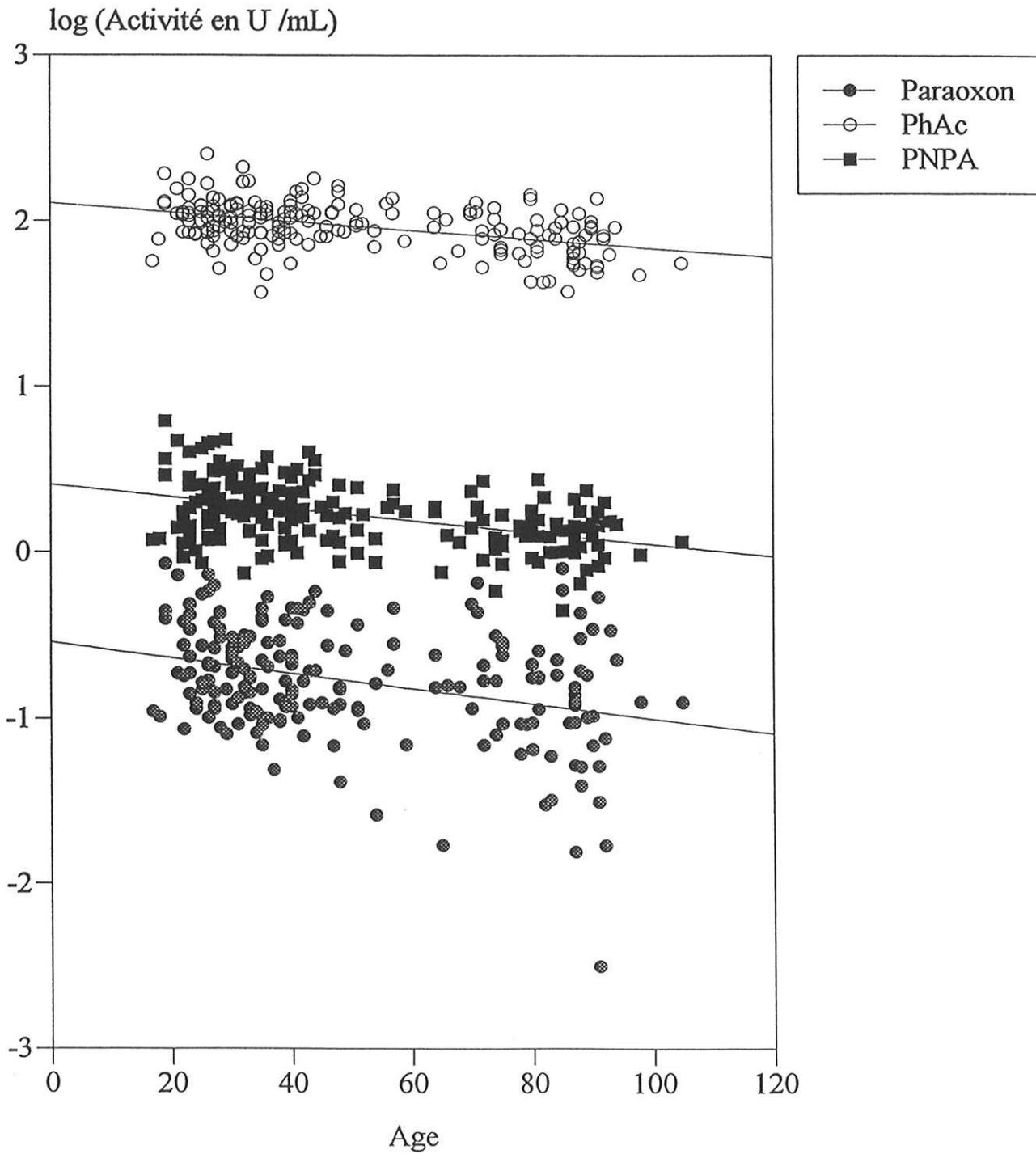


Figure 2 : Répartition phénotypique des sujets témoins, déterminée selon le calcul du rapport $R = \frac{\text{Activité (Paraoxon)} \cdot 10^3}{\text{Activité (Phénylacetate)}}$

Phénotype A (●) : $R \leq 1,7$; Phénotype AB (○) : $1,7 < R \leq 4$; Phénotype B (■) : $R > 4$

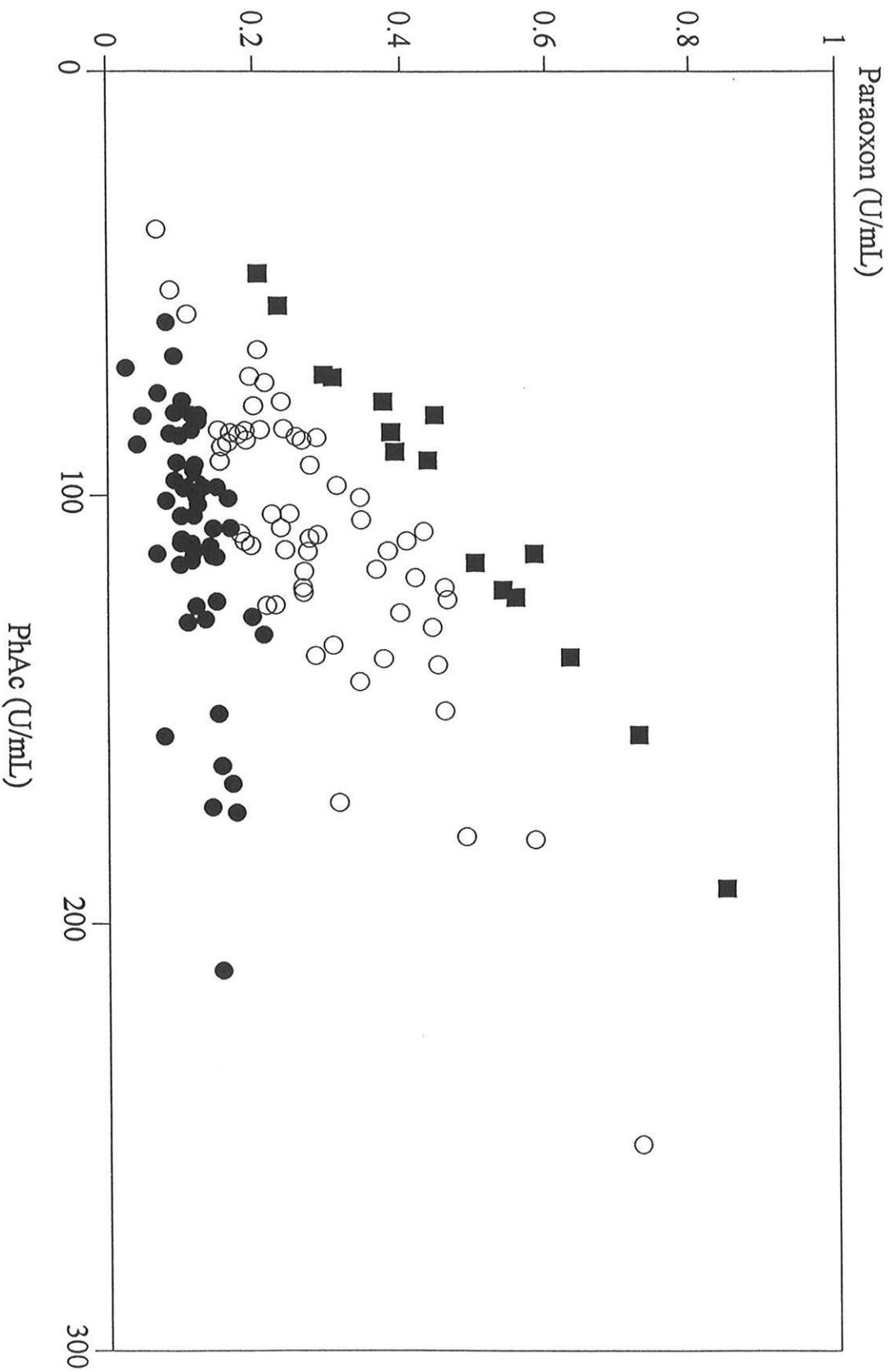


Figure 3 : Activité arylestérase sérique vis-à-vis du 4-nitrophénylacétate en fonction de l'âge chez les sujets témoins (N), les malades présentant une insuffisance rénale chronique non terminale (IR), les malades hémodialysés (HD), les malades traités par dialyse péritonéale (DP) et les malades transplantés rénaux (TR).

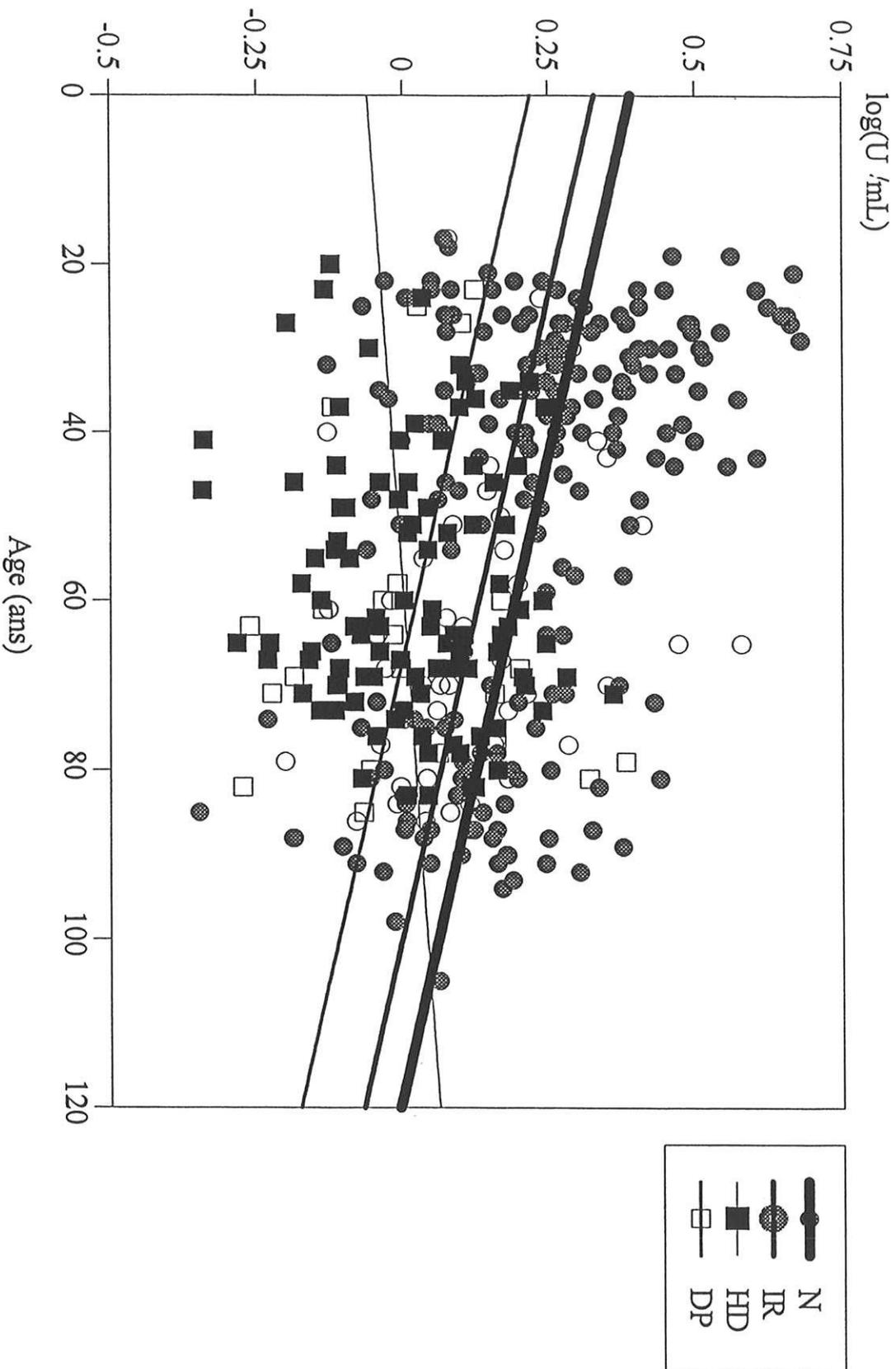
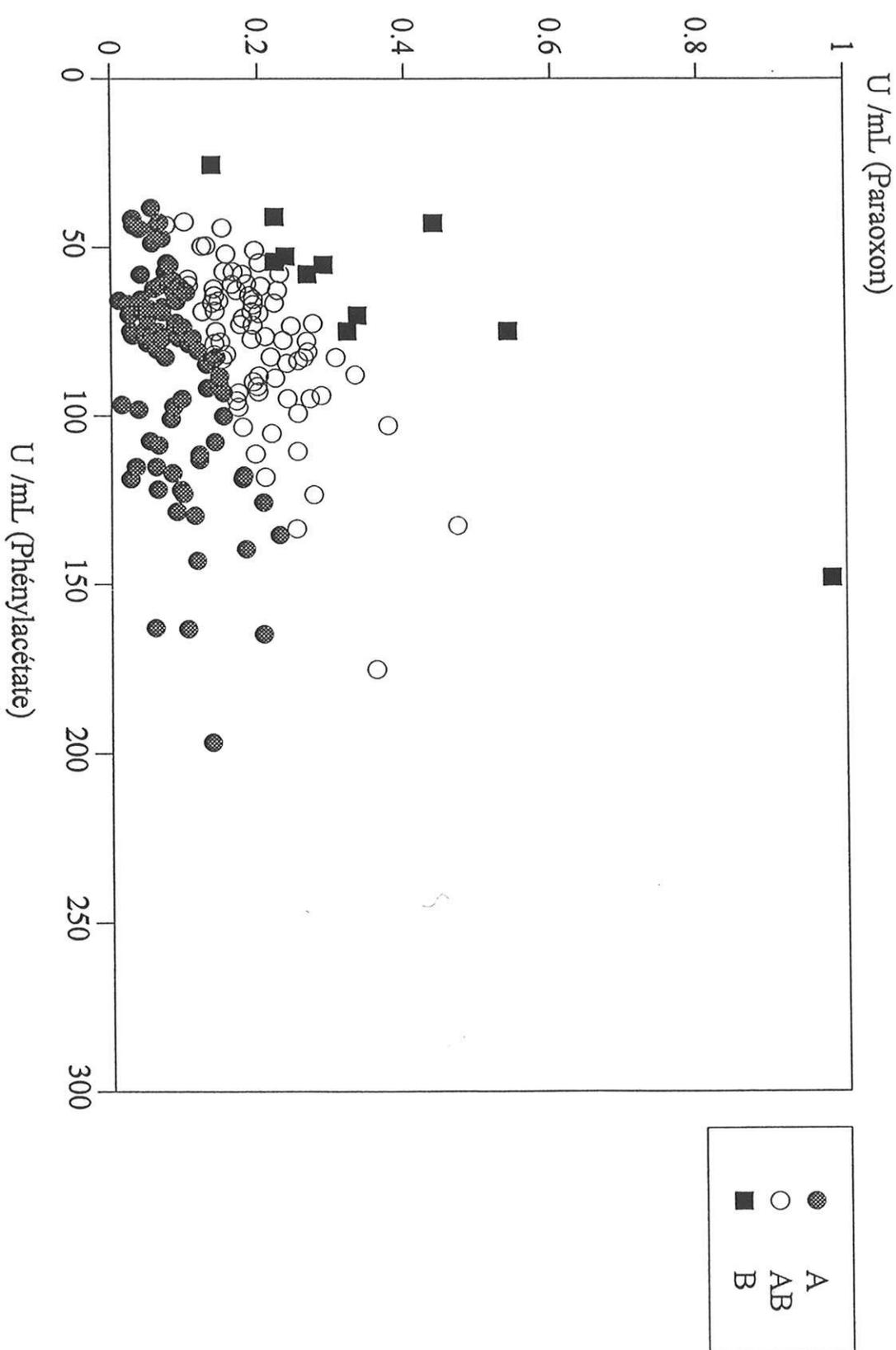
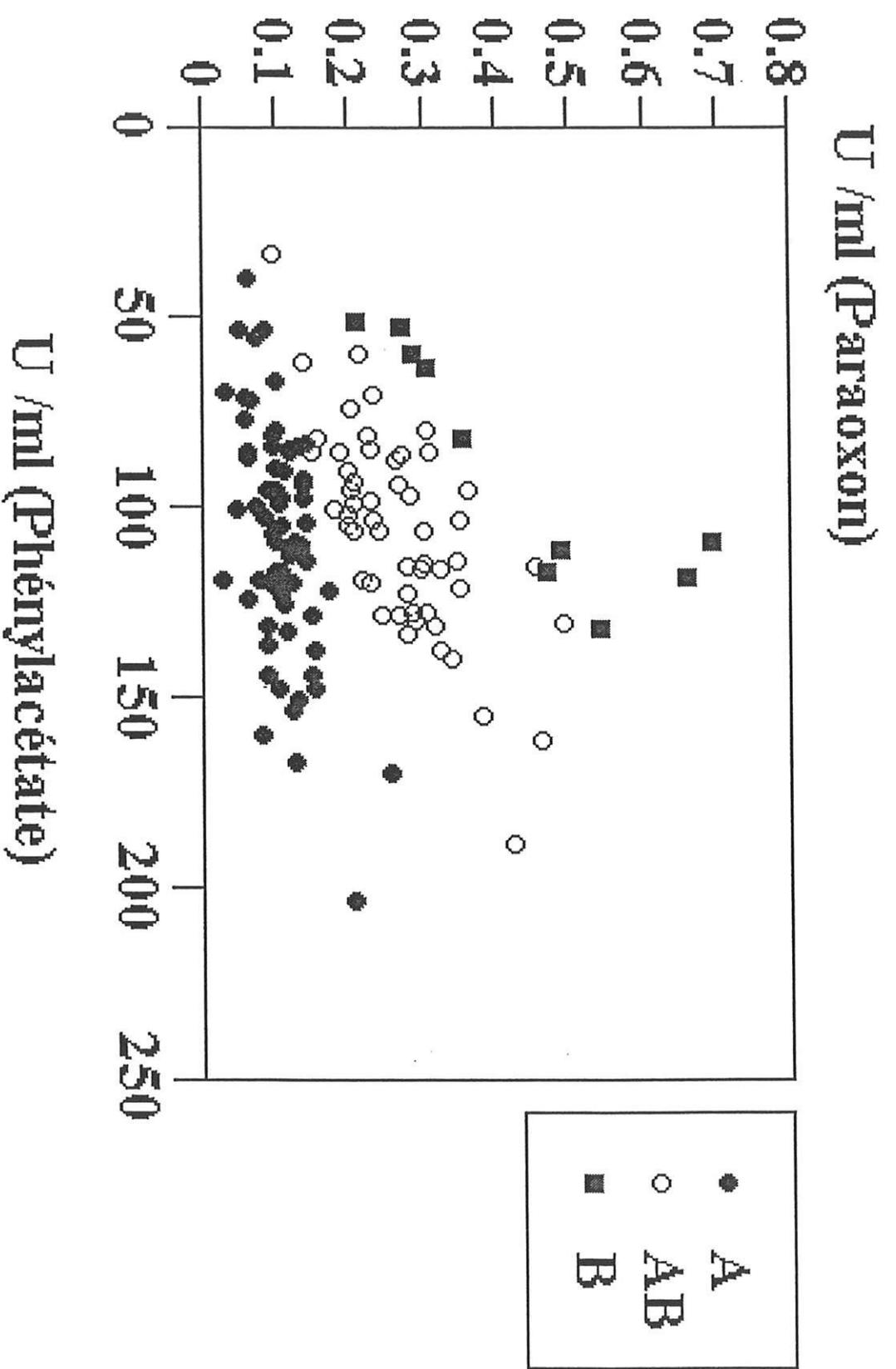


Figure 4 : Répartition phénotypique des sujets insuffisants rénaux dialysés et non dialysés, déterminée par le rapport d'Eckerson .



REPARTITION PHENOTYPIQUE DES TRANSPLANTES



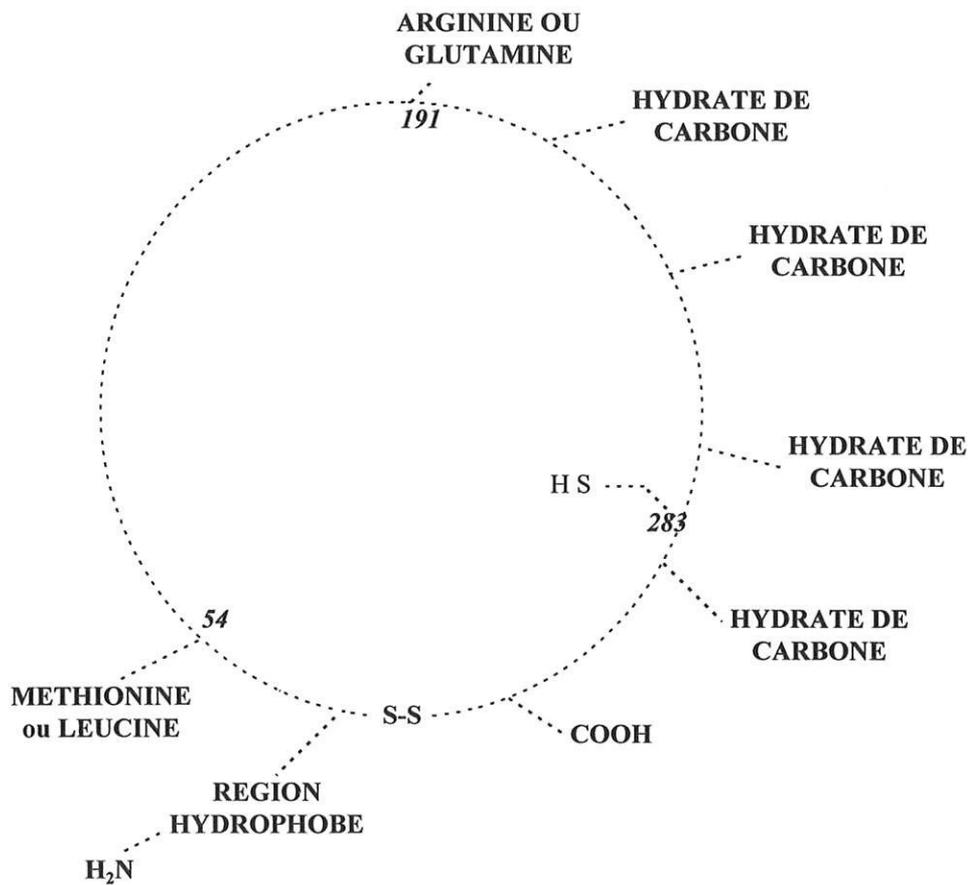


Schéma 1 : Représentation schématique de l'enzyme ARYLESTERASE / PARAOXONASE montrant les 2 sites variables, les sites glucidiques, l'extrémité N-terminale hydrophobe et un résidu cystéinique isolé.

Peptide N-terminal

Gln — Val — Gln — Pro — Val — Glu — Leu — Pro — Cys — Asn — Leu — Val — Lys₄₅

S

|

S

|

Ala — Leu — Tyr — Cys — Glu — Leu₃₃₄

Peptide C-terminal

Schéma 2 : composition de l'extrémité N-terminale de l'aryléstérase/paraoxonase, liée par un pont disulfure à l'extrémité C-terminale.

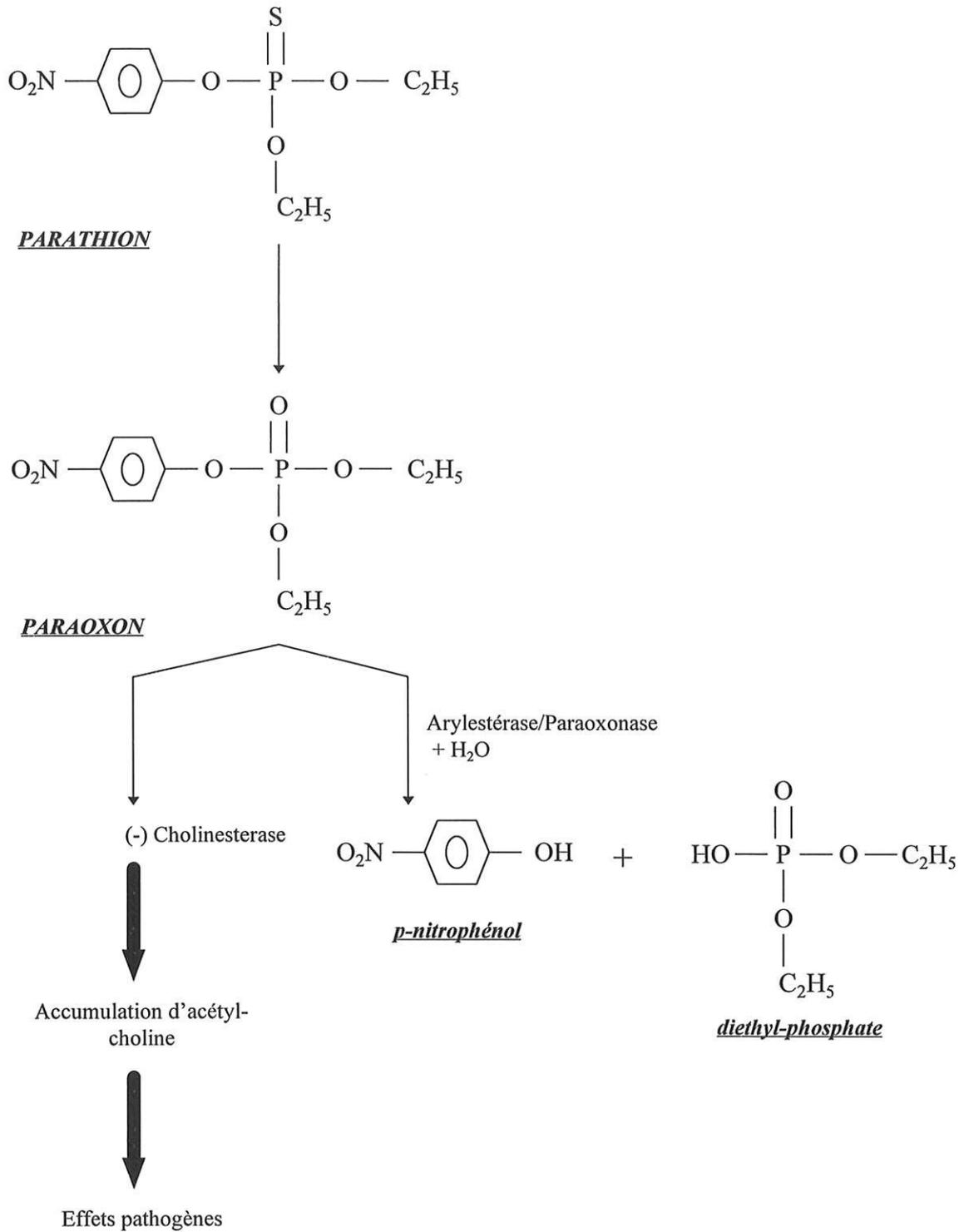


Schéma 3 : Activité arylestérase/paraoxonase et toxicité du parathion : l'hydrolyse du paraoxon évite l'inhibition de la cholinestérase dans le sérum humain.

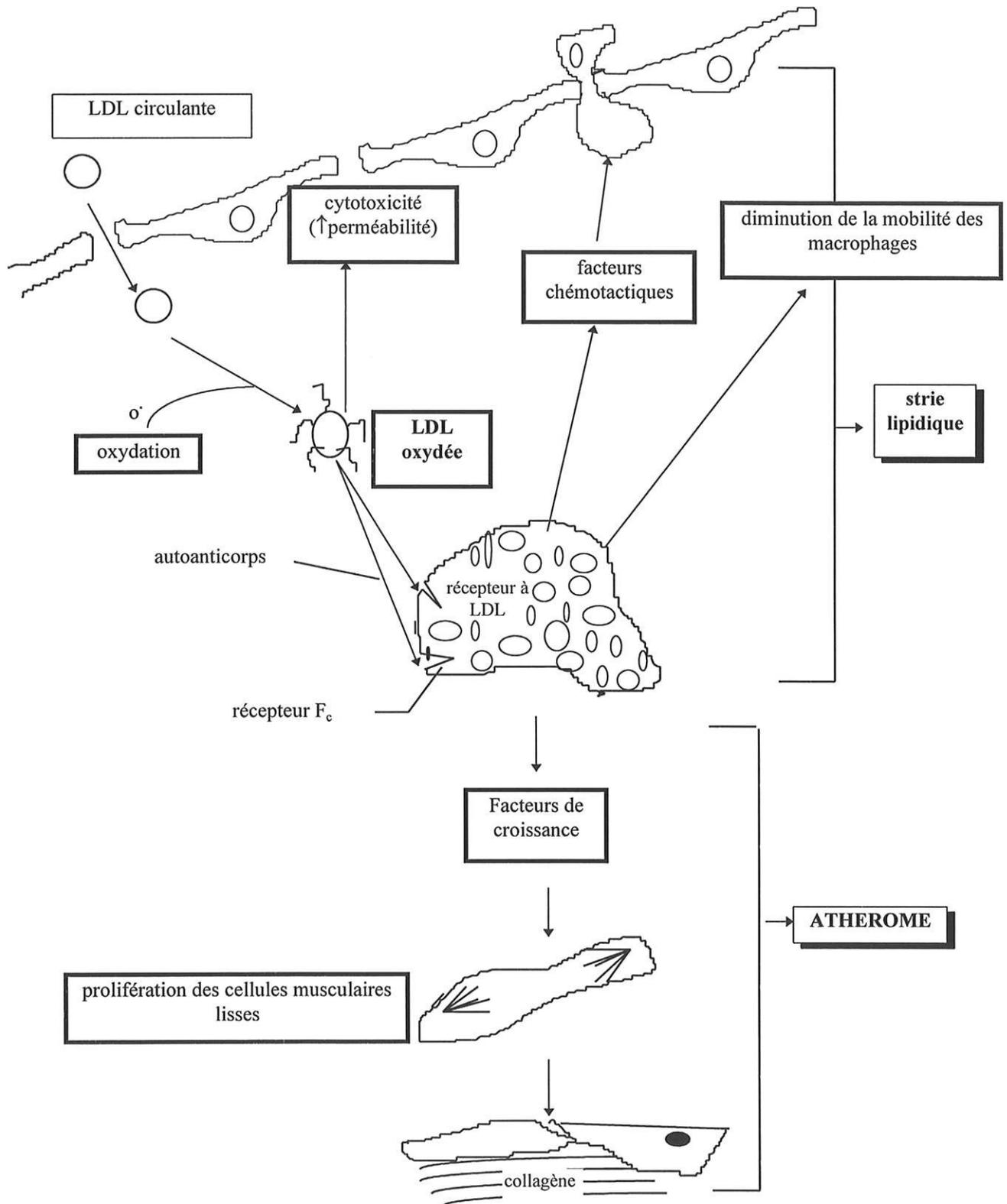


Schéma 4 : Athérogénèse par oxydation des lipoprotéines LDL.
(d'après Durrington et Mackness 1993)

Tableau I : Activité arylestérase sérique (en U/ml) chez les malades ayant une insuffisance rénale chronique non terminale (IR), chez les hémodialysés (HD), chez les malades traités par dialyse péritonéale (DP) et chez les malades transplantés rénaux (TR) comparée aux sujets témoins.

Sujets		4-nitrophénylacétate	Paraoxon	Phénylacétate
Témoins	m ± s	1,85 ± 0,91	0,22 ± 0,16	98,68 ± 33,30
	[Minimum ; Maximum]	[0,44 ; 6,17]	[0,003 ; 0,84]	[37,13 ; 251,80]
	Médiane	1,66	0,17	96,37
IR	m ± s	1,42 ± 0,60	0,19 ± 0,16	95 ± 37
	[Minimum ; Maximum]	[0,63 ; 3,78]	[0,02 ; 0,98]	[42 ; 197]
	Médiane	1,27	0,15	84
HD	m ± s	1,07 ± 0,37	0,14 ± 0,07	74 ± 20
	[Minimum ; Maximum]	[0,11 ; 2,28]	[0,01 ; 0,34]	[25 ; 128]
	Médiane	1,0	0,13	71
DP	m ± s	1,12 ± 0,48	0,13 ± 0,08	95 ± 25
	[Minimum ; Maximum]	[0,53 ; 2,40]	[0,01 ; 0,32]	[54 ; 164]
	Médiane	0,98	0,12	92
TR	m ± s	1,80 ± 0,68	0,20 ± 0,12	106,30 ± 29
	[Minimum ; Maximum]	[0,33 ; 4,16]	[0,03 ; 0,69]	[33,85 ; 203,49]
	Médiane	1,66	0,15	106,30

Tableau II : Activité arylestérase sérique (en U/ml) chez les sujets témoins selon le phénotype A, AB ou B.

Phénotype	4-nitrophénylacétate	Paraoxon	Phénylacétate
A	1,78 ± 0,62	0,12 ± 0,04	109 ± 30
AB	2,30 ± 1,00	0,28 ± 0,12	109 ± 34
B	2,57 ± 1,45	0,47 ± 0,18	102 ± 38
	p < 5%	p < 0,1 %	N.S.

Tableau III : Activité arylestérase sérique (en U/ml) en fonction de l'âge et selon le phénotype des sujets témoins

Phénotype	4-nitrophénylacétate	Paraoxon	Phénylacétate
A (n=89)	log(U/ml) = - 0,0036.Age+0,3673 (r= -0,53 ; p<10 ⁻³)	log(U/ml) = -0,0064.Age+0,7060 (r= -0,52 ; p<10 ⁻³)	log(U/ml) = -0,0031.Age+2,1229 (r= -0,49 ; p<10 ⁻³)
AB (n=81)	log(U/ml) = -0,0030.Age+0,4081 (r= -0,38 ; p<10 ⁻³)	log(U/ml) = -0,0028.Age+0,4737 (r= -0,37 ; p<10 ⁻³)	log(U/ml) = -0,0025.Age+2,1037 (r= -0,45 ; p<10 ⁻³)
B (n=25)	log(U/ml) = -0,0050.Age+0,5067 (r= -0,46 ; p<0,05)	log(U/ml) = -0,0010.Age+0,3125 (r= -0,14 ; N.S.)	log(U/ml) = -0,0021.Age+2,0686 (r= -0,33 ; N.S.)

Tableau IV : Activité arylestérase sérique en fonction de différents facteurs : Sexe, Age, Insuffisance rénale non terminale (IR), Hémodialyse (HD), Dialyse péritonéale (DP), Transplantation rénale (TR), calculée selon le modèle:

$$\log (U/ml) = a_0 + a_1.Sexe + a_2.Age + a_3.IR + a_4.HD + a_5.DP + a_6.TR + b_3.Age.IR + b_4.Age.HD + b_5.Age.DP + b_6.Age.TR$$

(seuls les coefficients de régression significatifs au risque 10% ou moins ont été conservés lors du calcul et apparaissent donc dans le tableau)

Coef.	Facteur	4-nitrophénylacétate	Paraoxon	Phénylacétate
a₀		0,3903 (p<10 ⁻⁴)	-0,5766 (p<10 ⁻⁴)	2,0856 (p<10 ⁻⁴)
a₂	Age	-0,0033 (p<10 ⁻⁴)	-0,0040 (p<10 ⁻⁴)	-0,0022 (p<10 ⁻⁴)
a₃	IR	-0,0621 (p<0,05)		
a₄	HD	-0,4490 (p<10 ⁻⁴)	-0,3720 (p<0,01)	-0,1027 (p<10 ⁻⁴)
a₅	DP	-0,1698 (p<10 ⁻⁴)	-0,1678 (p<0,05)	
b₄	Age.HD	0,0043 (p<10 ⁻³)	0,0043 (p<0,1)	
r		0,57	0,32	0,47

Tableau V : Droites de régression de l'activité arylestérase sérique en fonction de l'âge chez les sujets témoins, les malades ayant une insuffisance rénale chronique non terminale (IR), les malades hémodialysés (HD), les malades traités par dialyse péritonéale (DP) et les malades transplantés rénaux (TR).

Les valeurs suivantes ont été calculées à partir des valeurs du tableau IV.

(La droite de régression n'est pas mentionnée lorsqu'elle ne diffère pas significativement de celle des témoins)

Sujets	4-nitrophénylacétate	Paraoxon	Phénylacétate
Témoins	$\log(\text{U/ml}) = 0,3903 - 0,0033.\text{Age}$	$\log(\text{U/ml}) = -0,5766 - 0,0040.\text{Age}$	$\log(\text{U/ml}) = 2,0856 - 0,0022.\text{Age}$
IR	$\log(\text{U/ml}) = 0,3282 - 0,0033.\text{Age}$		
HD	$\log(\text{U/ml}) = -0,0059 + 0,0010.\text{Age}$	$\log(\text{U/ml}) = -0,9486 + 0,0003.\text{Age}$	$\log(\text{U/ml}) = 1,9829 - 0,0022.\text{Age}$
DP	$\log(\text{U/ml}) = 0,2205 - 0,0033.\text{Age}$	$\log(\text{U/ml}) = -0,7444 - 0,0040.\text{Age}$	

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ADKINS S., GAN K.N., MODY M., LA DU BN.. Purification and cloning of human serum paraoxonase/arylesterase. *FASEB J.* 5; A648, 1991.
2. ADKINS S., GAN K.N., MODY M., LA DU B.N.. Molecular basis for the polymorphic forms of serum paraoxonase/arylesterase. *Am. J. Genet.* 52; 598, 1993.
3. AKMAL M., KASIM S.E., SOLIMAN A.R., MASSRY S.G.. Excess parathyroid hormon adversely affects lipid metabolism in chronic renal failure. *Kidney Int.* 37; 354-358, 1990.
4. ALDRIDGE W.N. : Serum esterases 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem. J.* 53; 110, 1953.
5. ALDRIDGE W.N. : Serum esterases 2. An enzyme hydrolyzing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera . *Biochem. J.* 53; 117-124 , 1953.
6. ALDRIDGE W.N., REINER E.. A-esterases, in *Enzyme Inhibitors as Substrates: Interactions of esterases with Esters of Organophosphorous and Carbamic Acids.* New York, American Elsevier. 176-189, 1975.
7. APPELBAUM-BOWDEN D., GOLDBERG A.P., HAZZARD W.H., SHERARD D.J., BRUNZELL J.D., HUTTUNEN J.K., NIKKILA E.A., EHNHOLM C.. Postheparin plasma triglyceride lipases in chronic hemodialysis: Evidence for a role for hepatic lipase in lipoprotein metabolism. *Metabolism.* 28; 917-924, 1979.
8. ATGER V., BEYNE P., FROMMHERZ K., ROULLET J-B., DRÜEKE T.. Presence of apoB48, and relative apoCII deficiency and apoCIII enrichment in uremic very low density lipoproteins. *Ann. Biol. Clin.* 47; 497-501, 1989.
9. ATTMAN P.O., GUSTAFSON A.. Lipid and carbohydrate metabolism in uremia. *Eur. J. Clin. Invest.* 9; 285-291, 1979.
10. ATTMAN P.O., GUSTAFSON A., ALAUPOVIC P., WANG C-S.. Effect of protein reduced diet on plasma lipids, apolipoproteins and lipolytic activities in patients with chronic renal failure. *Am. J. Nephrol.* 4; 92-98, 1984.

11. ATTMAN P.O., ALAUPOVIC P., GUSTAFSON A.. Serum apolipoprotein profiles of patients with chronic renal failure. *Kid. Int.* 32; 368-375, 1987.
12. ATTMAN P.O., ALAUPOVIC P., KNIGHT-GIBSON C., TAVELLA M.. The compositional abnormalities in lipoprotein density classes of patients with chronic renal failure. *Am. J. Kidney dis.* 14; 432, 1989.
13. ATTMAN P.O., ALAUPOVIC P.. Lipid abnormalities in chronic renal insufficiency. *Kid. Int.* 39(S31); 16-23, 1991.
14. ATTMAN P.O., ALAUPOVIC P.. Lipid and apolipoprotein profiles of uremic dyslipoproteinemia. The relation to renal function and dialysis. *Nephron* 57; 401-410, 1991.
15. AUGUSTINSSON K.B., ECKDAHL G.: On the specificity of arylesterases. *Acta Chem. Scand.* 16, 240-241, 1962.
16. AVERNA M.R., BARBAGALLO C.M., GALIONE A., CARROCCIO A., LABISI M., MARINO G., MONTAITO G., NOTARBARTLO A.. Serum apolipoprotein profile of hypertriglyceride patients with chronic renal failure in hemodialysis: A comparison with type IV hyperlipoproteinemic patients. *Metabolism* 38; 601-602, 1989.
17. AVRAM M.M., FEIN P.A., ANIGNANI A., MITTMAN N., MUSCHNICK R.A., LUSTIG A.R., LAPUZ M.G., GOLDWASSER P.. Cholesterol and lipid disturbances in renal disease: the natural history of uremic dyslipidemia and the impact of hemodialysis and CAPD. *Am. J. Med.* 87(5N); 55-61, 1989.
18. BABIY A.V., GEBICKI J.M., SULLIVAN D.R., WILLEY K.. Increased oxidizability of plasma lipoproteins in diabetic patients can be decreased by probucol therapy and is not due to glycation. *Biochem. Pharmacol.* 43; 995, 1992.
19. BAGDADE J.D., PORTE D. Jr., BIERMAN E.L.. Hypertriglyceridemia : A metabolic consequence of chronic renal failure. *N. Engl. J. Med.* 279; 181-185, 1968.
20. BAGDADE J.D., CASARETTO A., ALBERS J.J.. Effects of chronic uremia, hemodialysis, and renal transplantation on plasma lipids and lipoproteins in man. *J. Lab. Clin. Med.* 87; 37-48, 1976.
21. BAGDADE J.D., ALBERS J.J.. Plasma high-density lipoprotein concentrations in chronic hemodialysis and renal transplant patients. *N. Engl. J. Med.* 296; 1436-1439, 1977.

22. BAGDADE J.D., YEE E., WILSON D.E., SHAFIR E.. Hyperlipidemia in renal failure : studies of plasma lipoproteins, hepatic triglyceride production and tissue lipoprotein lipase in a chronically uremic rat model. *J. Lab. Clin. Med.* 91; 176-186, 1978.
23. BLANKO, ZIN KMAN. Soluble esterases in human tissues : characterization and ontogeny. *Bull. John Hopkins Hospit.* 118; 27-39, 1960.
24. BLATTER M.C., JAMES R.W., MESSMER S., BARJA F., POMETTA D.. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur. J. Biochem.* 211; 871-879, 1993.
25. BRUNZELL J.D., ALBERS J.J., HAAS L.B., GOLDBERG A.P., AGADON L., SHERRARD D.J.. Prevalence of serum lipid abnormalities in chronic hemodialysis. *Metabolism.* 26; 903-910, 1977.
26. CARRO-CIAMPI G., KADAR D., KALOW W.. Distribution of serum paraoxon hydrolyzing activities in Canadian population. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 59; 904-907, 1981.
27. CATTRAN D.C., FENTON S.A., WILSON D.R., STEINER G.. Defective triglyceride removal in lipemia associated with peritoneal and hemodialysis. *Ann. Intern. Med.* 85; 29-33, 1976.
28. CHAN M.K., VARGHESE Z., MOORHEAD J.. Lipid abnormalities in uremia, dialysis and transplantation. *Kid. Int.* 19; 625-637, 1981.
29. CHAN M.K., VARGHESE Z., PERSAUD J., BAILLOD R.A., MOORHEAD J.. Hyperlipidemia in patients on maintenance hemo and peritoneal dialysis: The relative pathogenetic roles of triglyceride production and triglyceride removal. *Clin. Nephrol.* 17; 183-190, 1982.
30. CHAN M.K., PERSAUD J., VARGHESE Z., MOORHEAD J.. Pathogenic roles of post-heparin lipases in lipid abnormalities in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 25; 812-818, 1984.
31. CHAN M.K., VARGHESE Z., PERSAUD J., KINGSTONE D., BAILLOD R.A., MOORHEAD J.. Apolipoprotein B turnover in dialysis patients: Its relationship to pathogenesis of hyperlipidemia. *Clin. Nephrol.* 31;88-95, 1989.

32. CHAN M.K.. Gemfibrozil improves abnormalities of lipid metabolism in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis: The role of post heparin lipases in the metabolism of high-density lipoprotein subfractions. *Metabolism* 38; 939-945, 1989.
33. CHANDER R., KAPOOR N.K.. High density lipoprotein is a scavenger of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 40; 1663, 1990.
34. CRAMP D.G., TICKNER T.R., BEALE D.J., MOORHEAD J.F., WILLS M.R.. Plasma triglyceride secretion and metabolism in chronic renal failure. *Clin. Chim. Acta.* 76; 237-241, 1977.
35. DIEPLINGER H., SCHOENFELD P.Y., FIELDING C.J.. Plasma cholesterol metabolism in end stage renal disease. Difference between treatment by hemodialysis or peritoneal dialysis. *J. Clin. Invest.* 77; 1071-1083, 1986.
36. DRUEKE T., ABDULMASSIH Z., LACOUR B., BADER C., CHEVALIER A., KREIS H.. Atherosclerosis and lipid disorders after renal transplantation. *Kidney Int.* 39; S-24-S-28, 1991.
37. ECKERSON H.W., WYTE C.M., LA DU B.N.. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism, *Am. J. Hum. Genet.* 35; 1126-1138, 1983.
38. ECKERSON H.W., ROMSON J., WYTE C., LA DU B.. The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am. J. Hum. Genet.* 35; 214-227, 1983.
39. ENDEMANN G., STANTON L.W., MADDEN K.S., BRYANT C.M., WHITE R.T., PROTTER A.A.. CD36 is a receptor for oxidised low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 268; 11 811, 1993.
40. ERDOS, DEBAY, WESTERMAN. Arylesterase in blood : effect of calcium and inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 5; 173-186, 1960.
41. ERKELENS D.W., MOCKING J.A.J.. The CII/CIII ratio of transferable apolipoprotein in primary and secondary hypertriglyceridemia. *Clin. Chim. Acta* 121; 59-65, 1982.
42. FRANK W.M., RAO T.K., MANIS T., DELANO B.G., AVRAM M.M., SAXENA A.K., CARTER A.C., FRIEDMAN E.A.. Relationship of plasma lipids to renal function and length of time on maintenance hemodialysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 31; 1886-1892, 1978.

43. FURLONG C.E., COSTA L. G., HASSET C., RICHTER R., SUNSTROM J.A., ADLER D.A., DISTECHE C.M., OMIECINSKI C.J., CHAPLINE C., CRABB J.W., HUMBERT R.. Human and rabbit paraoxonases : cloning, sequencing, mapping and role of polymorphism in organophosphate detoxification. *Chem. Biol. Interactions.* 87; 35-48, 1993.
44. FURLONG C.E., RICHTER R., SEIDEL S.L., MOTULSKY A.G.. Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon. *Am. J. Hum. Genet.* 43; 230-238, 1988.
45. FURLONG C.E., RICHTER R., CHAPLINE C., CRABB J.W.. Purification of rabbit and human serum paraoxonase. *Biochemistry* 30; 10133-10140, 1991.
46. GAN K.N., SMOLEN A., ECKERSON H.W., LA DU B.N.. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase, evidence for one esterase catalyzing both activities, *Drug. Metab. Dispos.* 19; 100-106, 1991;
47. GELDMACHER Von MALLINKRODT M., BAUMGARTNER W., PETENEYI M., BURGIS H., LINDORF H.H., METZNER H.. Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergiftbarkeit der Serum-Cholinesterase durch E 600 und der Aktivitat des E 600-spaltenden Enzym-Systems in menschlichen Seren. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 353; 217-220, 1972.
48. GELDMACHER Von MALLINKRODT M., DEIPGEN T.L.. The human serum paraoxonase polymorphism and specificity. *Toxicol. Environ. Chem.* 18; 79-196, 1988.
49. GOEDDE H.W., ROTHHAMMER H.G., BOGDANSKY. Ecogenetic studies in Atacamenos Indians. *Hum. Genet.* 67 343-346, 1984.
50. GRUTZMACHER P., MARZ W., PESCHKE B., GROSS W., SCHOEPPE W.. Lipoproteins and apolipoproteins during progression of chronic renal disease. *Nephron.* 50; 103-111, 1988.
51. HAAGEN L., BROCK A.. A new automated method for phenotyping arylesterase (EC 3.1.1.2) based upon inhibition of enzymatic hydrolysis of 4Nitrophenyl acetate by phenyl acetate. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* Vol 30; 391-395, 1992.

52. HAHN R., OETTE K., MONDORF H., FINKE K., SIEBERTH H.G.. Analysis of cardiovascular risk factors in chronic hemodialysis patients with special attention to the hyperlipoproteinemias. *Atherosclerosis*. 48; 279-288, 1983.
53. HAIRE H.M., SHERRARD D.J., SCARDAPANE D., CURTIS F.K., BRUZZEL J.D.. Smoking, hypertension and mortality in a maintenance dialysis population. *Cardiovasc. Med.* 7;1163-1168, 1978.
54. HASSET C., RICHTER R.J., HUMBERT R., CHAPLINE C., CRABB J.W., OMIECINSKY C.J., FURLONG C.E., Characterisation of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry*. 30; 10141-10149, 1991.
55. HEUCK C.C., LIERSCH M., RITZ E., STEIGMEIER K., WIRTH A., MEHLS O.. hyperlipoproteinemia in experimental chronic renal insufficiency in the rat. *Kidney Int.* 14; 142-150, 1978.
56. HEUCK C.C., RITZ E.. Hyperlipoproteinemia in renal insufficiency. *Nephron* 25; 1-7, 1980.
57. HERNANDEZ A.F., PLA A., VALENZUELA A., GIL F., VILLANUEVA E.. Characterisation of paraoxonase activity in pericardial fluid : usefulness as a marker of coronary disease. *Chem. Biol. Interactions*. 87; 173-177, 1993.
58. HSIA S.L., PEREZ G.O., MENDEZ A.J., SCHIFFMAN J., FLETCHER S., STOUDEMIRE J.B.. Defect in cholesterol transport in patients receiving maintenance hemodialysis. *J. Lab. Clin. Med.* 106; 53-61, 1985.
59. HUGGINS C., LAPIDES J.. Chromogenic substrates IV. Acyl esters of p-nitrophenol as substrates for the colorimetric determination of esterase. *J. Biol. Chem.* 170, 467-482, 1947.
60. HUMBERT R., ADLER D.A., DISTECHE C.M., HASSETT C., OMIECINSKI C.J., FURLONG C.E.. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat. Genet.* 3; 73, 1993.
61. HUTTUNEN J.K., PASTERNNACK A., VANTINEN T., EHNHOLM C., NIKKILA E.A.. Lipoprotein metabolism in patients with chronic renal failure. *Acta Med. Scand.* 204; 211-218, 1978.

62. IBELS L.S., SIMONS L.A., KING J.O., WILLIAMS P.F., NEALE F.C., STEWART J. H.. Studies on the nature and causes of hyperlipidemia in uremia, maintenance dialysis and renal transplantation. *Q. J. Med.* 44; 601-614, 1975.
63. IBELS L.S., ALFREY A.C., HUFFER W.E., CRASWELL P.W., ANDERSON J.J., WEIL R.. Arterial calcification and pathology in uremic patients undergoing dialysis. *Am. J. Med.* 66; 790-796, 1979.
64. JUNGE W., KLEES H.. Arylesterase, in : *Methods of enzymatic analysis*, vol IV (Bergmeyer H.U., Grassl eds), Verlag Chemie Gmbh, Weinheim, 8-14, 1984.
65. KAWAI H., SAKAMOTO F., INOUE Y.. Improved specific assay for serum arylesterase using a water soluble substrate. *Clinica Chimica Acta.* 188; 177-182, 1990.
66. KELSO G.J., STUART W.D., RICHTER R.J., FURLONG C.E., JORDAN-STACK T., HARMONY J.A.K.. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry.*33; 832-839,1994.
67. KLIMOV A.N., KOZHEMYAKIN L.A., PLESKOV V.M., ANDREEVA L.I.. Antioxydative effect of high density lipoprotein in the oxydation of low density lipoproteins. *Bull. Exp. Biol. Med.* 103; 550, 1987.
68. KLIMOV A.N., GUREVICH V.S., NIKIFOROVA A.A., SHATILINA L.V., KUZMIN A.A., PLAVINSKY S.L., TERYUKOVA N.P.. Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo. *Atherosclerosis.* 100; 13, 1993.
69. KOCH C.D., BLOCK H., MOLZ J.. Zur bestimmung der arylesteraktivität im menschlichen serum mit 4-nitrophenilazetat. *Zeitschrift für Gastroenterologie.* 8; 695-703,1975.
70. KODOMA T., FREEMAN M., ROHRER L., ZABRECKY J., MATSUDAIRA P., KREIGER M.. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen like coiled coils. *Nature* 343; 531, 1990.
71. KRISCH K. Enzymatische Hydrolyse von Diathyl p-nitrophenyl phosphat (E 600) durch menschliches serum . *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 1; 41-45 , 1968.
72. KUNITATE S.T., JARVIS M.R., HAMILTON R.L., KANE J.P.. Binding of transition metals by apolipoprotein A-1 containing plasma lipoproteins: inhibition of low density lipoproteins. *Proc. natl. acad. Sci. USA* 89; 6993, 1992.

73. LACOUR B., ROULLET J.B., BEYNE P., KREIS H., THEVENIN M., DRUEKE T.. Comparison of several atherogenicity indices by the analysis of serum lipoprotein composition in patients with chronic renal failure with or without hemodialysis and in renal transplant patients. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 23; 805-810,1985.
74. LA DU B.N., SNADY H.. Esterases of human tissues, *Handbook of Experimental Pharmacology new series*. vol 28/2, ed by Brodie, Gillette, Berlin, Springer-Verlag, 1971, 477-499.
75. LA DU B.N., ADKINS S., BAYOUMI R.A.L.. Analysis of the serum paraoxonase/arylesterase polymorphism in some sudanese families, in : KALOW W., GOEDDE H.W., AGARWAL D.P. (Eds), *Ethnic Differences in Reactions to Drugs and Xenobiotics*. LISS A.R., New York, 87-98, 1986.
76. LA DU B.N., Human serum paraoxonase/arylesterase, in KALOW W. (Ed). *Pharmacogenetics of drug metabolism*. Pergamon Press, New York, 1992, 51-91.
77. LA DU B.N., ADKINS S., KUO C.L., LIPSIG D., Studies on human serum paraoxonase/arylesterase. *Chem. Biol. Interactions.* 87; 25-34, 1993.
78. LINDHOLM B., NORBECK H.E.. Serum lipids and lipoproteins during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Acta Med. Skand.* 220; 143-151, 1986.
79. LIU K., CUDDY T.E., PIERCE G.N.. Oxidative status of lipoproteins in coronary disease patients. *Am. Heart J.* 123; 285, 1992.
80. MACKNESS M.I., WALKER C.H.. 'A'-esterases and arylesterases in the lipoprotein fraction of sheep serum. *Biochem. Pharmacol.* 30; 903, 1981.
81. MACKNESS M.I., THOMPSON H.M., HARDY A.R., WALKER C.H.. Distinction between 'A'-esterase and arylesterase. *Biochem J.* 245; 293-296, 1987.
82. MACKNESS M.I.: 'A'-esterases: enzymes looking for a role? *Biochem. Pharmacol.* 38; 385-390, 1989.
83. MACKNESS M.I., HARTY D., BHATNAGAR D., WINOCOUR P.H., ARROL S., ISHOLA M., DURRINGTON P.N.. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 86; 193-199, 1991.
84. MACKNESS M.I., ARROL S., DURRINGTON P.N.. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein. *FEBS.* Vol 286 (1,2); 152-154, 1991.

85. MACKNESS M.I., ARROL S., ABBOTT C., DURRINGTON P.N.. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*. 104; 129-135, 1993.
86. MACKNESS M.I., ARROL S., ABBOTT C., DURRINGTON P.N.. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem. J.* 294; 829-835, 1993.
87. MACKNESS M.I., ARROL S., ABBOTT C., DURRINGTON P.N.. Is paraoxonase related to atherosclerosis? *Chem. Biol. Interactions*. 87; 161-171, 1993.
88. MACKNESS M.I., DURRINGTON P.N.. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*. 115; 243-253, 1995.
89. McELVEEN J., MACKNESS M.I., COLLEY C.M., PEARD T., WARNER S., WALKER C.H.. Distribution of paraoxon hydrolytic activity of patients after myocardial infarction. *Clin. Chem.* 32; 671, 1986.
90. NESTEL P.J., FIDGE N.H., TAN M.H.. Increased lipoprotein-remnant formation in chronic renal failure. *N. Engl. J. Med.* 307; 329-333, 1982.
91. NICHOLS J., CUMMING A.M., CATTO G.R.D., EDWARD N., ENGESET J.. Lipid relationship in dialysis and renal transplant patients. *Q. J. Med.* 198; 149-160, 1981.
92. NISHIGAKI I., HAGIHARA M., TSUNEKAWA H., MASEKI M., YAGI K.. Lipid peroxyde levels of serum lipoprotein fractions of diabetic patients. *Biochem; Med.* 25; 378, 1991.
93. NORBECK H.E., ORO L., CARLSON L.A.. Serum lipoprotein concentration in chronic uremia. *Am. J. Clin. Nutr.* 31; 1881-1885, 1978.
94. NORBECK H.E., CARLSON L.A.. Increased frequency of late pre- β lipoprotein (LP β) in isolated serum very low-density lipoproteins in uremia. *Eur. J. Clin. Invest.* 10; 423-426, 1980.
95. NORBECK H.E., CARLSON L.A.. The uremic dyslipoproteinemia: its characteristics and relations to clinical factors. *Acta Med. Scand.* 209; 489-503, 1981.
96. PAPDOPOULOU Z.L., SANDLER P., TINA L.U., JOSE P.A., CALGAGON P.L.. Hyperlipidemia in children with chronic renal insufficiency. *Pediatr. Res.* 15; 887-891, 1981.

97. PAPADOPOULOS N.M., BORER W.Z., ELIN R.J., DIAMOND L.H.. An abnormal lipoprotein in the serum of uremic patients maintained on chronic hemodialysis. *Ann. Intern. Med.* 92; 634-635, 1980.
98. PARSY D., DRACON M., CACHERA C., PARRA H-J., VANHOUTTE G., TACQUET A., FRUCHART J-C.. Lipoprotein abnormalities in chronic hemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 3; 51-56, 1988.
99. PARTHASARATHY S., YOUNG S.G., WITZTUM J.L., PITTMAN R.C., STEINBERG D. Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* 77; 641-644, 1986.
100. PARTHASARATHY S., BARNETT J., FONG L.G.: High-density lipoprotein inhibits the oxydative modification of low-density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Acta.* 1044; 275-283, 1990.
101. PASTERNAK A., VANTINEN T., SOLAKIVI T., KUUSI T., KORTE T.. Normalization of lipoprotein lipase and hepatic lipase by gemfibrozil results in correction of lipoprotein abnormalities in chronic renal failure. *Clin. Nephrol.* 27; 163-168, 1987.
102. PAVKOVIC E., SIMEON V., REINER E., SUCIC M., LIPOVAC V.. Serum paraoxonase and cholinesterase activities in individuals with lipid and glucose metabolism disorders. *Chem. Biol. interactions.* 87;179-182, 1993.
103. PLAYFER J.R., EZE L.C., BULLEN M.F., EVANS D.A.P.. Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity. *J. Med. Genet.* 13; 337-342, 1976.
104. RENGSTROM J., NILSSON J., TORUVALL P., LAUDOU C., HAMSTEN A.. Susceptibility to low density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* 339;1183, 1992.
105. RIESEN W.F., MORDASINI R.. Hyperlipidemia in renal failure: phenotypes and pathogenic mechanisms. *Contrib. Nephrol.* 41; 312-320, 1984.
106. RITZ E., AUGUSTIN J., BOMMER J., GRASSO A., HABERBOSCH W.. Should hyperlipidemia of renal failure be treated? *Kidney Int.* 28 (S17) ; 584-587, 1985.
107. ROH D.D., KWAK P., NELSON D., KAMANNA V.S., KIRSCHENBAUM M.A.. Effect of dietary cholesterol on rat glomerular cholesterol esterase. *Am. J. Nephrol.* 13; 478-482,1993.

108. ROHRER L., FREEMAN M., KODAMA T., PENMAN M., KRIEGER M.. Coiled coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II. *Nature* 343; 570, 1990.
109. RON D., OREN I., AVIRAM M., BETTER O.S., BROOK J.G.,. Accumulation of lipoprotein remnants in patients with chronic renal failure. *Atherosclerosis* 46; 67-75,1983.
110. ROULLET J-B., LACOUR B., YVERT J-P., PRAT J-J., DRUEKE T.. factors of increase in serum triglyceride-rich lipoproteins in uremic rats. *Kidney Int.* 27; 420-425, 1985.
111. ROULLET J-B., LACOUR B., YVERT J-P., DRUEKE T.. Correction by insulin of disturbed TG-rich LP metabolism in rats with chronic renal failure. *Am. J. Physiol.* 250; E373-376, 1986.
112. RUBIES-PRAT J., ROMERO R., CHACON P., MASDEN S., GRINO G., CARALPS A.. Apoprotein A and B in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis and in renal graft recipients. *Nephron* 35; 171-174, 1983.
113. RUIZ J., BLANCHE H., JAMES R.W., BLATTER GARIN M-C., VAISSE C., CHARPENTIER G., COHEN N., MORABIA A., PASSA P., FROGUEL P.. Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet*, 346, 869-872, 1995.
114. SAHA N., ROY A.C., TEO S.H., TAY J.S.H., RATAM S.S.. Influence of serum paraoxonase polymorphism on serum lipids and apolipoproteins. *Clinical Genetics* 40; 277-282,1991.
115. SALONEN J.T., YLA-HERTTUALA S., YAMAMOTO R., BUTLER S., KORPELA M, SALONEN R. et al. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 339; 883, 1992.
116. SANFELIPPO M.L., SWENSON R.S., REAVEN G.M.. Reduction of plasma triglycerides by diet in subjects with chronic renal failure. *Kidney Int.* 11; 54-64, 1977.
117. SAVDIE E., GIBSON J.C., CRAWFORD G.A., SIMONS L.A., MAHONEY J.F.. Impaired plasma triglyceride clearance as a feature of both uremic and post transplant triglyceridemia. *Kidney Int.* 18; 774-782, 1980.

118. SCHRADER J., STIBBE W., AMSTRONG V.W., KANDT M., MUCHE R., KÖSTERING H., SEIDEL D., SCHELLER F.. Comparison of low molecular weight heparin to standard heparin in hemodialysis/hemofiltration. *Kidney Int.* 33; 890-896, 1988.
119. SERRATO M., MARIAN A.J.. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J. Clin. Invest.* 96, 3005-3008, 1995.
120. SIMEON V., PAVKOVIC E.. Heat inactivation of paroxonase and arylesterase activities in human and rabbit serum. *Chem. Biol. interactions.* 87; 103-107, 1993.
121. SMOLEN A., ECKERSON H.W., GAN K.N., LA DU B.N.. Characteristics of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug. Metab. Dispos.* 19; 107-112, 1991.
122. SNIDERMAN A., CIANFLONE K., KWITEROVICH P.O. Jr., HUTCHINSON T., BARRE P., PRICHARD S.. Hyperapobetalipoproteinemia: the major dyslipoproteinemia in patients with chronic renal failure treated with chronic ambulatory peritoneal dialysis. *Atherosclerosis.* 65; 257-264, 1987.
123. S-PLUS. Statistical Sciences, Inc. version 3.2 pour windows. Seattle, USA. 1994.
124. STANTON L.W., WHITE R.T., BRYANT C.M., PROTTER A.A., ENDEMANN G.. The macrophage Fc receptor for IgG is also a receptor for oxydised low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 267; 22 246,1992.
125. STAMPFER M.J., HENNEKENS C.H., MANSON J.E., COLDITZ G.A., ROSNER B., WILLETT W.C.. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *New Engl. J. Med.* 328; 144-1448, 1993.
126. STEINBRECHER U.P., LOUGHEED M., KAWAN W-C, DIRKS M. Recognition of oxidised low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoprotein B by products of fatty acid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 264-15; 216, 1989.
127. URIEL A.: Caractérisation des cholinestérases et d'autres estérases carboxyliques après électrophorèse et immunoelectrophorèse en gélose, I: applications à l'étude des estérases du sérum humain normal. *Ann. Institut. Pasteur.* 101:104, 1961.
128. VALERI A., GELFAND J., BLUM C., APPEL G.B.. Treatment of hyperlipidemia of the nephrotic syndrome: a controlled trial. *Am. J. Kidney Dis.* 8; 388-396, 1986.

129. VINCENTI F., AMEND W.J., ABELE J., FEDUSKA N.J., SALVATIERRA O.. The role of hypertension in hemodialysis associated atherosclerosis. *Am. J. Med.* 68; 363-369, 1980.
130. WATSON A.D., BERLINER J.A., HAMA S.Y., LA DU B.N., FAULL K.F., FOGELMAN A. M., NAVAB M.. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* 96, 2882-2891, 1995.
131. WILKINS G.M., MACKNESS M.I., DURRINGTON P.N., LEAKE L.S.. Prevention of macrophage oxidation of low density lipoprotein by paraoxonase. Meeting on modified lipoprotein , Whistler, Canada, October 1994.
132. WINDLER E., HAVEL R.J.. Inhibitory effects of apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. *Lipid Res.* 27; 556-565, 1985.
133. WITZTUM J.L., STEINBERG D.: Role of oxidised high-density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 88;1785-1792, 1991.
134. WITZTUM J.L.. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* , 344; 793-795, 1994.
135. YLA-HERTTUALA S., ROSENFELD M.E., PARTHASARATHY S, GLASS C.K., SIGAL E., WITZTUM J.L., STEINBERG D.. Colocalisation of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87; 6959, 1990.
136. ZACHELLO G., PAGNAN A., SIDRAN L.P., ZIRON L., BRAGGION M., PAVANELLO M., FACCHIN P.. Further definition of lipid lipoprotein abnormalities in children with various degrees of chronic renal insufficiency. *Pediatr. Res.* 21; 462-465, 1987.
137. ZECH R., ZURCHER K.. Organophosphate splitting serum enzymes in different mammals. *Comp. Biochem. Physiol. (B)* 48; 427-433, 1974.
138. ZECH R., ROCKSEISEN M., KLUGE K., DEWALD K., ARMSTRONG V.W., CHEMNITIUS J.M.. Lipoproteins and hydrolysis of organophosphorus compounds. *Chem. Biol. Interactions.* 87; 85-94, 1993.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	8
L'ARYLESTERASE	10
<u>I. NATURE ET STRUCTURE</u>	11
I.1. <i>Classification de l'enzyme</i>	11
I.2. <i>Substrats de l'enzyme</i>	11
I.3. <i>Structure</i>	12
I.4. <i>Métabolisme</i>	14
<u>II. PROPRIETES</u>	14
II.1 <i>Polymorphisme génétique de l'aryléstérase</i>	14
II.1.a. <i>Répartition trimodale de l'activité aryléstérase</i> <i>chez l'homme</i>	14
II.1.b. <i>Intérêt du calcul du rapport « activité paraoxonase</i> <i>/ activité aryléstérase »</i>	16
II.2. <i>Autres propriétés</i>	17
<u>III. IMPLICATIONS PATHOLOGIQUES</u>	18
III.1. <i>Aryléstérase et toxicologie</i>	18
III.2. <i>Aryléstérase et athéromatose</i>	18
III.3. <i>Aryléstérase et risque cardio-vasculaire</i>	21

MATERIEL ET METHODES	24
I. <u>SUJETS</u>	25
II. <u>METHODES</u>	26
III. <u>TECHNIQUES DE DOSAGES</u>	27
III.1. <i>Dosage de l'activité arylestérase utilisant le phénylacétate</i>	
<i>comme substrat</i>	<i>27</i>
III.2. <i>Dosage de l'activité arylestérase utilisant le 4-nitrophénylacétate</i>	
<i>comme substrat</i>	<i>30</i>
III.3. <i>Dosage de l'activité arylestérase utilisant le paraoxon</i>	
<i>comme substrat</i>	<i>31</i>
IV. <u>TRAITEMENT STATISTIQUE</u>	33
 RESULTATS	 36
I. <u>ACTIVITE ARYLESTERASE DE LA POPULATION TEMOIN</u>	37
II. <u>ACTIVITE ARYLESTERASE DES MALADES INSUFFISANTS RENAU</u>	
<u>CHRONIQUES NON DIALYSES, DIALYSES ET TRANSPLANTES</u>	40

DISCUSSION.....	44
I. ARYLESTERASE ET VIEILLISSEMENT VASCULAIRE	45
II. ARYLESTERASE ET INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE	49
II.1 Athéromatose et insuffisance rénale chronique	49
II.2. Activité arylestérase au cours de l'insuffisance rénale chronique.....	52
II.3. Activité arylestérase au cours de l'insuffisance rénale chronique après transplantation rénale.....	55
CONCLUSION.....	57

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Reconnaissant envers mes maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères et s'ils devaient entreprendre la Médecine ou recourir à mes soins, je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné à jamais de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole, et que je me parjure, puisse-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 60

94

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER
LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

Résumé : L'arylesterase ou paraoxonase est une estérase ayant une action protectrice contre l'intoxication par les composés organo-phosphorés comme le parathion. Son substrat physiologique est inconnu, mais récemment il a été mis en évidence un lien étroit entre cette enzyme et certaines sous-classes de lipoprotéines de haute densité et un rôle protecteur de l'arylesterase contre l'athéromatose, par l'intermédiaire d'un effet antioxydant qu'elle exercerait en relation avec les HDL, a été suggéré.

L'activité de l'arylesterase se répartit au sein de la population caucasienne en deux groupes génétiquement définis par l'expression de deux allèles du chromosome 8. Cette activité s'est révélée abaissée dans des populations atteintes de maladies du métabolisme lipidique. Dans un travail antérieur, nous avons remarqué qu'il existait une diminution de l'activité arylesterase avec l'âge.

Compte tenu de la prévalence de la maladie cardio-vasculaire chez l'insuffisant rénal chronique, ce travail a consisté à mesurer cette activité enzymatique par spectrophotométrie, à l'aide de trois esters de synthèse, le phénylacétate, le paraoxon (diéthyl-4-nitrophényl-phosphate) et le 4-nitrophénylacétate, dans le sérum de 195 sujets de référence (120 femmes, 75 hommes, âge moyen : $50,5 \pm 24,5$ ans, âges extrêmes : 17 à 105 ans), 47 insuffisants rénaux chroniques non dialysés (20 femmes, 27 hommes, âge moyen : $62,5 \pm 17,5$ ans, âges extrêmes : 17 à 86 ans), de 104 hémodialysés (40 femmes, 64 hommes, âge moyen : $58,5 \pm 15$ ans, âges extrêmes : 20 à 83 ans), de 22 dialysés péritonéaux (10 femmes, 12 hommes, âge moyen : $63 \pm 18,5$ ans, âges extrêmes 23 à 85 ans) et chez 132 patients transplantés rénaux (62 femmes, 70 hommes, âge moyen : $46,5 \pm 12$ ans, âges extrêmes : 16 à 68 ans). L'activité arylesterase est effondrée dans la population hémodialysée ($p < 10^{-4}$) et en dialyse péritonéale ($p < 10^{-4}$) et est abaissée de façon significative chez les patients insuffisants rénaux chroniques non dialysés ($p < 0,05$). Les patients transplantés ont une activité arylesterase comparable à celle des sujets de référence .

La diminution de l'activité de l'arylesterase et donc la perte de son rôle protecteur contre l'athérosclérose pourrait constituer un facteur important des troubles du métabolisme lipidique et du vieillissement vasculaire prématuré de l'insuffisant rénal chronique, en particulier lorsqu'il est traité par une méthode substitutive de dialyse. La transplantation rénale semble restaurer cette activité enzymatique.

mots clés : paraoxonase, arylesterase, athérosclérose, insuffisance rénale chronique, transplantation.