

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1995



N° 44

EFFETS D'UNE PERFUSION DE TRIGLYCERIDES
SUR LE SYSTEME DE DEFENSE ANTIOXYDANTS
ET SUR LE METABOLISME LIPIDIQUE
CHEZ LE DIABETIQUE DE TYPE 2.

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
obtenu après soutenance du

MEMOIRE
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

présentée et soutenue publiquement
le 16 octobre 1995 à BORDEAUX

par

Hélène, DEUFFIC épouse KARQUEL

née le 05 mai 1966 à DINAN

JURY

Monsieur le Professeur Etienne JOUZIER

Monsieur le Professeur André CASSAIGNE

Monsieur le Professeur Henri GIN

Monsieur le Docteur Albert IRON

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur RABY Claude

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

Monsieur DREYFUSS Gilles – Maître de Conférences

PROFESSEURS:

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE
BERNARD Michel	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
LEFORT DES YLOUSES Daniel	PHARMACIE GALENIQUE
MOESCH Christian	HYGIENE
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
PENICAUT Bernard	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
RABY Claude	PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A notre Président de Jury,

Monsieur le Professeur Etienne JOUZIER
Professeur de Biochimie Pharmaceutique à l'Université de
Bordeaux 2
Praticien Hospitalier, Chef de Service

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.
Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect.

A notre Directeur de Thèse,

Monsieur le Docteur Albert IRON
Maître de Conférence de Nutrition (Biochimie et Biologie
Moléculaire) à l'Université de Bordeaux 2
Praticien Hospitalier
Docteur ès-Sciences Pharmaceutiques

Vous avez accepté de diriger ce travail de thèse sans me connaître.
Je n'ai pu alors qu'apprécier vos qualités humaines et votre
professionnalisme.
Soyez remercié par ce travail dont je souhaite qu'il vous aura satisfait.

Remerciements

A toute l'équipe du laboratoire de biochimie de Pellegrin, pour sa disponibilité, ses conseils, sa gentillesse et sa participation à ce travail en tant que sujets témoins.

Au personnel soignant du 4^{ème} aile 3, pour son aide précieuse dans le bon déroulement du protocole.

Au personnel soignant du 9^{ème} aile 3 pour sa coopération dans la recherche de sujets témoins qui n'ont finalement pas convenu, son accueil et sa gentillesse.

A Vincent RIGALLEAU, pour son accueil et ses conseils.

A Cyrille,

A Laure et Pauline,

A mes Parents et ma famille,

A mes amis.

PLAN

I - INTRODUCTION

II - METABOLISME LIPIDIQUE ET DNID: REVUE DE LA LITTERATURE

A. GENERALITES

1. LIPOPROTEINES

11. Structure des lipoprotéines et remaniements

12. Classification et concept de particule lipoprotéique

121. Classification en fonction de critères physicochimiques

a) Electrophorèse de zone

b) Ultracentrifugation de flottation

c) Méthodes de précipitation sélective

d) Comparaison de ces différentes techniques

122. Classification en fonction de la composition en apolipoprotéines

13. Métabolisme des lipoprotéines: rappel .

131. Apports lipidiques

a) Apports exogènes

b) Apports endogènes

132. Métabolisme des lipoprotéines intestinales

133. Métabolisme des VLDL et LDL

134. Métabolisme des HDL

2. PEROXYDATION LIPIDIQUE ou LIPOPEROXYDATION

21. La réaction radicalaire

211. Notion de radical libre

212. Principaux radicaux libres impliqués dans la lipoperoxydation

213. Processus en 3 phases

a) Initiation

b) Propagation

c) Terminaison

214. Conséquences de la réaction radicalaire

22. Systèmes de protection

221. Systèmes de protection intracellulaires

a) Enzymes cytosoliques

b) Antioxydants

222. Les systèmes de protection extracellulaires:

23. Evaluation de la lipoperoxydation : marqueurs

B. DESEQUILIBRE DU METABOLISME LIPIDIQUE DU DNID

1. TROUBLES LIPIDIQUES

- 11. Rôle de l'insuline dans le métabolisme lipidique**
- 12. Interrelation entre les métabolismes du glucose et des lipides**
- 13. Conséquences d'une carence relative en insuline sur le métabolisme lipidique**

2. AUGMENTATION DE LA LIPOPEROXYDATION DANS LE DNID

- 21. Elévation du taux de MDA plasmatique et érythrocytaire**
- 22. Elévation du taux de diènes conjugués plasmatiques**
- 23. Diminution du taux de SOD érythrocytaire**
- 24. Modification des taux de glutathion peroxydase, glutathion réductase et catalase**
- 25. Diminution du taux de thiols plasmatiques**
- 26. Anomalies du métabolisme des oligoéléments**
- 27. Augmentation du taux de LDL oxydées**
- 28. Conclusion**

3. CONSEQUENCES DE CE DESEQUILIBRE: RISQUE ATHEROGENE

- 31. Constitution de la plaque d'athérome**
- 32. Facteurs de risque d'athérosclérose**
- 33. Facteurs de risque du sujet DNID**
 - 331. Anomalies lipidiques**
 - 332. Hyperglycémie**
 - 333. Hyperinsulinisme**
 - 334. Coagulation et fibrinolyse**
 - 335. Nouveaux facteurs de risque**

C. METHODES D'ETUDE DU METABOLISME LIPIDIQUE CHEZ LE SUJET DNID

1. EXPLORATION STATIQUE OU DYNAMIQUE

- 11. Exploration statique**
- 12. Exploration dynamique**

2. PROTOCOLES PARTICULIERS

III - NOTRE TRAVAIL : ETUDE DES PARAMETRES LIPIDIQUES ET DU SYSTEME DE DEFENSE ANTIOXYDANTS CHEZ LE DIABETIQUE DE TYPE 2 SOUMIS A UNE PERFUSION DE TRIGLYCERIDES SUIVIE D'UNE NORMALISATION DE SA GLYCEMIE PAR INSULINE

A. INTRODUCTION

B. MATERIEL ET METHODES

1. SUJETS ETUDIES

- 11. Sujets DNID**
- 12. Sujets témoins**

2. PROTOCOLE D'ETUDE

3. METHODES

31. Prélèvements sanguins

32. Méthodes de dosage

321. Bilan lipidique

- a) Cholestérol total
- b) Triglycérides
- c) Phospholipides
- d) Cholestérol HDL
- e) Lipoprotéinogramme
- f) Apolipoprotéines A1, CII, CIII et E
- g) Lipoprotéine (a)
- h) Lipoparticules LP A1, LP CIII et LP E
- i) Apolipoprotéine AII
- j) Acides gras non estérifiés

322. Glycémie

323. Stress oxydatif

- a) Glutathion peroxydase plasmatique
- b) Etat total antioxydant

4. ANALYSE STATISTIQUE

C. RESULTATS

1. SUJETS ETUDIES

- 11. Caractères démographiques**
- 12. Paramètres lipidiques**
- 13. Le stress oxydatif**

2. SUJETS DNID

21. Paramètres lipidiques classiques

- 211. Effet de charge lipidique
- 212. Entre T0+3h et T0+6h
- 213. Effet normoglycémique

22. Apolipoprotéines et lipoparticules

- 221. Effet de charge lipidique
- 222. Entre T0+3h et T0+6h
- 223. Effet normoglycémique

23. Stress oxydatif

- 231. Evolution dans le protocole
 - a) Effet de charge lipidique
 - b).Entre T0+3h et T0+6h
 - c) Effet normoglycémique
- 232. Evolution par rapport aux témoins
- 233. Stress oxydatif et équilibre glycémique

D. DISCUSSION**1. CONCERNANT LES SUJETS TEMOINS**

- 11. Caractères démographiques et lipidiques
- 12. Stress oxydatif

2. CONCERNANT LES SUJETS DNID**21. Sur les paramètres lipidiques classiques**

- 211. Bilan de base
- 212. Effet de charge lipidique
- 213. Entre T0+3h et T0+6h
- 214. Effet normoglycémique

22. Sur les apolipoprotéines et lipoparticules

- 221. Bilan de base
- 222. Effet de charge lipidique
- 223. Entre T0+3h et T0+6h
- 224. Effet normoglycémique

23. Sur le stress oxydatif

- 231. Bilan de base
- 232. Effet de charge lipidique
- 233. Entre T0+3h et T0+6h
- 234. Effet normoglycémique

IV - CONCLUSION**V - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

ABREVIATIONS

AG	:	acide gras
AGL	:	acide gras libre
AGPI	:	acide gras polyinsaturé
Apo	:	apolipoprotéine
CE	:	cholestérol estérifié
CETP	:	protéine de transfert du cholestérol estérifié (cholesterol ester transfer protein)
CL	:	cholestérol libre
CPG	:	chromatographie en phase gazeuse
d	:	densité
ETA	:	état total antioxydant
GNE	:	glycosylation non enzymatique
GPX	:	glutathion peroxidase
HDL	:	lipoprotéine de haute densité
IDL	:	lipoprotéine de densité intermédiaire
LCAT	:	lécithine cholestérol acyl transférase
LDL	:	lipoprotéine de basse densité
LP	:	lipoparticule
Lp (a)	:	lipoprotéine (a)
LPL	:	lipoprotéine lipase
LPX	:	lipoperoxydation
LRP	:	récepteur spécifique des apo E (low density lipoprotein receptor related protein)
LTP	:	protéine de transfert des lécithines
MDA	:	malondialdéhyde
mmol/l:		millimole par litre
nm	:	nanomètre
PAI	:	inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PL	:	phospholipides
pl.GPX:		glutathion peroxidase plasmatique
SDAO	:	système de défense antioxydants
SOD	:	superoxyde dismutase
TIC	:	transport inverse du cholestérol
TG	:	triglycéride
TGLH	:	triglycéride lipase hépatique
VHDL	:	lipoprotéine de très haute densité
VLDL	:	lipoprotéine de très basse densité

I. INTRODUCTION

Le diabète sucré, qui s'identifie sur la présence d'une hyperglycémie chronique, est une maladie métabolique hétérogène; la définition du diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant (DNID) s'appuie sur des critères d'exclusion (72). Malgré certaines inconnues concernant sa nature et ses étiologies (4), le DNID repose sur trois types d'anomalies: anomalies de l'insulinosécrétion, augmentation du débit glucosé hépatique, insulino-résistance (16, 34).

Les troubles insuliniques observés dans le diabète de type 2 sont à l'origine de troubles métaboliques variés et notamment de modifications du métabolisme lipidique.

Le déséquilibre lipidique observé chez le sujet DNID pourrait jouer un rôle majeur dans la survenue des complications vasculaires, d'autant que la surmortalité du sujet diabétique est essentiellement en relation avec l'athérosclérose (5).

La peroxydation lipidique apparaît également intimement liée à la constitution de la plaque d'athérome (26). La glycation de certaines lipoprotéines induite par l'hyperglycémie pourrait favoriser la lipoperoxydation (12).

Dans ces conditions, il nous a semblé intéressant d'étudier les paramètres lipidiques et le système de défense antioxydants (SDAO) chez le diabétique de type 2 soumis à une perfusion d'Ivélip (émulsion de triglycérides) suivie d'une normalisation de sa glycémie par insulinothérapie continue. Ce protocole permet en effet l'étude du SDAO dans des conditions de charge lipidique et d'hyperglycémie susceptibles d'augmenter la lipoperoxydation; il permet aussi de connaître l'évolution de ce même système en situation normoglycémique.

Dans une première partie, après quelques rappels sur les lipoprotéines et la lipoperoxydation, nous exposerons les anomalies du métabolisme des lipides et de la lipoperoxydation décrites chez les sujets DNID à travers la littérature. Nous présenterons ensuite notre travail, le protocole utilisé et les résultats obtenus afin d'ouvrir une discussion.

**II. METABOLISME LIPIDIQUE ET DNID:
REVUE DE LA LITTERATURE**

A. GENERALITES.

1. LIPOPROTEINES.

Les lipides sont une classe de composés d'intérêt énergétique et essentiels au métabolisme cellulaire en intervenant notamment dans la biosynthèse des membranes et comme précurseurs de biomolécules spécifiques (hormones, vitamines,...).

Insolubles, ils circulent dans le plasma humain sous forme d'associations moléculaires appelées les *lipoprotéines*.

11. Structure des lipoprotéines et remaniements

Les lipoprotéines sont des macromolécules obtenues par association de *lipides hydrophobes* (cholestérol estérifié, triglycérides) ou *hydrophiles* (cholestérol libre, phospholipides) et de protéines (*apolipoprotéines*) dont les principales sont les apo AI, AII, AIV, B48, B100, CI, CII, CIII, D, E, (a).

Ces apolipoprotéines, outre leur rôle structural, interviennent dans toutes les étapes du métabolisme des lipoprotéines: biosynthèse, sécrétion, maturation et transformation plasmatique (certaines sont des effecteurs d'enzymes du métabolisme des lipoprotéines), échanges de constituants avec les cellules de l'organisme, catabolisme (les apolipoprotéines sont les ligands des récepteurs des lipoprotéines) (17). Elles diffèrent entre elles par leur structure primaire, leur conformation et leur rôle biologique.

Leurs principales caractéristiques et fonctions sont résumées dans le tableau I.

Les lipoprotéines peuvent aussi contenir des enzymes nécessaires à leur métabolisme (LCAT, CETP) ainsi que d'autres molécules (sels biliaires, peptides...) n'appartenant pas à la structure de la lipoprotéine.

Elles ont une structure globalement sphérique de diamètre compris entre 10 nm et 1 μ m, dont le noyau est constitué de lipides hydrophobes alors que l'enveloppe contient les lipides hydrophiles et les apolipoprotéines (fig. 1). L'association lipides-protéines est favorisée par la nature hydrophobe de certaines régions des apolipoprotéines (17). Ainsi, la plupart des apolipoprotéines (sauf les apo D et (a)) présentent dans leur structure secondaire des régions organisées en α hélice amphiphile qui ont une forte affinité pour les phospholipides. L'apo B comporte en plus des régions en feuillet β . Quant à l'apo (a), elle présente une structure en "kringles" proche de celle du plasminogène.

Apolipo-protéines	Masse moléculaire (daltons)	Site de synthèse	Fonction
A-I	28300	Intestin, foie	- Protéine de structure des HDL - Activateur de la LCAT et du transport inverse du cholestérol (TIC) - Ligand pour les récepteurs des HDL
A-II	17400	Intestin, foie	- Protéine de structure des HDL - Activateur de la TGLH - Inhibiteur du TIC - Ligand pour les récepteurs des HDL
A-IV	46000	Intestin, foie	- Activateur de la LCAT - Activateur du TIC
B 100	549000	Foie	- Protéine de structure des LDL et VLDL hépatiques - Ligand pour les récepteurs des LDL
B 48	265000	Intestin	- Protéine de structure des chylomicrons et des VLDL intestinales, nécessaire à leur sécrétion
C-I	6500	Foie	- Activateur de la LCAT
C-II	8900	Foie, intestin	- Activateur de la LPL
C-III	9000	Foie, intestin	- Inhibiteur de la LPL
D	33000	Gonades, rein placentaire, foie...	- Rôle dans le transfert du cholestérol des HDL vers les particules de basse densité
E	39000	Foie, cerveau, intestin, muscles, macrophages...	- Ligand pour les récepteurs hépatiques à apo E: catabolisme des chylomicrons et VLDL - Ligand pour les récepteurs à apo B/E: catabolisme des LDL et VLDL
(a)	300000 à 700000	Foie	- Protéine de structure de la Lp(a)

Tableau I : Principales caractéristiques et fonctions des apolipoprotéines.

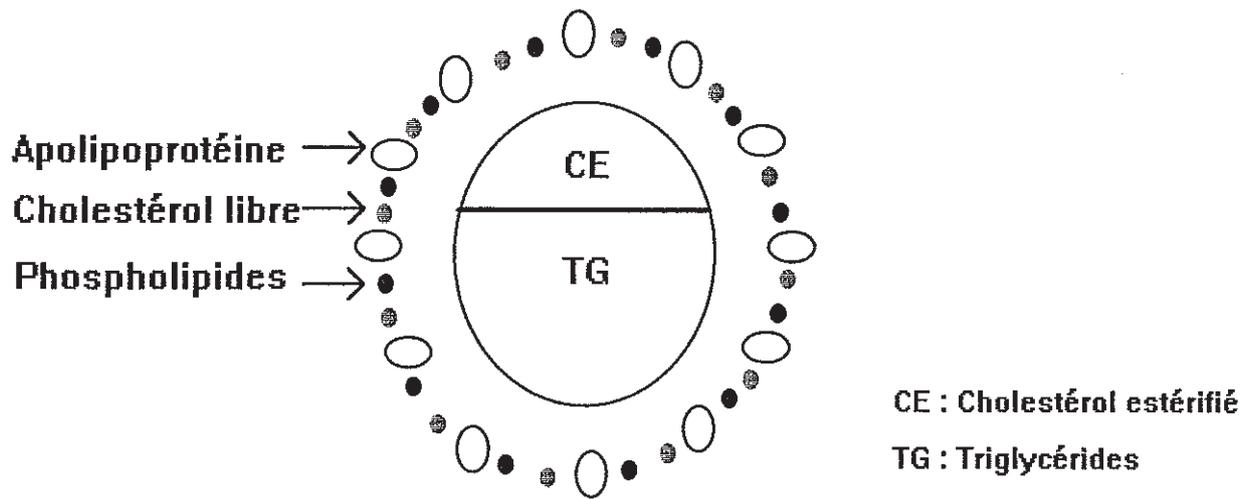


Figure 1: Structure générale des lipoprotéines.

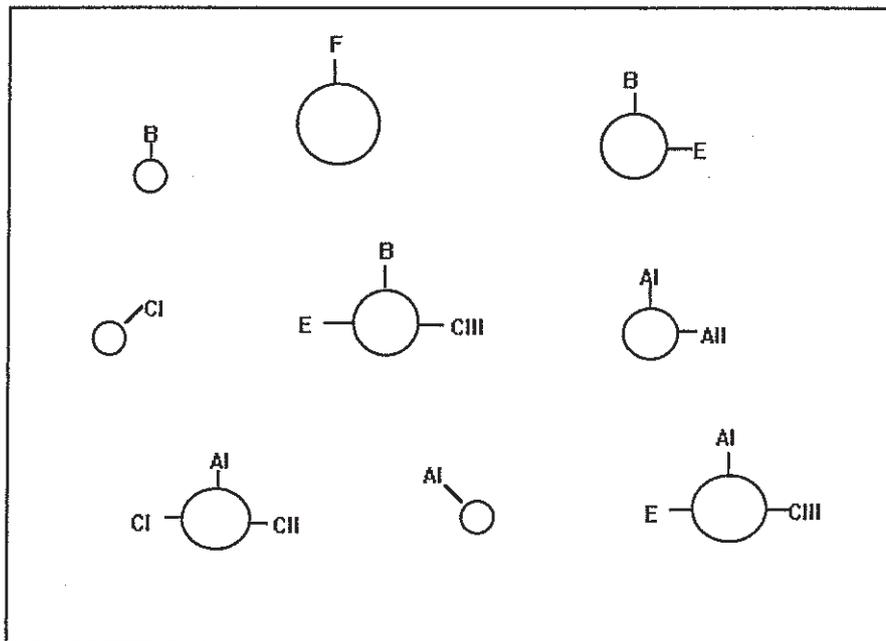


Figure 2: Représentation schématique de quelques particules lipoprotéiques.

La Lp(a) est une lipoprotéine particulière: c'est une particule lipidique de type LDL contenant une apo B100 sur laquelle est fixée l'apo (a) par l'intermédiaire d'un pont disulfure.

Les lipoprotéines subissent des *remaniements permanents* dans la circulation grâce aux échanges de lipides et d'apolipoprotéines entre les différentes lipoprotéines et avec les cellules.

Les lipoprotéines naissantes ont une structure discoïdale permettant des associations très stables entre les phospholipides (PL) et les régions en α hélice des apolipoprotéines. Leur sphérisation par accumulation en leur centre de triglycérides et de cholestérol estérifié fragilise les liaisons PL-apo et rend possible les échanges d'apolipoprotéines entre lipoprotéines (17). On notera que l'apo B n'est pas transférable d'une lipoprotéine à une autre. Elle forme des associations très stables avec les lipides.

De même, des échanges de lipides s'effectuent en permanence entre les différentes lipoprotéines notamment par l'intervention de protéines de transfert (CETP, LTP). Certaines HDL sont capables d'un captage de cholestérol et d'autres lipides à partir des membranes plasmiques des cellules grâce à une forte proportion de phospholipides à choline présentant une grande affinité pour les lipides (54). Par contre, la Lp(a), particule de synthèse hépatique, ne subit aucun remaniement lors de son transport plasmatique (51).

La composition des lipoprotéines est ainsi le résultat d'un *équilibre dynamique* entre les apports alimentaires et les activités métaboliques.

12. Classification et concept de particule lipoprotéique (56).

Du fait de leur structure, les lipoprotéines peuvent être séparées et classées soit en fonction de critères physicochimiques, soit en fonction de leur composition en apolipoprotéines.

12.1. Classification en fonction de critères physicochimiques.

a) Electrophorèse de zone.

En fonction du comportement des lipoprotéines dans un champ électrique, on distingue quatre fractions:

- les lipoprotéines qui ne migrent pas, restant donc au dépôt,
- les alpha-1-lipoprotéines dont la mobilité électrophorétique est comparable à celle des alpha-1-globulines,
- les alpha-2-lipoprotéines ou pré β lipoprotéines dont la mobilité électrophorétique est comparable à celle des alpha-2-globulines,

- les bêtalipoprotéines dont la mobilité est comparable à celle des bêtaglobulines.

NB: La Lp(a) migre en position pré-bêta.

b) Ultracentrifugation de flottation.

La densité des lipoprotéines varie suivant leur composition en lipides et protéines. La répartition le long d'un gradient de densité (d) de 0,92 à 1,21 kg/l permet de définir plusieurs classes:

- les chylomicrons: $d < 0,94$ kg/l.
- les lipoprotéines de très basse densité ou VLDL: $0,94 < d < 1,006$ kg/l.
- les lipoprotéines de basse densité ou LDL: $1,006 < d < 1,063$ kg/l.
- les lipoprotéines de haute densité ou HDL: $1,063 < d < 1,21$ kg/l.
- les lipoprotéines de très haute densité ou VHDL: $d > 1,21$ kg/l.

Ces différentes classes peuvent aussi être subdivisées en sous classes.

Leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau II.

NB: La Lp(a) présente une densité: $1,055 < d < 1,120$ kg/l.

c) Méthodes de précipitation sélective.

Différents réactifs forment des complexes insolubles avec certaines lipoprotéines permettant d'isoler et de quantifier plus facilement les différentes classes de lipoprotéines.

d) Comparaison de ces différentes techniques.

Finalement, les fractions isolées selon les différentes techniques physicochimiques peuvent être apparentées (tableau II), même si les lipoprotéines isolées par une technique ne sont jamais totalement identiques à celles séparées par une autre technique.

Par ailleurs, l'utilisation de méthodes de fractionnement plus affinées a permis de séparer chaque classe de lipoprotéines en sous classes. Ainsi les LDL ont pu être séparées en six sous fractions différentes (39). Les HDL2 et HDL3 ont pu être différenciées respectivement en 6 et 10 fractions différentes par leur composition chimique et par leur distribution en apolipoprotéines (9).

Les classes de lipoprotéines ainsi isolées ne sont finalement pas homogènes mais correspondent à un mélange de *particules lipoprotéiques* de composition définie en apolipoprotéines, comme l'ont mis en évidence des techniques d'immunoprécipitation et de chromatographie. C'est là tout l'intérêt d'une classification en fonction de la composition en apolipoprotéines.

Classe	Densité (kg/l)	Sf	Diamètre (nm)	PM moyen	ME	Fractions lipidiques (% poids)					Apolipo protéines	
						Total	TG	CL	CE	PL	Majeures	Mineures
Chylomicrons	<0,940	>400	10^2-10^3	$5 \cdot 10^9$	Origine	98-99%	84-94%	0,5-1%	1-3%	3-8%	1-2%	C, E
VLDL	0,940-1,006	20-400	30-70	$7,5 \cdot 10^6$	Pré- β	89-94%	55-65%	6-8%	12-14%	12-18%	5-10%	E
IDL	1,006-1,019	12-20										
LDL			15-25	$2,5 \cdot 10^6$	β	75-80%	8-12%	5-10%	35-40%	20-25%	20-24%	C, E
											B 100	
HDL 1	1,063-1,085	0-3									45-50%	
HDL 2	1,085-1,125		6-14	$3,9 \cdot 10^5$	α	50-55%	3-6%	3-5%	14-18%	20-30%	A-I, A-II	D, E
HDL 3	1,125-1,210	4-10	4-10	$1,9 \cdot 10^5$							C	

Sf = Vitesse de flottation, exprimée en unités Svedberg (10^{-3} cm/sec/dyne/g dans une solution de NaCl de densité 1,063 kg/l à 26°C)

PM = Poids moléculaire

ME = Mobilité électrophorétique sur papier tampon albumineux ou sur gel d'agarose

TG = Triglycérides, CL = Cholestérol libre, CE = Cholestérol estérifié, PL = Phospholipides.

Tableau II : Caractéristiques physico-chimiques et composition des lipoprotéines plasmatiques humaines, d'après TURPIN et PUCHOIS.

122. Classification en fonction de la composition en apolipoprotéines.

Les apolipoprotéines actuellement connues sont classées selon la nomenclature ABC (tableau I) (2). Leur répartition dans les lipoprotéines est fonction des remaniements permanents subis par ces dernières.

Selon cette classification, les lipoprotéines peuvent être divisées en deux groupes de particules:

- les particules lipoprotéiques (ou lipoparticules) simples ne contenant qu'une seule apolipoprotéine.

Exemples: Lp A I , Lp B , Lp E ...

- les particules lipoprotéiques (ou lipoparticules) complexes contenant deux ou plusieurs apolipoprotéines et dénommées selon leurs constituants en apolipoprotéines.

Exemples: Lp B:E, Lp AI:AI, Lp B:CIII:E...(figure 2).

Désormais, on considère les lipoprotéines définies par les méthodes physicochimiques comme des *familles* de lipoparticules. Certaines HDL sont ainsi des LP AI alors que d'autres sont des LP AI:AI.

"Le métabolisme normal des lipides dépend d'une certaine distribution des particules lipoprotéiques. Toute perturbation du métabolisme lipidique résultera dans un déséquilibre de cette distribution" (56).

Actuellement, il est possible de quantifier certaines particules lipoprotéiques notamment par des techniques d'électro-immuno-diffusion en gel.

L'hétérogénéité des lipoprotéines rend compte de la complexité du transport lipidique.

13. Métabolisme des lipoprotéines: rappel (54).

Les lipoprotéines assurent le transport des lipides d'origine endogène ou exogène jusqu'aux différents tissus (fig 3).

131. Apports lipidiques.

a) Apports exogènes.

L'alimentation apporte des lipides d'origine végétale (riches en AG insaturés) et animale (riches en AG saturés). Ces AG sont apportés majoritairement sous forme de triglycérides et pour une faible partie sous forme de phospholipides. L'alimentation apporte aussi du cholestérol.

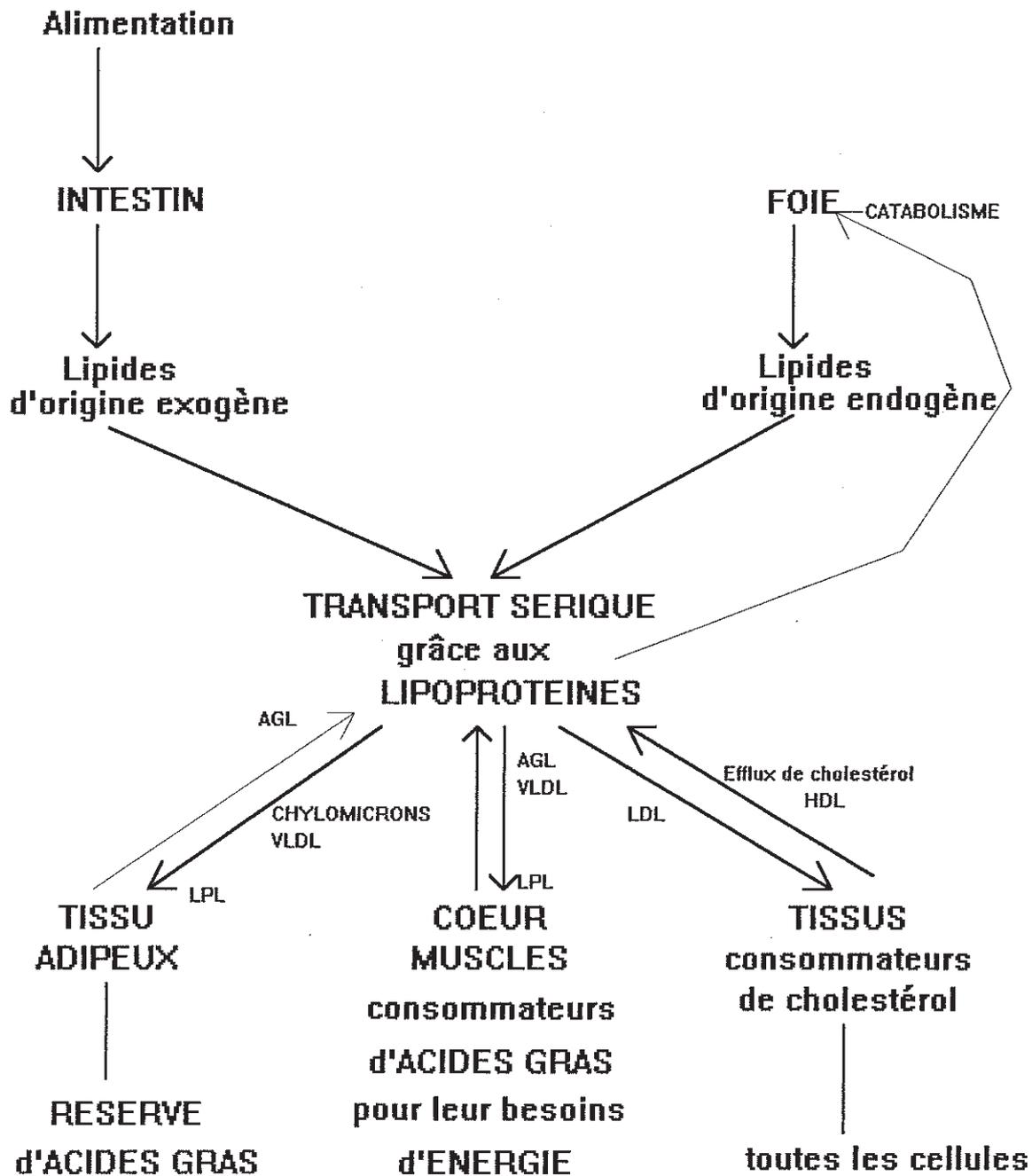


Figure 3 : Répartition des lipides.

Dans le tube digestif, ces graisses sont émulsionnées par les sels biliaires et subissent l'action de la lipase pancréatique. Les AG, glycérol, monoglycérides et diglycérides qui en résultent sont absorbés par l'intestin dans les cellules duquel ils serviront à reconstruire des triglycérides.

b) Apports endogènes.

Les lipides endogènes proviennent:

- d'une synthèse hépatique (triglycérides, cholestérol)
- d'une synthèse intestinale (cholestérol)
- de la bile riche en phospholipides et cholestérol .

La synthèse des triglycérides à partir du glucose et des AG permet au foie de se débarrasser de son excès d'AG. Ceux-ci proviennent: des glucides alimentaires, des lipides alimentaires (résidus de chylomicrons) et des AG libres transportés par la sérumalbumine à partir du tissu adipeux dans les périodes de jeûne.

Le foie synthétise du cholestérol à partir d'acétylCoA. L'entérocyte produit aussi du cholestérol dont la synthèse augmente paradoxalement avec l'apport alimentaire. Il est à noter que toutes les cellules de l'organisme sont capables de synthétiser le cholestérol nécessaire à leurs besoins. Dans ces conditions, la synthèse hépatique peut apparaître superflue.

132. Métabolisme des lipoprotéines intestinales (fig. 4).

L'entérocyte sécrète des particules très riches en triglycérides: des chylomicrons (de diamètre de 70 à 500 nm et de $d < 1,006$) et des VLDL intestinales moins volumineuses et de densité comparable aux VLDL hépatiques.

Ces lipoprotéines sont formées à partir des AG alimentaires, du cholestérol alimentaire et de synthèse entérocytaire, des phospholipides alimentaires et des apolipoprotéines B48, C, A synthétisées par l'entérocyte.

Il est à noter que la synthèse d'apo B48 par l'intestin est une condition nécessaire à la formation des chylomicrons. Les chylomicrons subissent rapidement des modifications de composition, dès leur sécrétion par l'entérocyte. Ils reçoivent des apo C et E des lipoprotéines HDL.

Au niveau du tissu adipeux, les chylomicrons sont utilisés de façon préférentielle aux VLDL d'origine hépatique. Ils se fixent à la lipoprotéine lipase (LPL) de l'endothélium vasculaire du tissu. Celle-ci est activée par la présence d'apo CII à la surface des chylomicrons et des VLDL mais inhibée par un excès d'AG libres ainsi que par l'apo CIIL.

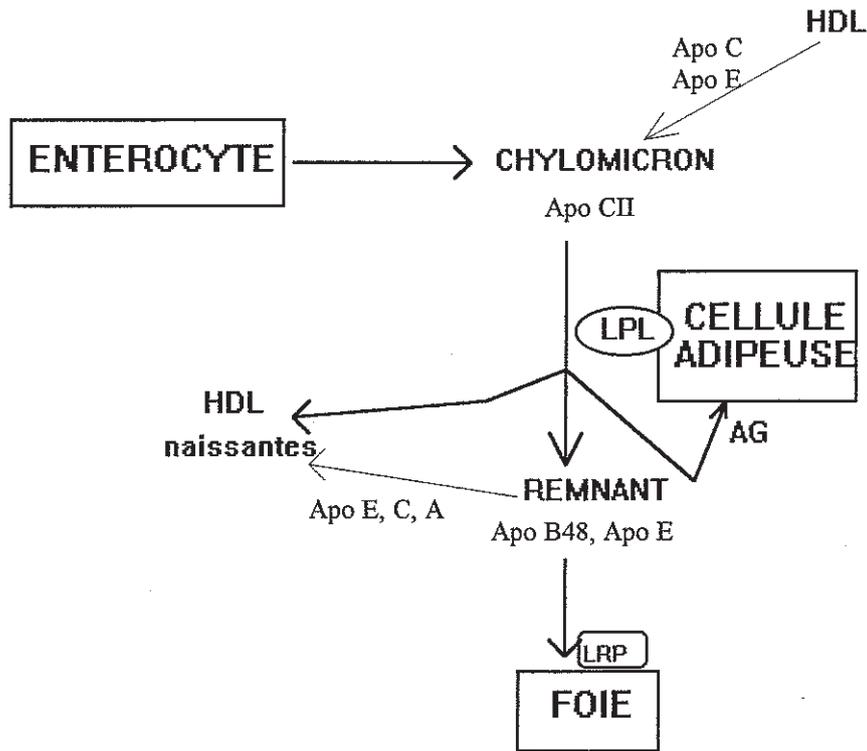


Figure 4 : Métabolisme des chylomicrons.

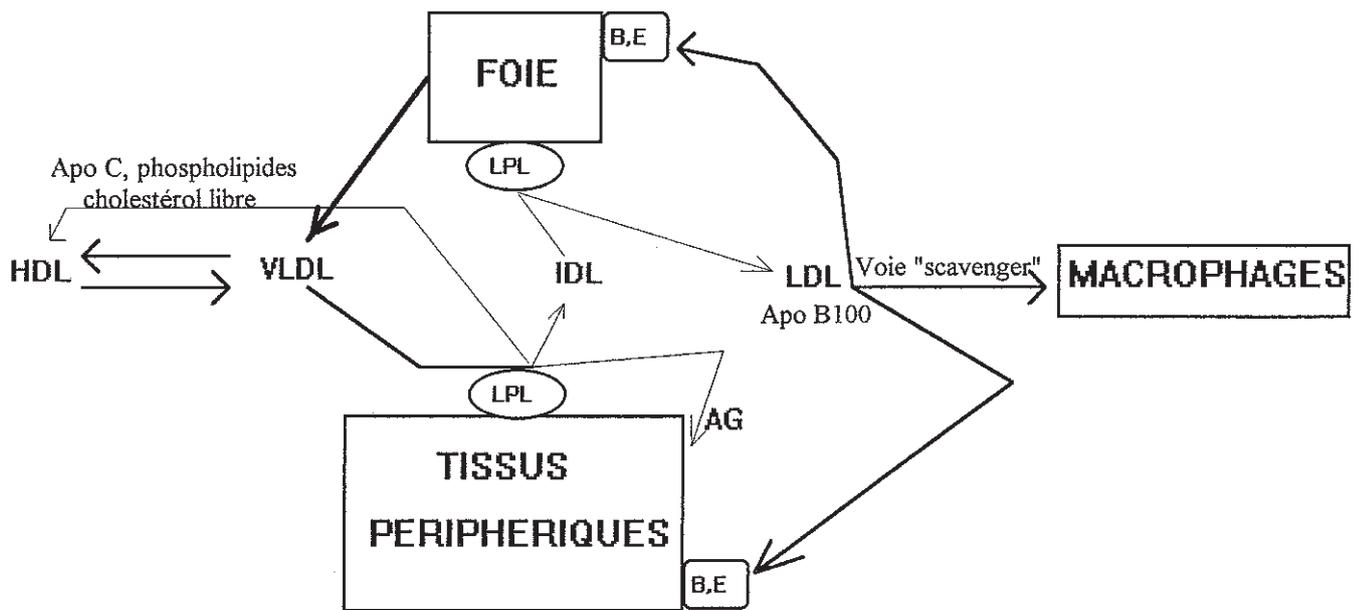


Figure 5 : Métabolisme VLDL - LDL.

Quatre vingt dix pour cent des triglycérides sont ainsi hydrolysés, libérant des AG qui seront ultérieurement mis en réserve dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides.

Au cours de cette hydrolyse, des morceaux d'enveloppes de chylomicrons se détachent donnant lieu à des HDL naissantes discoïdales.

A la fin de cette hydrolyse, les chylomicrons cèdent leurs apo C, AI, AII, AIV et une partie des apo E à des particules HDL.

Les résidus de chylomicrons (ou remnants) constitués d'apo B48 et d'apo E sont amenés au foie où ils sont captés grâce à un récepteur spécifique des apo E appelé aussi LRP (low density lipoprotein receptor related protein).

133. Métabolisme des VLDL et LDL (fig. 5).

Le foie synthétise les VLDL qui vont permettre la sécrétion de triglycérides endogènes.

Dans la circulation, les VLDL subissent de nombreux remaniements en commençant par un enrichissement en esters de cholestérol, résultat de deux processus: un échange entre des triglycérides des VLDL et des esters de cholestérol des HDL grâce à la cholestérol-ester-transfert-protéine (CETP), protéine plasmatique partiellement associée aux HDL, et une estérification du cholestérol grâce à l'action d'une β LCAT présente dans certaines VLDL.

Les VLDL ainsi modifiées se fixent à la LPL de l'endothélium capillaire des tissus adipeux ou musculaires. L'hydrolyse des triglycérides conduit à des lipoprotéines de taille plus petite mais de plus grande densité, les IDL. Au cours de cette hydrolyse, on ne note pas de formation d'HDL naissantes; par contre, on constate à la fin de l'hydrolyse un transfert de constituants superficiels (apo C, phospholipides, cholestérol libre) des VLDL vers les HDL3 les transformant ainsi en HDL2.

Les IDL sont finalement catabolisées par la lipase hépatique et transformées en LDL, quand elles ne sont pas d'emblée captées par le foie.

Les LDL, résultat du catabolisme des VLDL d'origine hépatique ont conservé l'apo B100, la totalité des esters de cholestérol, des phospholipides et du cholestérol libre en surface et en quantité bien définie. Les LDL ont une durée de vie longue (demi-vie = 3 jours) et contiennent 70% du cholestérol plasmatique. Elles peuvent être catabolisées selon trois voies:

1) une voie de mise en réserve de cholestérol pour les tissus périphériques, d'autant que leur apo B100 est reconnue par tous les récepteurs B,E présents sur les tissus. Cette voie est peu utilisée puisqu'elle dépend des besoins en cholestérol de ces tissus eux-mêmes capables de synthétiser leur propre cholestérol.

2) la voie principale de catabolisme des LDL est représentée par le captage de ces LDL par le foie au niveau des récepteurs B₂E dont le nombre diminue avec la richesse en cholestérol intracellulaire. Ces récepteurs sont recyclés après dégradation lysosomiale des LDL d'autant plus vite que l'hépatocyte a besoin de cholestérol, notamment pour la biosynthèse des acides biliaires.

3) Les LDL peuvent être oxydées au niveau de l'endothélium vasculaire. Leur apo B ainsi modifiée est reconnue par des récepteurs spécifiques et permet leur captage par les macrophages. C'est la voie dite "scavenger". Les macrophages catabolisent la plupart des constituants des LDL sauf le cholestérol dont l'accumulation est le point de départ du phénomène d'athérogénèse (26).

134. Métabolisme des HDL

Les HDL sont sécrétées par l'intestin et le foie, ou sont formées à partir des chylomicrons ou des VLDL. Leur composition est sans cesse remaniée dans la circulation au cours de leur évolution.

Les HDL naissantes sécrétées par l'hépatocyte sont hétérogènes par leur taille et leur composition variable en lipides et apolipoprotéines. Certaines ne contiennent pas d'apo AI; d'autres ne contiennent pas d'apo AII. La présence des autres apolipoprotéines est également variable.

Les HDL ne contenant pas de cholestérol estérifié sont de grande taille et discoïdales. Celles contenant du cholestérol estérifié sont plus petites et sphériques; en outre, elles possèdent surtout de l'apo AI. L'estérification du cholestérol libre grâce à une α LCAT associée à certaines HDL permet aussi la transformation des HDL discoïdales en HDL sphériques.

Les HDL reçoivent des phospholipides, du cholestérol libre et de l'apo C lors du catabolisme des VLDL.

Certaines HDL sont en partie associées à la CETP qui permet le transfert d'esters de cholestérol des HDL vers les VLDL en échange avec des triglycérides et d'une HDL à une autre.

Une protéine de transport spécifique des lécithines (LTP) permet le transfert des lécithines des VLDL vers les HDL.

Certaines HDL participent à l'efflux de cholestérol et au captage éventuel d'autres lipides à partir des membranes plasmiques cellulaires grâce aux phospholipides à choline à la surface de ces HDL. Les HDL impliquées dans cette fonction contiennent de l'apo AI sans apo AII qui aurait au contraire un effet inhibiteur sur ce captage. Il semble que ce soit ces particules HDL qui contiennent en plus la LCAT et la CETP.

Les HDL sont les seules lipoprotéines capables de capter le cholestérol accumulé dans les macrophages.

Les HDL sont finalement catabolisées dans le foie par l'intervention de la lipase hépatique qui hydrolyse les phospholipides et facilite la fixation des HDL sur des récepteurs spécifiques hépatiques.

2. PEROXYDATION LIPIDIQUE ou LIPOPEROXYDATION (21, 30, 55)

La lipoperoxydation (LPX) est une agression lipidique (concernant essentiellement les acides gras polyinsaturés (AGPI) libres ou membranaires) par des radicaux libres issus du métabolisme physiologique ou produits lors de déviations du métabolisme cellulaire.

Il existe une LPX enzymatique nécessaire à l'organisme (synthèse de prostaglandines, phénomène de bactéricidie). Par contre, une LPX spontanée est toujours nuisible. Dans tous les cas, quand les systèmes de protection contre la LPX sont débordés, celle-ci est à l'origine de dégâts cellulaires irréversibles.

21. Réaction radicalaire

211. Notion de radical libre

On appelle *radical libre* toute espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons célibataires. Sa réactivité est liée à son avidité en électron afin de réappairier son ou ses électrons célibataires et de retrouver la stabilité.

212. Principaux radicaux libres

- *L'oxygène moléculaire*: biradical (2 électrons célibataires), il est stable vis-à-vis des substances à électrons appariés, mais réagit avec les radicaux libres et permet l'amplification de la réaction radicalaire.
- *L'anion superoxyde*: obtenu par captation d'un électron supplémentaire par la molécule d'oxygène : $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$
- *Le radical hydroxyle*: $OH\cdot$, très réactif, intervenant dans l'initiation de la LPX.
- *L'oxygène singulet*: forme très réactive avec les structures organiques les plus stables, obtenue après mariage des 2 électrons célibataires de la molécule d'oxygène.
- *L'atome d'hydrogène*: $H\cdot$.
- *Des espèces radicalaires diverses*: issues de la LPX et dont la nature dépend de la molécule d'origine (radical hydroperoxyl $HOO\cdot$, alkoxy $RO\cdot$, alkylperoxyl $ROO\cdot$...)
- *Des molécules d'oxyde d'azote*: NO_x .
- *Des métaux de transition*: notamment fer et cuivre.

213. Processus en trois phases

a) Initiation

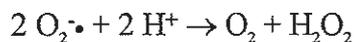
Tout commence par la soustraction d'un atome d'hydrogène (H•) au niveau d'une molécule lipidique (AGPI type LH) sous l'action d'un radical libre. On obtient un radical libre d'acide gras polyinsaturé L•.

L'organisme produit des radicaux libres :

- au cours de la formation des eicosanoïdes: production de radical hydroxyle,
- lors du phénomène de bactéricidie: production de l'anion superoxyde lors de l'explosion respiratoire,
- lors du transport des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale: la réduction de l'oxygène en eau peut être incomplète pour 1 à 2 % de l'oxygène moléculaire et conduire à la formation d'anion superoxyde.

Des rayonnements, des radiations ionisantes, des toxiques (alcool, oxydes d'azote, fumée de cigarette, tétrachlorure de carbone, médicaments anticancéreux...) peuvent aussi être à l'origine de la production de radicaux libres.

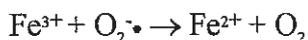
L'anion superoxyde n'est agressif que dans les milieux non protonés (par exemple, les membranes lipidiques). En milieu protoné il subit une dismutation en peroxyde d'hydrogène H₂O₂ grâce à la superoxyde dismutase (SOD) selon la réaction:



Le radical hydroxyle OH• est alors formé à partir du peroxyde d'hydrogène par la réaction de Fenton en présence de fer ferreux dont la concentration est toujours suffisante dans les cellules:



L'anion superoxyde permet de régénérer le fer ferreux à partir du fer ferrique:



L'oxygène est à nouveau disponible ainsi que le fer ferreux pour la réaction de Fenton.

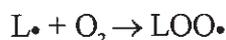
On appelle cette suite de réactions le cycle d'Haber-Weiss.

Finalement, c'est le radical hydroxyle qui est l'initiateur de la LPX.

b) Propagation

C'est une étape d'amplification en présence d'oxygène.

1) Combinaison de L• avec l'oxygène et formation d'un radical peroxyde LOO•.



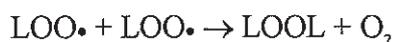
2) Le radical $\text{LOO}\cdot$ réagit à son tour avec une nouvelle molécule LH à laquelle il arrache un $\text{H}\cdot$ pour former un hydroperoxyde LOOH et un nouveau radical alkyl $\text{L}\cdot$ qui permet la propagation de la LPX.

Les hydroperoxydes instables sont facilement décomposés en présence de fer ferreux selon la réaction de Fenton en radicaux alkoxyloxy $\text{LO}\cdot$, alkylperoxyloxy $\text{LOO}\cdot$ et en produits de coupure aboutissant à des radicaux $\text{L}\cdot$ à nombre de carbones inférieur à celui de l'AGPI d'origine.

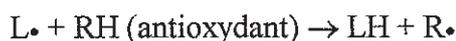
c) Terminaison

La réaction radicalaire prend fin par formation de composés stables:

- soit lors de l'association de 2 espèces radicalaires selon:



- soit grâce à l'intervention de "scavengers" ou pièges à radicaux libres présents dans les membranes cellulaires et dont la transformation en radical donne lieu à une structure stable arrêtant la propagation du phénomène:



↓

R

214. Conséquences de la réaction radicalaire

L'anion superoxyde est finalement peu réactif en milieu aqueux mais exerce son action délétère de manière indirecte et à distance grâce à sa dismutation en peroxyde d'hydrogène stable et diffusible et transformable en radical hydroxyle $\text{OH}\cdot$ très réactif.

Les radicaux libres et aldéhydes issus de la LPX, dont les plus importants quantitativement sont les 4 hydroxyalkénals, sont toxiques:

- pour les membranes cellulaires chez lesquelles ils induisent une perte de fluidité, une altération des activités enzymatiques, une augmentation de la perméabilité aux ions et aux protons,
- pour les acides nucléiques,
- pour les protéines chez lesquelles ils provoquent une perte d'activité enzymatique, un blocage des groupements thiol par les aldéhydes.

Ces composés, notamment le 4 hydroxynonénal et le malondialdéhyde (MDA), interviendraient dans les phénomènes d'athérogénèse en s'attaquant aux groupements ϵ aminés des résidus de lysine de l'apolipoprotéine B. Ceci serait à l'origine d'une perte de reconnaissance des LDL par leurs récepteurs spécifiques B/E. Les LDL ainsi modifiées sont reconnues par les récepteurs macrophagiques.

La toxicité des radicaux libres est limitée par les différents systèmes de protection.

22. Systèmes de protection

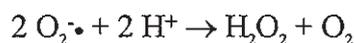
Ils piègent les radicaux libres issus du métabolisme cellulaire lors de la LPX enzymatique ou spontanée et préservent l'intégrité cellulaire. Ils sont représentés dans le milieu intracellulaire par les enzymes cytosoliques et les antioxydants qui font par contre défaut dans le milieu extracellulaire, facilitant l'expression de la toxicité radicalaire retrouvée dans les phénomènes d'inflammation chronique.

221. Systèmes de protection intracellulaires

a) Enzymes cytosoliques .

- *Superoxyde dismutases.*

Les superoxyde dismutases (SOD) catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène stable et moins toxique:



La réaction de dismutation est une réaction spontanée dont la vitesse est augmentée d'un facteur 10^4 à 10^5 sous l'action de ces métalloenzymes dont le métal du site catalytique est successivement réduit puis oxydé par l'anion superoxyde.

Il existe:

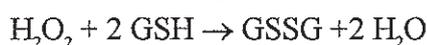
- une SOD cytosolique, homodimère à cuivre et zinc, dont le gène de structure est porté par le chromosome 21 (la trisomie 21 est considérée comme un modèle de vieillissement accéléré.)
- une SOD mitochondriale, homotétramère à manganèse. Son gène de structure est porté par le chromosome 6.

- *Glutathion peroxydases.*

Ce sont des sélénoenzymes constituées de 4 sous-unités identiques contenant chacune un atome de sélénium au niveau du site actif sous forme de séléncystéine. Il existe:

- une forme à localisation intracellulaire (cytosol et mitochondries),
- une forme glycosylée riche en ponts disulfure à localisation extracellulaire.

Les glutathion peroxydases (GPX) catalysent la réduction par le glutathion réduit (GSH) du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes LOOH :



Le glutathion réduit est reformé en présence de NADPH par une glutathion réductase.



Ainsi, les GPX limitent la formation du radical hydroxyle par l'élimination du peroxyde d'hydrogène au fur et à mesure de sa production en évitant la réaction de Fenton et la propagation de la LPX.

Il est à noter que l'action de la GPX sur les hydroperoxydes d'AGPI nécessite leur libération des membranes cellulaires par la phospholipase A₂.

Il existe une GPX capable d'agir directement sur les hydroperoxydes phospholipidiques et les hydroperoxydes de cholestérol associés à la membrane sans l'action de la phospholipase A₂ (49).

- *Catalase.*

Située dans les peroxysomes cellulaires, elle décompose rapidement le peroxyde d'hydrogène en eau: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Son rôle semble mineur par rapport à celui de la GPX. La catalase n'interviendrait qu'à partir d'une certaine concentration intracellulaire en peroxyde d'hydrogène .

- *Glutathion transférases.*

La GPX n'est pas capable de dégrader tous les hydroperoxydes. Leur détoxification fait alors appel à une glutathion S-transférase catalysant la formation de composés d'addition avec le glutathion réduit. Ceux-ci, après action de la γ -glutamyl transférase, d'une peptidase et acétylation par l'acétyl CoA donnent les acides mercapturiques, produits de détoxification.

b) Les antioxydants

Ce sont des piègeurs de radicaux libres à grande affinité pour ceux-ci et présents dans les membranes ou dans le cytosol, selon leurs propriétés lipo ou hydrosolubles.

- *Vitamine E.*

La forme la plus active et la plus fréquente est l' α -tocophérol. Son interaction avec les radicaux libres (notamment alkoxy et alkylperoxy) aboutit à une forme semiquinonique régénérée par la vitamine C. Localisée dans les membranes cellulaires, elle peut agir sur les radicaux libres membranaires ou à la surface des membranes plasmiques.

Les tocotriénols seraient peut-être plus efficaces que l' α -tocophérol (49).

- *Vitamine C.*

Cytosolique, elle joue un rôle important en assurant la régénération de la vitamine E. Pourtant son rôle est paradoxal puisqu'elle peut devenir prooxydante selon l'environnement (par exemple, forte concentration de vitamine C mais faible concentration de vitamine E).

- *Caroténoïdes.*

Ce sont des polyènes conjugués liposolubles dont l'effet dépend de la pression en oxygène (meilleure action à de faibles concentrations d'oxygène et action prooxydante à de très fortes concentrations en oxygène). Le β -carotène est particulièrement réactif vis-à-vis des lipoperoxydes.

- *Glutathion réduit.*

C'est un tripeptide γ glutamyl-cystéinyl-glycine qui joue un rôle important dans les réactions d'oxydo-réduction de l'organisme, en tant que donneur d'hydrogène grâce à sa fonction thiol.

- *Bilirubine.*

Localisée dans des liposomes, elle serait aussi efficace que l' α -tocophérol (49).

- *Autres molécules endogènes.*

Ce sont des piègeurs occasionnels de radicaux libres dont ils captent les électrons aux dépens de leur propre intégrité (AGPI, fonctions thiol de protéines, acide urique...).

222. Systèmes de protection extracellulaires

Ils sont peu nombreux. On retrouve dans le plasma une SOD de poids moléculaire élevé, la vitamine C, l' α -tocophérol, l'urate, l'albumine. La transferrine et la céruléoplasmine, assurant le transport du fer et du cuivre empêchent l'effet catalyseur de ces métaux dans la LPX.

Il semblerait que l'organisme soit capable de produire des protéines HSP (Heat Shock Proteins) dont la synthèse serait induite par un stress oxydatif et dont le rôle serait de chaperonner et stabiliser les protéines altérées par la LPX.

Dans ces conditions, la toxicité des radicaux libres s'exerce lors du débordement des systèmes de protection .

23. Evaluation de la lipoperoxydation: marqueurs

La meilleure technique utilise les spectres de résonance paramagnétique électronique obtenus après piégeage des radicaux libres.

En biologie clinique, on s'en tient à une mise en évidence indirecte de la LPX en dosant des molécules issues de celle-ci dans le plasma ou les tissus.

Le choix du marqueur est rendu difficile à cause notamment de la grande diversité des radicaux formés (dérivés oxygénés, aldéhydes et alcanes issus de réactions de coupure, chromolipides de condensation fluorescents), de la durée de vie courte du marqueur et de l'inégalité tissulaire des systèmes de défense.

Les principaux composés formés et intéressants à doser sont:

- *Les diènes conjugués*: ils sont obtenus par oxydation des AGPI. Leur dosage est basé sur leur intense absorption vers 233 nm.

- *Les hydroperoxydes lipidiques*: leur dosage fait le plus souvent appel à des techniques spectrophotométriques ou fluorimétriques après action d'une peroxydase.

- *Les alcanes*: ils sont mesurés dans l'air expiré par chromatographie en phase gazeuse (CPG) où ils sont à l'état de traces. L'interprétation reste délicate du fait d'une possible contamination atmosphérique.

- *Les chromolipides fluorescents*: ces substances complexes, résultat de l'interaction d'hydroperoxydes lipidiques et/ou d'aldéhydes de coupure avec des phospholipides, protéines ou acides nucléiques, s'accumulent dans les tissus au cours du vieillissement et possèdent des propriétés de fluorescence, utilisées pour leur dosage. Des techniques complexes permettent d'éviter les interférences.

- *Le malondialdéhyde (MDA)*: produit très minoritaire de la LPX puisque provenant de certains radicaux monoperoxyl possédant au moins 3 double liaisons en position malonique. Son dosage par réaction à l'acide thiobarbiturique est cependant le test de LPX le plus ancien et même le plus utilisé. Dans certaines conditions analytiques, la réaction thiobarbiturique reflète le MDA mais aussi d'autres aldéhydes issus de la LPX (4 hydroxynonéal, hexenal, propanal). Le MDA peut également être séparé et dosé par CPG.

A un autre niveau, il est possible d'évaluer les systèmes de protection de l'organisme vis-à-vis des réactions radicalaires en dosant dans le plasma ou dans les différents tissus: *les antioxydants* (vitamine E, C...), *l'activité des différentes enzymes* (SOD, GPX, catalase), *l'activité totale antioxydante*. Leurs taux diminuent par consommation lors d'une lipoperoxydation exagérée.

B. DESEQUILIBRE DU METABOLISME LIPIDIQUE DU DNID.

1. TROUBLES LIPIDIQUES.

11. Rôle de l'insuline dans le métabolisme lipidique.

L'insuline intervient à des étapes clés du métabolisme des lipides au niveau du foie, du tissu adipeux et du muscle (63).

Par son action antilipolytique, elle permet à tous les niveaux la réduction du taux d'AGL circulants.

Au niveau du tissu adipeux (i) elle permet, en augmentant la pénétration cellulaire du glucose et la glycolyse, la synthèse et la mise en réserve de triglycérides à partir du glucose; (ii) elle stimule la voie des pentoses, source de NADPH nécessaire à la synthèse des AG; (iii) elle stimule l'activité de la lipoprotéine lipase, facilitant la captation des triglycérides.

Au niveau du foie elle stimule la synthèse d'AG et leur estérification en triglycérides et augmente la synthèse et la libération des VLDL.

Par ailleurs, il a été montré que l'insuline augmente le nombre de récepteurs LDL favorisant ainsi le captage du cholestérol par les cellules de l'organisme (44).

12. Interrelation entre les métabolismes du glucose et des lipides

Il existe une interrelation entre les métabolismes du glucose et des AG dans le muscle et le tissu adipeux que Randle et coll. ont appelé "Glucose Fatty acid Cycle" (58). Selon ce cycle, les AGL inhibent la captation et l'oxydation du glucose par le muscle, alors que la captation du glucose par le tissu adipeux inhibe le transfert d'AG du tissu adipeux au muscle. Comme l'insuline inhibe la lipolyse au sein du tissu adipeux, elle favorise ainsi l'oxydation du glucose.

Cette théorie permet d'expliquer une part de la pathogénie du DNID des sujets obèses chez lesquels on trouve un taux élevé d'AGL, un défaut d'oxydation du glucose, une accumulation anormale de glycogène musculaire et une plus grande résistance à l'insuline que chez les sujets non obèses (33).

13. Conséquences d'une carence relative en insuline sur le métabolisme lipidique

Le DNID est ressenti au sein de l'organisme comme une carence relative en insuline. Compte tenu du rôle physiologique de cette hormone, les patients DNID présentent souvent des troubles du métabolisme lipidique. Il n'existe pas de profil lipidique standard du sujet DNID (59). Au contraire, celui-ci varie d'un sujet à l'autre selon l'équilibre du contrôle glycémique, le degré d'insulinopénie ou d'insulinorésistance, l'obésité, le régime alimentaire et les autres causes possibles d'hyperlipémies.

Le plus fréquemment on rencontre une *hypertriglycéridémie* ($\geq 1,7$ mmol/l) résultant d'une augmentation des VLDL-TG (59). Plusieurs hypothèses ont été évoquées. Entre autres, on assiste dans le DNID à une augmentation de synthèse et de sécrétion des VLDL-TG par le foie (59) soit due à l'hyperinsulinisme (quand le diabète présente une insulinorésistance avec compensation par hyperinsulinisme), soit due à l'augmentation des AGL (chez le DNID insulinorésistant mais normoinsulinique).

L'hypertriglycéridémie est liée à un mauvais contrôle de l'équilibre glycémique. D'ailleurs, un traitement par insuline permet de rétablir le taux de triglycérides à des valeurs normales (59).

Dans une étude de 100 patients, Duranteau et coll. (24) trouvent une hypertriglycéridémie dans 36% des cas alors que le diabète est justement déséquilibré dans 35% des cas. Il semble probable qu'il y ait une corrélation entre ces deux facteurs. Le taux de triglycérides plasmatiques est aussi fonction des capacités individuelles d'élimination des VLDL (59).

Par ailleurs, le défaut d'insuline est à l'origine d'un déficit d'activation de la LPL, responsable d'une réduction du catabolisme périphérique des VLDL (38). Il s'ensuit une augmentation des taux de VLDL et TG sériques. A moins que la surproduction des VLDL soit responsable d'une saturation des sites catalytiques de la LPL expliquant un catabolisme plus lent des VLDL (8).

On note souvent une *hypercholestérolémie* ($\geq 5,2$ mmol/l). Duranteau et coll. (24) la retrouvent dans 67 % des cas. Le taux de cholestérol est en fait le résultat d'une augmentation du VLDL-C et du LDL-C et d'une diminution du HDL-C (surtout de la fraction HDL2) (27).

L'augmentation du VLDL-C fait suite à l'élévation du taux sérique des VLDL (59).

L'augmentation du LDL-C est le résultat d'un ralentissement du catabolisme des LDL soit par diminution du nombre de récepteurs (44), soit par diminution de la liaison des LDL à

leurs récepteurs, suite à la glycation de l'apo B des LDL. Mais les études semblent contradictoires à ce sujet (8).

La diminution du HDL-C peut s'expliquer: (i) par la baisse d'activité de la LPL (les constituants de surface des VLDL sont en effet transférés aux HDL au cours de leur hydrolyse par la LPL; un ralentissement de ce processus retentirait sur le taux des HDL (47)); (ii) par un accroissement du catabolisme de l'apo AI (59).

Quant à la baisse du taux d'HDL2-C, elle serait plutôt secondaire à l'hypertriglycéridémie et à l'obésité (70).

En termes de particules lipoprotéiques, on observe une élévation des Lp B riches en esters de cholestérol (LDL), des Lp B:CIII et Lp B:CIII:E riches en triglycérides (VLDL) (28).

Le taux d'*acides gras libres* est fonction de l'insulinorésistance et de l'insulinopénie relative. Chez le DNID dont les cellules β sont capables d'augmenter leur sécrétion d'insuline, l'hyperinsulinisme contrecarre l'insulinorésistance et le taux d'AGL est normal. Quand l'organisme perd la capacité de maintenir l'hyperinsulinisme, l'insulinopénie relative est responsable d'une lipolyse et le taux d'AGL augmente (59).

Quant à la *lipoprotéine (a)*, Duranteau et coll. (24) retrouvent une *augmentation* (≥ 300 mg/l) dans 27 % des cas. Il semble admis que la synthèse de la Lp(a) soit sous contrôle génétique (46). Comme elle est capable de se lier aux récepteurs LDL (46), la diminution du nombre de récepteurs LDL dans le DNID pourrait être à l'origine d'une élévation du taux sérique de Lp(a).

Outre les anomalies quantitatives des lipides, le diabète est à l'origine de modifications dans la composition des lipoprotéines (8). On note un *enrichissement en TG* des diverses lipoprotéines (LDL, VLDL et HDL), ce qui altère certaines de leurs fonctions. Les LDL présentent une diminution d'affinité vis-à-vis de leur récepteur. Les VLDL sont de taille plus grande et se comportent comme des chylomicrons. Les remnants obtenus lors du catabolisme sont athérogènes. Le rapport apo CIII/apo CII est augmenté et pourrait expliquer le ralentissement du catabolisme des VLDL puisque l'apo CIII est inhibiteur de la LPL et l'apo CII activateur. Les HDL ont un rapport cholestérol/protéines plus important et ont une plus faible teneur en apo AI: elles seraient alors moins efficaces dans le transport inverse du cholestérol.

Par ailleurs, l'insulinorésistance est caractérisée par la présence d'une sous-classe de LDL de phénotype B qui sont des *LDL petites et denses*. Il a été démontré que leur présence

est associée à un profil lipidique particulier: hypertriglycémie, augmentation des VLDL et de l'apo B, diminution des taux de HDL-C et d'apo AI (64).

Il est clair que le diabète s'accompagne d'une modification dans la répartition des apolipoprotéines et des lipides au sein des lipoprotéines. Certaines études montrent une augmentation du rapport CE/CL dans les LDL, à l'origine d'une moindre efficacité dans le rétrocontrôle négatif de synthèse du cholestérol intracellulaire (51). D'autres études retrouvent ce rapport normal mais notent une baisse des taux de CE et CL dans les LDL de sujets DNID par rapport à des sujets normaux (49).

L'hyperglycémie est responsable d'une *glycosylation non enzymatique des apolipoprotéines (glycation)* (20) au niveau de leurs résidus lysine ce qui modifie leur activité entraînant une diminution de liaison de l'apo B à son récepteur et une augmentation de catabolisme de l'apo AI.

2. AUGMENTATION DE LA LIPOPEROXYDATION DANS LE DNID.

De nombreuses études confirment l'augmentation de la peroxydation lipidique chez le sujet diabétique, notamment de type 2. Elles font appel à différents marqueurs de la lipoperoxydation évalués au niveau du sang des sujets diabétiques par rapport à des sujets contrôles. L'élévation de la lipoperoxydation est directement mise en évidence par l'augmentation de métabolites issus de celle-ci (MDA, diènes conjugués) dans le sang de sujets DNID. De façon indirecte, on retrouve des modifications dans l'activité des enzymes de protection contre la LPX (SOD, GPX, catalase) et dans la répartition des antioxydants.

21. Elévation du taux de MDA plasmatique et érythrocytaire.

Le malondialdéhyde, métabolite stable issu de la peroxydation des AGPI, est facilement dosé par la réaction à l'acide thiobarbiturique. Il est augmenté de façon significative chez les sujets diabétiques par rapport à des sujets sains normoglycémiques (18, 31, 48).

En fait, selon Altomare et coll. (6), seuls les DNID mal équilibrés sur le plan glycémique présentent une élévation significative du taux de MDA par rapport aux sujets bien équilibrés et aux sujets normaux. Ces auteurs ne retrouvent pas de différence significative entre les DNID bien contrôlés et les sujets contrôles. De plus, la normalisation du contrôle glycémique par insulinothérapie permet de rétablir le taux de MDA au niveau de celui des contrôles. La LPX chez le sujet DNID serait donc en relation avec l'équilibre glycémique à

court terme, d'autant plus que l'équipe d'Altomare (6) note une corrélation positive plus importante entre la concentration plasmatique en MDA et la fructosaminémie ou la glycémie quotidienne moyenne plutôt qu'avec l'HbA1c. Noberasco et coll., dans une étude chez des sujets diabétiques de type 1 et 2 confondus (48), trouvent aussi une corrélation positive entre l'équilibre glycémique et le taux plasmatique de MDA; ils notent que les sujets diabétiques présentant un mauvais équilibre métabolique montrent les taux plasmatiques de MDA les plus importants.

Le taux de MDA est aussi significativement plus élevé chez les sujets DNID porteurs de macroangiopathies (31) ou de microalbuminurie (19) laissant soupçonner le rôle de la LPX dans les complications diabétiques.

Certaines études notent une corrélation positive du taux de MDA plasmatique avec l'âge et l'obésité (71).

Le taux de MDA érythrocytaire est également plus élevé chez les sujets DNID (29).

22. Elévation du taux de diènes conjugués plasmatiques.

Jennings et coll. (36) ont montré une élévation du taux de diènes conjugués chez les sujets diabétiques (type 1 et 2 confondus) qui n'apparaît pas être liée à l'équilibre glycémique. Collier et coll. (18) retrouvent une augmentation du diène conjugué de l'acide linoléique seulement chez les DNID porteurs de microalbuminurie alors que les DNID normoalbuminuriques présentent des taux identiques à ceux des contrôles.

23. Diminution du taux de SOD érythrocytaire.

De façon générale, le taux de SOD érythrocytaire apparaît abaissé chez le sujet DNID par rapport à des sujets témoins (19, 29) et serait responsable de l'augmentation d'activité des radicaux libres. Une étude chinoise rapporte une activité de SOD plus importante chez les sujets DNID (42).

La glycosylation non enzymatique (GNE) de la SOD serait en partie à l'origine de la baisse d'activité de celle-ci (71, 50). Lorsqu'elle est reproduite *in vitro* en présence de glucose, elle montre que la baisse d'activité de la SOD glycosylée par rapport à la SOD non glycosylée est fonction du temps d'incubation avec le glucose et de la concentration en glucose (50). Pourtant, la baisse d'activité est proportionnellement plus importante que le taux de SOD glycosylée (50) et l'activité spécifique de la SOD glycosylée est 2 fois plus faible chez les sujets DID par rapport aux sujets sains (37): ces éléments laissent supposer l'intervention d'autres facteurs que la GNE dans la baisse d'activité de l'enzyme. Il pourrait s'agir du peroxyde d'hydrogène formée par la SOD (celui-ci peut effectivement inactiver l'enzyme

(10)), à moins que l'énolisation du glucose soit un facteur supplémentaire d'altération de l'enzyme (50, 35).

Oda et coll. (50) montrent que l'activité de la SOD érythrocytaire chez le sujet DNID est inversement corrélée avec le taux de glucose plasmatique mais pas avec l'HbA1c. C'est donc le glucose par lui-même plutôt que la durée d'hyperglycémie qui interviendrait dans l'inactivation de l'enzyme. D'autres études ont aussi montré que la SOD était plus susceptible à la GNE que d'autres protéines comme l'hémoglobine et l'albumine (37).

Il est intéressant de noter que la glycation de la SOD s'effectue au niveau de Lys¹²² et Lys¹²⁸, localisées au site actif de l'enzyme, situées en surface de la molécule donc facilement attaquées par le glucose (7).

La durée de la maladie ou l'âge du patient ne semble pas influencer l'activité enzymatique (50).

Curieusement, certains auteurs ne retrouvent pas de différence d'activité de la SOD alors qu'ils notent une élévation du niveau de LPX plasmatique (71).

24. Modification des taux de GPX, glutathion réductase et catalase

Matkovics et coll. trouvent une augmentation de l'activité de la GPX érythrocytaire (43), alors que d'autres études ne décrivent pas de différences d'activité de la GPX intraérythrocytaire (29) ou évaluée sur sang total (71). De même, il n'est pas noté de différence d'activité de la glutathion réductase du sang total (71), ni de la catalase intraérythrocytaire (43).

25. Diminution du taux de thiols plasmatiques

Les thiols sont représentés principalement par le glutathion. Leur taux plasmatique apparaît diminué chez les sujets DNID alors que le taux érythrocytaire ne présenterait pas de différence par rapport aux sujets témoins (19). Une autre étude effectuée sur des érythrocytes de sujets DNID rapporte cependant un abaissement du taux de glutathion (29). On connaît aussi l'importance d'un système intraérythrocytaire de protection contre le stress oxydatif dépendant du glutathion, lequel est aussi diminué chez le sujet DNID (29).

26. Anomalies du métabolisme des oligoéléments (71)

Les oligoéléments, en tant que donneurs ou accepteurs d'électrons, jouent un rôle dans les réactions de lipoperoxydation; certains (cuivre, zinc, manganèse, sélénium) sont au coeur du site catalytique des enzymes de protection contre la LPX. Des anomalies du métabolisme des oligoéléments sont associées aux troubles de la glycorégulation et à l'insulinorésistance et

sont encore plus prononcées chez le sujet diabétique avec complications. Ainsi, le taux de cuivre plasmatique est plus élevé chez les sujets diabétiques surtout lorsqu'il existe des complications vasculaires. On note aussi une hyperzincurie associée à un taux de zinc plasmatique abaissé. Par contre, le taux de manganèse plasmatique n'est pas différent de celui des sujets contrôles.

En fait, de nombreuses études se sont penchées sur ce métabolisme chez le sujet diabétique et donnent des résultats souvent contradictoires, sans doute liés au recrutement des patients. En effet, les anomalies pourraient être en relation avec un mauvais contrôle de l'équilibre glycémique et avec la présence ou l'absence de complications vasculaires.

A côté des oligoéléments, le sujet diabétique présente une hypermagnésurie sans modification du taux de magnésium plasmatique.

27. Augmentation du taux de LDL oxydées

Les LDL des sujets diabétiques sont sans doute plus susceptibles à l'oxydation que les LDL des sujets normaux, même si certains auteurs ne le retrouvent pas (67); ce caractère est encore plus prononcé chez les sujets DNID présentant des complications cardiovasculaires par rapport aux sujets DNID sans complications (32). Il est aussi en relation avec la glycosylation des LDL et leur enrichissement en cholestérol estérifié (12) et en LDL-TG (32). D'ailleurs, les LDL de patients hypercholestérolémiques (diabétiques ou non) sont aussi plus facilement oxydables (12). La surcharge des LDL en cholestérol estérifié et en triglycérides est à l'origine d'une surcharge en acides gras: on suggère que l'accroissement du potentiel de LPX des LDL pourrait être lié à un enrichissement en AGPI, cible privilégiée des radicaux libres (12, 32). Il est possible que des différences de peroxydabilité des LDL, observées dans différents groupes de population proviennent de la nature des acides gras estérifiant le cholestérol (32).

D'après Bowie et coll. (12), la peroxydabilité des LDL serait corrélée à leur glycation, alors que Gallou et coll. (32) ne notent pas de corrélation avec les paramètres de l'équilibre glycémique.

28. Conclusion

A travers différentes études, le phénomène de lipoperoxydation apparaît donc augmenté chez le sujet DNID, surtout quand il existe des complications vasculaires (18, 31, 32), laissant entrevoir son rôle possible dans ces complications.

En fait, de nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer la LPX: le régime alimentaire et sa teneur en AGP (32), l'obésité, l'âge (71), l'insulino-résistance et surtout l'équilibre du contrôle glycémique qui reste controversé.

Pourtant, il est possible qu'un mauvais contrôle glycémique puisse directement influencer la LPX (6, 48):

- d'une part, le déficit en insuline est responsable d'une baisse d'activité du shunt des pentoses normalement source de NADPH. Or celui-ci est nécessaire à la réduction enzymatique du glutathion oxydé en glutathion réduit. Par ailleurs, dans les tissus dans lesquels le transport de glucose est indépendant de l'insuline, la forte concentration de glucose intracellulaire induite par le diabète, stimule la production de sorbitol par la voie des polyols, consommatrice de NADPH. La compétition de l'aldose-réductase avec la glutathion-réductase vis-à-vis d'un taux abaissé de NADPH dans le diabète pourrait donc être à l'origine de la baisse d'activité du système antioxydant dépendant du glutathion (6, 19).

- d'autre part, l'hyperglycémie est soupçonnée être à l'origine d'un stress oxydatif (35). L'incubation d'érythrocytes normaux en présence de glucose, à une concentration similaire à celle d'un plasma diabétique, montre une augmentation de la lipoperoxydation (57). Le glucose et d'autres monosaccharides sont en effet capables de s'énoliser et de réduire l'oxygène moléculaire en générant du peroxyde d'hydrogène et des intermédiaires de radicaux libres (68). Hunt et coll. (35) montrent une fragmentation des protéines médiée par le glucose: dans des conditions physiologiques de pH et de température, le glucose produit des radicaux hydroxyle en présence de métaux de transition, aboutissant à une altération structurale de l'albumine bovine jusqu'à la fragmentation; il induit aussi la LPX de liposomes et de LDL. Ces auteurs notent que glycation et LPX sont des phénomènes concomitants dans les LDL modifiées par le glucose *in vitro*. Glycation et production de radicaux libres apparaissent donc comme deux phénomènes proches dans le diabète. La glucotoxicité en présence de métaux de transition serait facilitée par les anomalies de ce métabolisme (71).

Les anomalies de LPX observées dans le diabète restent encore obscures, d'autant que les études menées jusqu'ici apportent parfois des résultats contradictoires (ces différences pourraient être liées à la variété des populations diabétiques étudiées). Les principales protections contre la LPX (SOD, GSH) apparaissent diminuées et peuvent être aussi bien la cause que le résultat d'une augmentation de la LPX. Dans tous les cas, le diabète est responsable de la formation de LDL modifiées et oxydées.

3. CONSEQUENCES DE CE DESEQUILIBRE: RISQUE ATHEROGENE

Des études épidémiologiques ont montré une surmortalité d'origine vasculaire chez les sujets DNID, c'est-à-dire une augmentation d'un facteur 2 à 3 par rapport aux sujets non diabétiques; celle-ci est surtout liée à l'athérosclérose (5, 40). De nombreux facteurs de risque sont impliqués mais le déséquilibre lipidique observé chez le sujet DNID pourrait jouer un rôle majeur dans la survenue précoce d'une atteinte macrovasculaire.

31. Constitution de la plaque d'athérome

La lésion la plus précoce est la *strie lipidique*, obtenue par accumulation sous l'endothélium de cellules spumeuses, macrophages chargés de cholestérol apporté par les LDL circulantes (8, 22, 26).

En fait, tout débute par l'attachement de monocytes ou de polynucléaires à l'endothélium artériel, qu'ils traversent pour se loger dans l'espace sous-endothélial, où ils se chargent de lipides et se transforment en cellules spumeuses. C'est aussi à ce niveau que les monocytes acquièrent les caractères des macrophages (26). En réponse à la lésion endothéliale, les cellules musculaires lisses de la média migrent et prolifèrent dans l'intima. A ce stade, apparaît la *plaque d'athérome constituée* présentant plusieurs couches de cellules musculaires lisses dans lesquelles sont intriquées les cellules spumeuses et qui sont entourées par du tissu conjonctif (26). Des calcifications peuvent apparaître. La plaque peut aussi s'ulcérer et mettre à nu le sous-endothélium, permettant la formation d'un thrombus plaquettaire (8, 26).

Le macrophage ne semble pas capter les LDL natives par les récepteurs LDL classiques apo B/E soumis à la "down" régulation, qui sont d'ailleurs faiblement représentés sur le macrophage (22). On notera cependant que ce récepteur lie avec une forte affinité les lipoprotéines contenant l'apo E: remnants de chylomicrons, VLDL, VLDL fortement chargés en triglycérides (8).

En fait, seules les LDL modifiées sont captées par le macrophage grâce à un récepteur *scavenger* ou *éboueur*, non régulé par le contenu cellulaire en cholestérol, ce qui explique la formation de ces cellules spumeuses surchargées en cholestérol (8, 22, 26). Il existe d'ailleurs certainement plusieurs récepteurs scavenger différents adaptés aux modifications subies par les LDL (22).

Différentes études *in vitro* ont montré la captation par le macrophage, via le récepteur éboueur, de LDL modifiées par acétylation ou méthylation, par le MDA, par le 4-hydroxynonéal, ou en présence de cellules, notamment de cellules endothéliales (22).



En fait, la LPX des LDL apparaît intimement liée à leur captation par le récepteur scavenger du macrophage, notamment par modification des résidus lysine de l'apo B avec formation d'un ou plusieurs épitopes nouveaux (22, 26). Les LDL ainsi modifiées ne sont alors plus reconnues par leur récepteur spécifique apo B/E, mais par le récepteur éboueur des macrophages lorsque 30% des résidus lysine ont réagi (26). Ces LDL modifiées présentent des propriétés physico-chimiques différentes et entre autres une charge plus négative (22) qui explique l'affinité avec le récepteur scavenger (8).

De cette façon, les LDL oxydées contribuent à l'athérosclérose d'autant que:

- elles possèdent un chimiotactisme pour les monocytes qui affluent dans l'intima,
- elles inhibent la motilité des macrophages et favorisent leur rétention dans l'intima,
- elles sont cytotoxiques vis-à-vis de l'endothélium et pourraient intervenir dans le processus de prolifération des cellules musculaires lisses (8, 22).

Il est probable que les LDL soient oxydées dans l'espace sous-endothélial par les monocytes et macrophages activés, plutôt que dans la circulation. La réaction radicalaire est cependant ubiquitaire et on ne peut pas exclure une oxydation des LDL en dehors du sous-endothélium (26).

Les phénomènes d'inflammation et d'hémostase semblent aussi liés à la LPX et à la constitution de la plaque d'athérome, à travers la production de radicaux libres (26).

32. Les facteurs de risque d'athérosclérose

Il est maintenant bien établi que l'hypertension artérielle, le tabagisme et l'hypercholestérolémie sont les principaux facteurs de risque d'athérosclérose et donc de maladies cardiovasculaires (40).

Concernant le cholestérol, un taux plasmatique inférieur à 5,2 mmol/l est recommandé afin de réduire le risque athérogène mais c'est surtout la fraction LDL-C qui importe (8, 22). Parmi les LDL, il existe en fait une micro-hétérogénéité: plusieurs sous-fractions à potentiel athérogène différent sont séparables, dont le profil de distribution est caractéristique de chaque dyslipidémie. L'athérosclérose apparaît alors corrélée à une prépondérance de LDL anormales, plus petites, plus denses, plus chargées négativement et dont le profil s'accompagne d'une hausse des triglycérides et d'une baisse du HDL-C. Il est vrai que les LDL les plus denses sont catabolisées moins vite par la voie du récepteur classique. De même, les LDL apparaissent hétérogènes au sein des épitopes de l'apo B, ce qui peut altérer leur métabolisme (22).

Sur le plan des lipoparticules, la Lp AI, seule HDL capable d'efflux de cholestérol, se présente comme un marqueur de protection vis-à-vis de l'athérosclérose alors que les sujets coronariens présentent des taux de LpE:B et Lp(a):B significativement plus élevés par rapport aux témoins (25).

33. Facteurs de risque du sujet DNID

Les sujets DNID présentent les mêmes facteurs de risque cardiovasculaire que la population générale; cependant, à risques classiques égaux, ils présentent deux fois plus de maladies cardiovasculaires. De nouveaux facteurs de risque sont à l'étude chez le sujet DNID (40). On notera qu'il n'existe pas de relation entre athérosclérose et durée du diabète (5).

331. Anomalies lipidiques

Elles ont été développées aux chapitres précédents et font partie des facteurs de risque classiques. Les principales sont l'hypertriglycémie, la diminution du HDL-C, l'augmentation du LDL-C, les modifications qualitatives des lipoprotéines (modifications du rapport lipides/apolipoprotéines au sein des lipoprotéines, glycation et oxydation des LDL), augmentation de la LPX. On notera que les patients DNID atteints de maladie cardiovasculaire présentent des taux sanguins de Lp B:C plus importants (3).

332. Hyperglycémie

Elle apparaît finalement jouer un rôle majeur dans le risque cardiovasculaire (14, 40). Elle pourrait être responsable (5):

- de l'augmentation de perméabilité de l'endothélium aux protéines plasmatiques suite à une souffrance des cellules endothéliales,
- de l'augmentation d'activité des cellules musculaires lisses,
- de la glycation de la matrice extracellulaire artérielle facilitant le dépôt de protéines plasmatiques et l'activation des monocytes-macrophages (5, 14). La GNE devient alors inductrice d'artériosclérose, phénomène complémentaire de l'athérosclérose dans l'explication d'un excès de risque artériel chez le sujet diabétique; d'autant que les plaques d'athérome ne sont pas forcément plus étendues chez les sujets diabétiques par rapport à des témoins et que le diabète favorise surtout l'ischémie cardiaque par des mécanismes mal élucidés (15).

Par ailleurs, les LDL modifiées par GNE au niveau des résidus lysine de l'apo B présentent une moindre affinité pour le récepteur LDL et sont davantage captées par le macrophage, sans doute après dégradation, car le récepteur scavenger n'intervient pas ici (22). Les LDL glyquées sont également immunogènes et il existe *in vivo* des autoanticorps anti-

LDL glyquées. Des complexes immuns peuvent se former et être captés par le macrophage via le récepteur Fc (22). De cette façon, les LDL glyquées peuvent générer des cellules spumeuses et participer à la formation accélérée de l'athérome des diabétiques.

333. Hyperinsulinisme

Il a été évoqué comme facteur de risque d'athérosclérose. Seul l'argument selon lequel l'insuline stimule la prolifération des cellules musculaires lisses est convaincant. En fait, les dernières études montrent que ce n'est pas un facteur indépendant et qu'en plus, il ne jouerait pas le même rôle chez un sujet diabétique ou non (5, 14, 40).

334. Coagulation et fibrinolyse (5)

Le diabète se présenterait comme un état d'hypercoagulabilité avec augmentation du fibrinogène, du facteur VIII coagulant, de l'activité thrombinique et avec réduction de l'activité fibrinolytique, qui peut être en relation avec une augmentation de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène PAI-1.

335. Nouveaux facteurs de risque (40)

Différents paramètres font actuellement l'objet d'études autant chez les sujets DNID que dans la population générale: le fibrinogène, l'hématocrite, l'augmentation du PAI-1, la microalbuminurie, la Lp(a) (pour des valeurs > 0,3 g/l), le polymorphisme du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine dans sa forme homozygote DD.

Les mécanismes par lesquels le risque cardiovasculaire du sujet diabétique est accru ne sont pas entièrement élucidés. Ils s'expriment à travers l'athérosclérose doublée d'artériosclérose et d'ischémie. A l'origine, l'hyperglycémie et les troubles lipidiques occupent certainement une place majeure.

C. METHODES D'ETUDE DU METABOLISME LIPIDIQUE CHEZ LE SUJET DNID

Compte tenu des troubles lipidiques observés chez les sujets DNID et de l'importance du risque cardiovasculaire, il apparaît indispensable de mieux connaître ce métabolisme, à travers des études statiques ou dynamiques ou encore des protocoles originaux.

1. EXPLORATION STATIQUE OU DYNAMIQUE

11. Exploration statique

L'exploration du métabolisme lipidique chez le sujet DNID fait en général appel au dosage sérique ou plasmatique des différents paramètres lipidiques évalués à jeun.

Le bilan de base inclut *cholestérol total* et *triglycérides*.

En tant que marqueurs du risque cardiovasculaire, le *HDL-C*, le *LDL-C*, ainsi que les *apo AI* et *B*, qui ne sont pas directement superposables aux précédents, sont intéressants (53).

La détermination des *sous-fractions des différentes lipoprotéines* par ultracentrifugation (3) ou électrophorèse (70) apporte des renseignements sur leur répartition dans le DNID et leur impact sur la maladie.

Les *acides gras libres* renseignent sur l'insulinorésistance et l'équilibre entre les métabolismes glucidique et lipidique (41).

Comme les lipoprotéines ne sont en fait qu'un mélange de *particules lipoprotéiques*, de composition définie en apolipoprotéines, il est important d'évaluer leur répartition chez le sujet DNID, en même temps que les apolipoprotéines concernées et les différentes classes de densité des lipoprotéines, afin de mieux cerner leur métabolisme. Actuellement, il est possible de doser par immunoprécipitation séquentielle les LP AI, LP AI:AI, LP B, LP B:CIII, LP B:CIII:E (3, 28).

12. Exploration dynamique

Différentes études dynamiques permettent une approche *in vivo* du métabolisme lipidique du sujet DNID, entre autres. Il s'agit par exemple:

- du métabolisme postprandial des chylomicrons et particules remnants, après ingestion d'un repas riche en graisse et en vitamine A (41).
- du transport de l'apo B à travers la cascade métabolique VLDL → IDL → LDL, avant et après traitement par insuline, grâce à un marquage radioactif (66).

Ces deux études évaluent par ailleurs l'activité de la *lipoprotéine lipase* qui intervient dans le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides.

2. PROTOCOLES PARTICULIERS

Ceux qui nous intéressent sont ceux qui, inversement, étudient l'effet d'une perfusion lipidique sur le métabolisme glucidique.

Ces protocoles visent à vérifier l'hypothèse de Randle, selon laquelle il existe une compétition entre les AGL et le glucose pour l'utilisation par le muscle (58).

La plupart des études ont été menées chez le sujet sain et font appel à une perfusion lipidique (qui permet d'augmenter le taux d'AGL), notamment lors de clamp euglycémique (11) ou lors d'hyperglycémie provoquée par voie orale (45). Elles confirment la baisse d'utilisation périphérique du glucose et l'augmentation compensatrice d'insuline, induites par un taux élevé d'AGL.

Chez le sujet DNID, en l'absence de sécrétion appropriée d'insuline, on note une hyperglycémie postabsorptive prolongée induite par perfusion lipidique (61).

III. NOTRE TRAVAIL:**ETUDE DES PARAMETRES LIPIDIQUES****ET DU SYSTEME DE DEFENSE ANTIOXYDANTS****CHEZ LE DIABETIQUE DE TYPE 2****SOUMIS A UNE PERFUSION DE TRIGLYCERIDES****SUIVIE D'UNE NORMALISATION DE SA GLYCEMIE****PAR INSULINE**

A. INTRODUCTION

Notre travail tient son originalité de l'utilisation d'un protocole clinique, élaboré dans le service de Nutrition Clinique et Diabétologie de l'hôpital Pellegrin à Bordeaux et destiné à l'étude du cycle de Randle chez le diabétique de type 2.

Randle et coll. (58) ont démontré une compétition entre le glucose et les acides gras libres qui expliquerait l'insulinorésistance observée chez les sujets obèses et les sujets DNID.

La perfusion de lipides peut d'ailleurs induire expérimentalement une hyperglycémie à l'état postabsorptif chez le patient DNID (62).

Des sujets diabétiques de type 2 ont été soumis à une perfusion lipidique. L'étude des paramètres lipidiques (notamment des lipoparticules) et du système de défense antioxydants a été réalisée: (i) en situation de déséquilibre métabolique (ii) lors de la charge lipidique (iii) en état d'équilibre glycémique après insulinothérapie.

Le concept "assez nouveau" de lipoparticules apporte un nouvel "éclairage" sur le métabolisme des lipides (56) et leurs modifications chez les sujets DNID pourraient contribuer en partie à mieux comprendre la forte prévalence des coronaropathies (3, 28). Le stress oxydatif semble aussi jouer un rôle important dans la survenue des complications du diabète (35) où les systèmes de défense sont souvent affaiblis (19).

Il nous a donc paru intéressant d'étudier ces paramètres au cours d'une charge lipidique. Afin de pouvoir évaluer l'hypothèse de Randle, la mesure de la glycémie a été ajoutée au bilan lipidique avant et à la fin de la perfusion de triglycérides.

B. MATERIEL ET METHODES

1. SUJETS ETUDIES

L'étude a porté sur 8 sujets DNID mal équilibrés et 15 sujets sains témoins.

11. Sujets DNID

Ils ont été sélectionnés, entre janvier et mai 1994, dans le service de nutrition clinique et diabétologie de l'hôpital Pellegrin à Bordeaux, selon les critères suivants:

- d'inclusion: sujets DNID, dont l'hyperglycémie chronique ne répond plus au traitement par les sulfamides hypoglycémiant, ou à l'association sulfamides hypoglycémiant/biguanides.

- d'exclusion: sujets DNID présentant un mauvais capital veineux ou un risque cardiovasculaire ou un risque de pancréatite.

Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le tableau suivant:

Nombre	8	
Sexe (hommes/femmes)	2 / 6	
Age	54,1 ± 9,1	(41 - 64)
BMI (kg/m ²)	29,2 ± 5,8	(20,2 - 37,3)
Durée de la maladie (années)	7,1 ± 5,1	(0 - 15)
Glycémie à jeun (mmol/l)	12,4 ± 2,5	(9,1 - 16,9)
HbA1c (%)	10,1 ± 2,2	(6,37 - 14,28)

Parmi les sujets présentant des complications, on retrouve:

- deux rétinopathies non prolifératives (1 homme, 1 femme)
- une rétinopathie proliférative (1 femme)
- une artériopathie distale des membres inférieurs associée à une rétinopathie non proliférative (1 femme)
- une néphropathie (1 femme)

L'autre moitié des sujets (1 homme, 3 femmes) ne présentait pas de complication diabétique.

Trois sujets (1 homme, 2 femme) étaient traités par hypocholestérolémiant avant l'expérimentation.

Avant leur hospitalisation, la moitié des sujets était traitée par sulfamide hypoglycémiant seul; l'autre moitié, par l'association sulfamide hypoglycémiant/biguanide.

12. Sujets témoins

Quinze sujets sains volontaires ont été recrutés parmi les techniciens du laboratoire de biochimie de Pellegrin, afin de constituer un groupe témoin pour l'exploration de la lipoperoxydation (GPX et état total antioxydant).

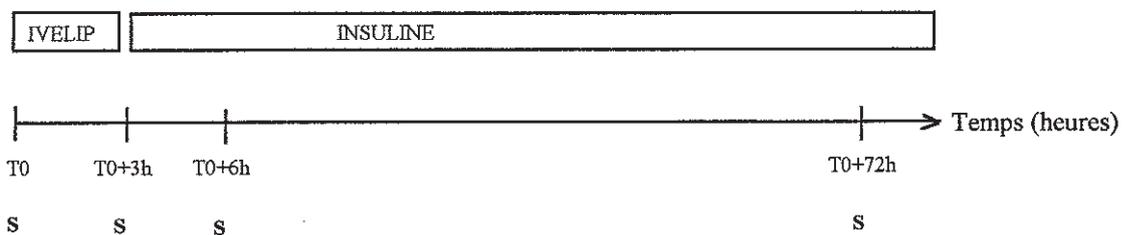
Les critères de sélection étaient les suivants: sujet sain indemne de toute maladie, non fumeur, normolipémique, sans prise récente de médicament (notamment de vitamine C).

Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le tableau suivant:

Nombre	15	
Sexe (hommes/femmes)	4 / 11	
Age	40,1 ± 7,5	(29 - 58)
Cholestérol total (mmol/l)	5 ± 0,83	(3,9 - 6,5)
Triglycérides (mmol/l)	0,84 ± 0,36	(0,41 - 1,64)

2. PROTOCOLE D'ETUDE

Après un jeûne de 12 heures (depuis la veille au soir), les sujets DNID ont été soumis à un protocole d'étude sur 72 heures, selon le schéma suivant:



s = prélèvement sanguin

Les sujets ont été perfusés avec une solution d'Ivélip 20% (composition: triglycérides = 20 g; phospholipides = 1,2 g; glycérol = 2,5 g; oléate de sodium = 30 mg; eau qsp 100 ml) (0,015 ml/kg/mn) pendant les trois premières heures; puis leur glycémie a été

normalisée grâce à une perfusion continue d'insuline durant trois jours. Les repas ont été autorisés après la perfusion d'Ivélip.

Des prélèvements sanguins ont été effectués avant et à la fin de la perfusion lipidique, après 3 heures d'insulinothérapie et au terme de la normalisation de la glycémie par l'insuline, à To+72 heures, afin de déterminer un bilan lipidique complet ainsi que 2 paramètres du stress oxydatif.

3. METHODES

31. Prélèvements sanguins

Le bilan lipidique a été effectué sur sérum. Pour l'étude du stress oxydatif, la pIGPX a été évaluée sur plasma hépariné et l'état total antioxydant sur sérum.

La glycémie a été dosée sur sérum fluoré.

Les tubes secs et héparinés ont été acheminés rapidement dans la glace au laboratoire de biochimie. Après centrifugation à +4°C pendant 10 mn à 3000 tours/mn, les sérums et plasmas destinés à l'évaluation ultérieure du stress oxydatif, des apolipoprotéines et des lipoparticules, ont été immédiatement décantés, aliquotés et congelés à -20°C.

Les dosages des cholestérol total et HDL, des triglycérides, des phospholipides, ainsi que le lipoprotéinogramme ont été effectués dans les 24 heures suivant le prélèvement. Quant au dosage des acides gras non estérifiés, celui-ci a été fait dans l'heure suivant le prélèvement.

32. Méthodes de dosage

321. Bilan lipidique

a) Cholestérol total

Son dosage a été effectué sur l'automate DAX 48-TECHNICON avec le réactif TECHNICON, par une technique enzymatique utilisant une cholestérol estérase et une cholestérol oxydase en trois étapes:

1) hydrolyse des esters de cholestérol en cholestérol libre et acides gras par la cholestérol estérase.

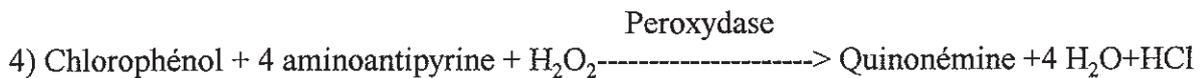
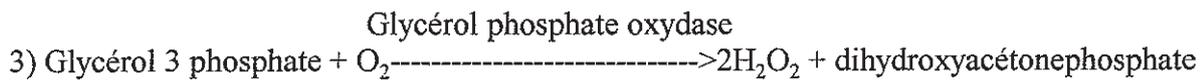
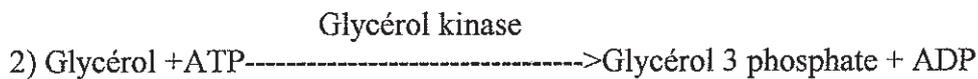
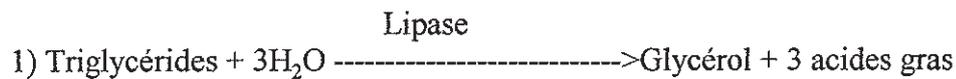
2) oxydation par l'oxydase du cholestérol libre en cholestérol 4ène 3one avec production d'eau oxygénée

3) dosage de l'eau oxygénée formée grâce à une peroxydase et un chromogène phénolique avec obtention d'une quinone-imine colorée en rose et dosée par colorimétrie en point final à 524 nm. La coloration de la quinone-imine est proportionnelle à la concentration en cholestérol total de l'échantillon.

Les normes du laboratoire vont de 3,9 à 6,5 mmol/l.

b) Triglycérides

Son dosage a été effectué sur l'automate DAX 48-TECHNICON avec le réactif TECHNICON, par une technique enzymatique reposant sur le dosage enzymatique colorimétrique du glycérol libéré après action de la lipase selon le schéma réactionnel suivant:

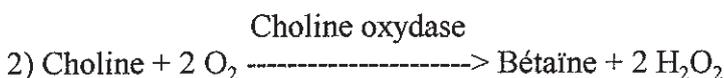
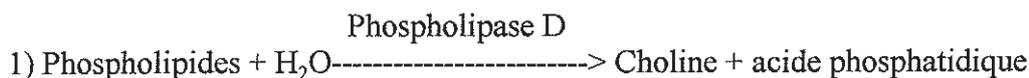


L'intensité de la coloration rouge violacé de la quinone-imine est mesurée par spectrophotométrie à 524 nm. La coloration obtenue est proportionnelle à la concentration des triglycérides sériques.

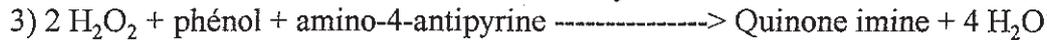
Les normes du laboratoire vont de 0,45 à 1,90 mmol/l.

c) Phospholipides.

Son dosage a été effectué sur sérum frais, grâce au coffret "Phospholipides enzymatiques PAP 150" du laboratoire BioMérieux. C'est une technique manuelle enzymatique utilisant la phospholipase D, qui hydrolyse les phospholipides en libérant la choline, dosée par la réaction de TRINDER, selon le schéma réactionnel suivant:



Peroxydase



L'intensité de la coloration de la quinone-imine est mesurée par spectrophotométrie à 505 nm. La coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en phospholipides contenus dans l'échantillon sérique.

Les normes du laboratoire vont de 2,0 à 3,60 mmol/l.

d) Cholestérol HDL.

Son dosage a été effectué sur sérum frais à l'aide des coffrets "HDL-C" et "MPR 1 Cholestérol Méthode CHOD-PAP" du laboratoire BOEHRINGER MANNHEIM. Il est basé sur la précipitation des chylomicrons, des VLDL et des LDL lors d'addition d'acide phosphotungstique et d'ions Mg^{++} au sérum (coffret HDL-C). Après centrifugation, le cholestérol des HDL est dosé sur le surnageant par une technique manuelle enzymatique (coffret MPR 1).

Les normes du laboratoire vont de 1,20 à 2,20 mmol/l.

e) Lipoprotéinogramme

Il a été effectué à l'aide du kit HYDRAGEL LIPO + Lp (a) du laboratoire Sébia, sur sérum frais par électrophorèse en gel d'agarose.

Les normes du laboratoire sont: -Alpha-lipoprotéines (HDL) : 30 à 45%

-Pré-béta-lipoprotéines (VLDL) : < 20%

-Béta-lipoprotéines (LDL) : 45 à 60%

f) Apolipoprotéines A1, B, C2, C3 et E

Elles ont été dosées par immunonéphélémétrie sur l'automate BNA-BEHRING.

Les normes du laboratoire sont:

Apo AI : 1.30 à 1.85 g/l.

Apo B : 0.50 à 1.60 g/l.

Apo CII : 21 à 47 mg/l.

Apo CIII: 45 à 105 mg/l.

Apo E : 29 à 53 mg/l.

g) Lipoprotéine (a)

Le dosage de la Lp(a) a été effectué grâce au kit HYDRAGEL Lp(a) du laboratoire Sebia, sur sérum congelé par une technique d'électroimmunodiffusion en gel d'agarose. Un anticorps monospécifique anti apo(a) est incorporé dans le gel d'agarose. L'étalonnage est effectué grâce à un sérum standard calibré en Lp(a). Les sérums et les standards dilués migrent dans le gel et donnent des pics d'immunoprécipitation dont la hauteur est proportionnelle à la concentration en Lp(a).

Les valeurs considérées comme normales sont inférieures à 0.30 g/l.

h) Lipoparticules LP AI, LP CIII, LP E

Leur dosage a été effectué selon le même principe que celui de la Lp(a), à l'aide des kits HYDRAGEL du laboratoire Sébia, adaptés aux lipoparticules LPAI, LPCIII ou LPE (technique d'électroimmunodiffusion).

* LPAI

Les gels d'agarose contiennent les anticorps monospécifiques anti apoAI et anti apoAII. L'anticorps anti apoAII est incorporé en quantité suffisante afin de bloquer la famille des LPAI:AII lors de la migration du sérum, alors que les particules LPAI continuent leur migration et réagissent avec l'anti apoAI pour former un pic d'immunoprécipitation dont la hauteur est proportionnelle à la concentration en LPAI.

Sur un même gel, on obtient pour chaque puits de dépôt, deux pics, dont le plus petit et le plus intense correspond à l'apoAII, alors que le plus haut et moins coloré correspond aux particules ne contenant que l'apoAI.

L'étalonnage est effectué grâce à un sérum standard calibré en LPAI.

* LPCIII

Il permet le dosage de l'apoCIII totale et de l'apoCIII présente dans les particules ne contenant pas l'apo B (apo CIII LP non B). Par différence, on obtient l'apoCIII des particules contenant l'apo B (apo CIII LP B ou LP B:CIII).

Le gel d'agarose contient l'anticorps monospécifique anti apoCIII. Pour chaque sérum il est effectué un dosage différentiel:

- d'une part migration du sérum natif permettant le dosage de l'apo CIII totale.
- d'autre part migration du même sérum traité par un anti apo B permettant le dosage de l'apo CIII LP non B.

La différence entre les hauteurs des pics du sérum natif et du sérum traité permet la détermination des particules LP B:CIII.

L'étalonnage est effectué grâce à un sérum standard calibré en apo CIII totale.

* LP E

Il s'agit du même dosage différentiel que pour les particules LPCIII, sur sérum natif et sur sérum traité par un anti apo B

Le gel d'agarose contient l'anticorps monospécifique anti apo E.

On détermine ainsi :

- l' apo E totale (sérum natif),
- l' apo E LP non B (sérum traité),
- l' apo E LP B ou LP B:E (par différence).

L'étalonnage est effectué grâce à un sérum standard calibré en apo E totale.

Les normes du laboratoire sont les suivantes:

LP AI	:	0.40	à	0.75 g/l
Apo CIII totale	:	16	à	45 mg/l
Apo CIII LP non B	:	5	à	35 mg/l
Particules LP B:CIII	:	<23		mg/l
Apo E totale	:	13	à	94 mg/l
Apo E LP non B	:	3	à	87 mg/l
Particules LP B:E	:	0	à	32 mg/l

i) Apolipoprotéine AII

Le dosage de l'apo AII a été effectué grâce au kit HYDRAGEL Apo AII du laboratoire Sebia, sur sérum congelé par une technique d'électroimmunodiffusion en gel d'agarose. Un anticorps monospécifique anti apoAII est incorporé dans le gel d'agarose. L'étalonnage est effectué grâce à un sérum standard calibré en apo AII. Les sérums et les standards dilués migrent dans le gel et donnent des pics d'immunoprécipitation dont la hauteur est proportionnelle à la concentration en apo AII.

Les normes du laboratoire vont de 0,30 à 0,60 g/l.

j) Acides gras non estérifiés (dits acides gras libres)

Le dosage a été effectué à l'aide du coffret du laboratoire Unipath. Il s'agit d'une technique manuelle enzymatique colorimétrique en trois temps:

1) Action de l'acyl-CoA synthétase (ACS) en présence d'ATP et de CoA:

ACS



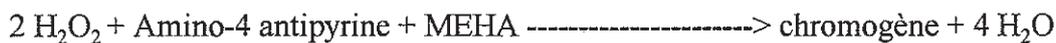
2) Action d'une acyl-CoA oxydase (ACOD) en présence d'oxygène et production d'eau oxygénée:

ACOD



3) Dosage de l'eau oxygénée formée grâce à une peroxydase (POD) en présence de 3-méthyl-N-éthyl-N(6 hydroxyéthyl) aniline (MEHA) et d' amino-4 antipyrine avec obtention d'un chromogène dont l'intensité de coloration est mesurée par spectrophotométrie à 550 nm et est proportionnelle à la concentration en AGL de l'échantillon.

POD



Les normes du laboratoire vont de 0,15 à 0,50 mmol/l.

322. Glycémie

Son dosage a été effectué sur l'automate DAX 48-TECHNICON avec le réactif Glucinet par une technique enzymatique: la glucose oxydase oxyde le D-glucose en acide gluconique avec formation de peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est dosé grâce à une peroxydase en présence d'hydroxy-4-aminophénazone sodique avec formation d'un composé quinonique coloré en rouge. Il en résulte une augmentation d'absorption, directement proportionnelle à la concentration en D-glucose de l'échantillon. La mesure est réalisée en cinétique à 500 nm.

Les normes du laboratoire vont de 4,1 à 5,8 mmol/l.

323. Stress oxydatif

a) Glutathion peroxydase plasmatique

Il a été effectué grâce à la trousse pl.GPx-EIA du laboratoire BIOXYTECH. Il s'agit d'un dosage immunoenzymatique de type "sandwich" spécifique de la glutathion peroxydase plasmatique, utilisant une microplaque contenant des puits recouverts d'anticorps polyclonaux spécifiques de la GPx plasmatique.

Il se déroule comme suit:

- 1- Incubation des plasmas héparinés ou des sérums dilués au 1:150 et testés en double dans les puits de la microplaque, en même temps qu'une gamme d'étalonnage testée aussi en double.
- 2- Lavage et addition de l'anticorps anti-pl.GPX (polyclonal de lapin) marqué à la biotine.
- 3- Amplification de la réaction immunologique par couplage biotine-streptavidine, celle-ci étant liée à la phosphatase alcaline.
- 4- Révélation enzymatique par addition du substrat para-nitro-phényl-phosphate: il se développe une coloration jaune dont l'intensité est fonction de la concentration en GPX plasmatique.

La lecture spectrophotométrique de la microplaque est effectuée grâce au lecteur de microplaque Stat Fax-2100-AWARENESS à 405 nm.

Les résultats sont calculés par interpolation à partir de la courbe d'étalonnage.

b) Etat total antioxydant

Il a été mesuré grâce au kit "Total Antioxydant Status" des laboratoires RANDOX. Le dosage repose sur l'oxydation du substrat chromogène ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) en cation radical ABTS^{•+}, lorsqu'il est en présence de peroxydase (en l'occurrence la metmyoglobine) et de peroxyde d'hydrogène. La réaction s'accompagne d'une coloration bleu-vert mesurée à 600 nm. La présence d'antioxydants dans l'échantillon sérique inhibe le développement de la coloration de façon proportionnelle à la concentration en antioxydants.

Cette technique manuelle s'effectue à 37°C, en deux temps:

1- Mélange de l'échantillon au chromogène et lecture de l'absorbance initiale A1.

2- Addition du substrat H₂O₂ et lecture de l'absorbance A2 après 3 minutes d'incubation.

A2-A1 est la variation d'absorbance de chaque échantillon.

La courbe d'étalonnage est réalisée à l'aide d'un sérum standard calibré.

4. ANALYSE STATISTIQUE

Les données quantitatives, obtenues pour les sujets DNID aux différents temps du protocole, ont été comparées grâce à l'analyse de variance; lorsque ce test a montré une différence significative entre les moyennes aux différents temps, celles-ci ont ensuite été comparées 2 à 2 grâce au test "t" de Student.

Le test de Student a aussi permis la comparaison des autres données quantitatives. Dans un cas précis, nous avons été amenée à utiliser le test de Student adapté à la comparaison d'une moyenne observée à une moyenne théorique.

La corrélation entre 2 paramètres a été étudiée à l'aide du test de r.

C. RESULTATS

1. SUJETS TEMOINS

Il nous a semblé intéressant de comparer les données générales des populations témoins et DNID. Les résultats sont présentés ci-après.

11. Caractères démographiques

	Age	Sexe (H/F)
Sujets témoins	40,1 ± 7,5	4/11
Sujets DNID	54,1 ± 9,1	2/6
t	3,968	NS
p	< 0,001	NS

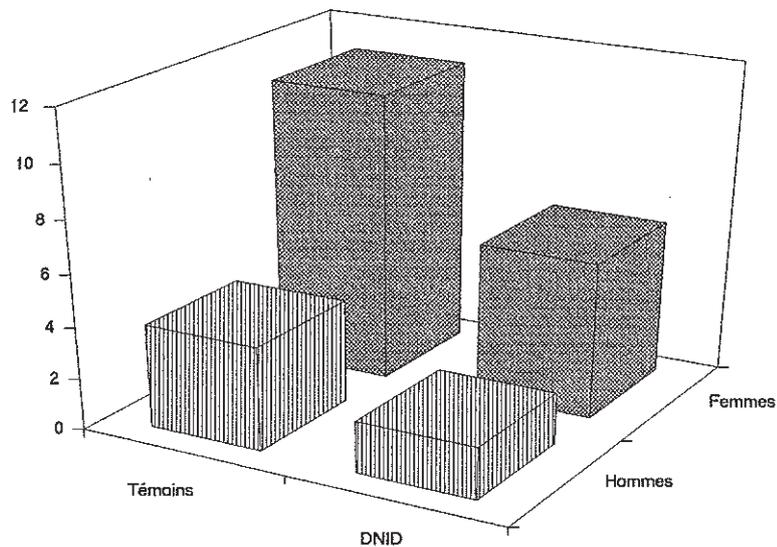


Figure 6: Répartition des sujets témoins et DNID en fonction du sexe

La répartition des sexes est homogène dans les 2 populations, témoins et DNID (fig. 6); par contre, on note une nette différence d'âge entre les 2 populations étudiées comme le montre la figure 7.

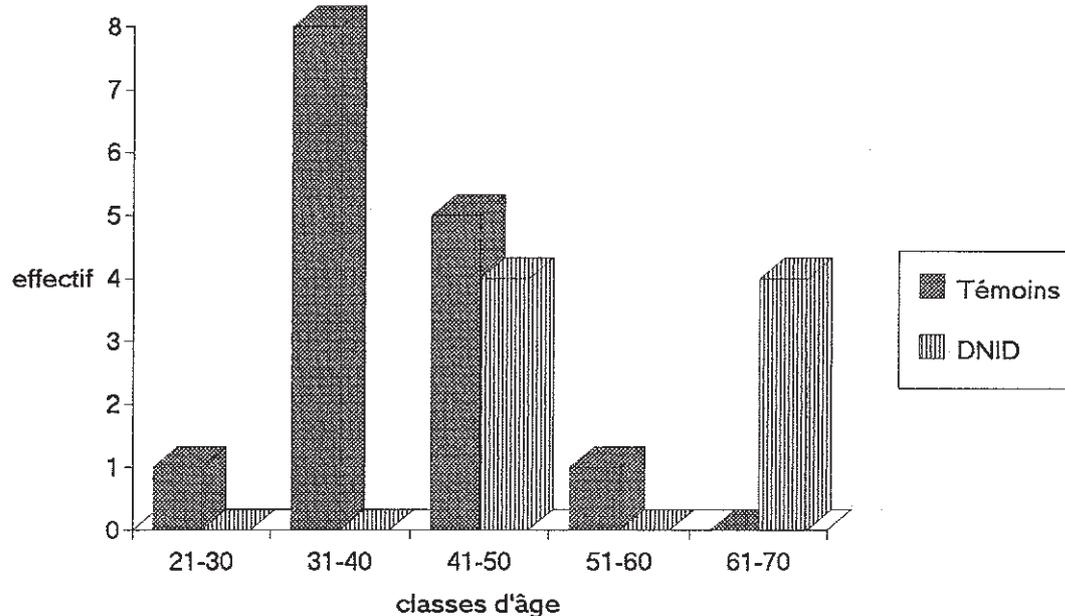


Figure 7: Répartition des témoins et des DNID selon leur âge

12. Paramètres lipidiques

La population témoin est normolipémique; ses valeurs de cholestérol total et de triglycérides sont dans la fourchette de normalité donnée par le laboratoire de biochimie. Concernant les sujets DNID, seul le taux de cholestérol total est dans la fourchette de normalité, alors que le taux de triglycérides est augmenté.

D'ailleurs, si nous comparons la population témoin aux sujets DNID à T0, nous remarquons que seul le taux de triglycérides sériques est significativement différent.

	Cholestérol total (mmol/l)	Triglycérides (mmol/l)
Sujets témoins	$5 \pm 0,83$	$0,84 \pm 0,36$
Sujets DNID à T0	$5,75 \pm 1,26$	$2,79 \pm 1,70$
t	1,67	4,15
p	NS	< 0,001

13. Stress oxydatif

L'expression du stress oxydatif étant variable selon les populations étudiées et surtout selon les conditions opératoires (60), la population témoin nous a permis de déterminer notre propre fourchette de normalité pour la glutathion-peroxydase plasmatique (pIGPX) et l'état total antioxydant (ETA). Cela était d'autant plus important que nous avons utilisé des techniques manuelles dont voici les résultats:

Etat total antioxydant (mmol/l)	$1,38 \pm 0,24$	(1,12 - 2,15)
pIGPX ($\mu\text{g/ml}$)	$8,39 \pm 3,43$	(4,47 - 17,7)

Concernant l'ETA, l'équipe de Rice-Evans donne pour référence chez l'adulte une moyenne de $1,46 \pm 0,14$ mmol/l avec un intervalle de 1,32 - 1,60 mmol/l (60).

La figure 8 montre la répartition des valeurs de l'ETA de notre population témoin. Nous remarquons que:

- la valeur maximale "2,15" n'a été atteinte qu'une fois et apparaît exceptionnelle.
- les 2 valeurs minimales "1,12" et "1,17" sont vraiment basses par rapport aux valeurs données par Rice-Evans.

La comparaison de notre moyenne à celle trouvée par l'équipe de Rice-Evans, à l'aide du test de Student, n'a pas montré de différence significative ($t = 1,33$).

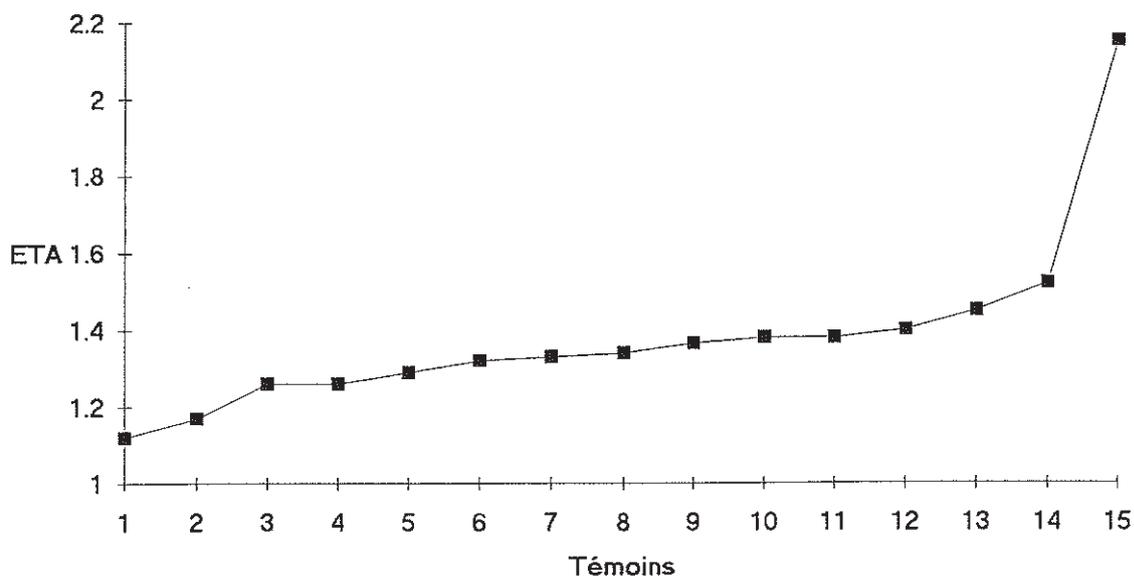


Figure 8: Répartition des valeurs d'ETA dans la population témoin.

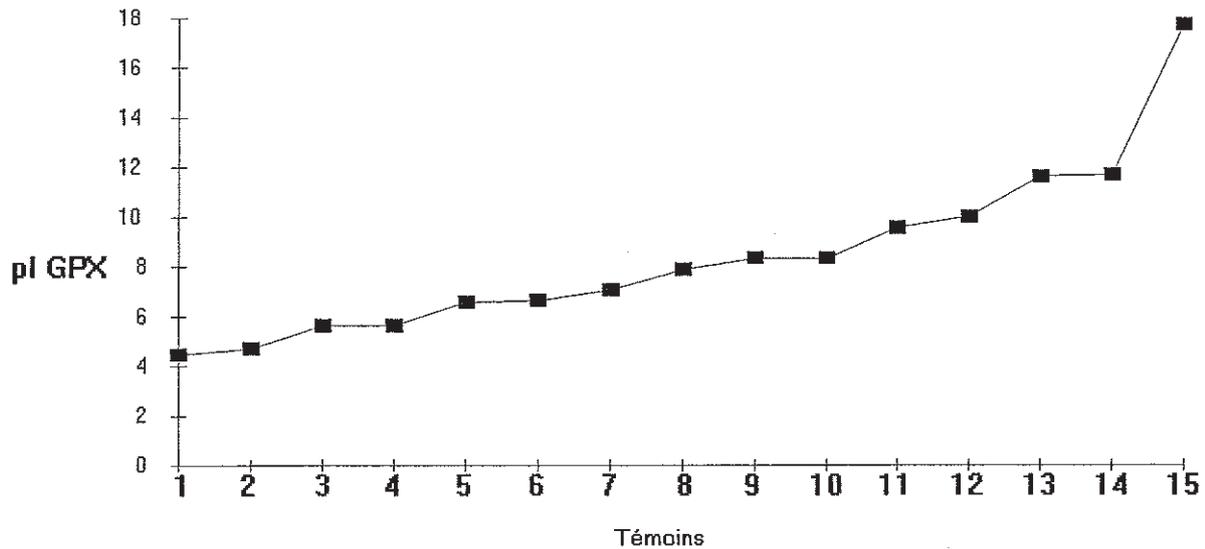


Figure 9: Répartition des valeurs de GPX dans la population témoin.

2. SUJETS DNID

Différents paramètres ont été évalués: ceux du bilan lipidique classique, les apolipoprotéines, les lipoparticules et deux paramètres du stress oxydatif, à des temps différents, selon le protocole. La glycémie et le taux d'AGL ont été dosés uniquement avant et après la charge lipidique. Il nous a paru intéressant d'étudier chaque paramètre aux moments importants qui sont:

- la période de la charge lipidique, entre T0 et T0+3h,
- l'intervalle entre l'arrêt de l'Ivélip et le début de l'insulinothérapie, entre T0+3h et T0+6h,
- la période de normalisation glycémique par insulinothérapie, entre T0 et T0+72h.

Nous rappelons que chaque paramètre a été comparé aux différents temps du protocole, grâce au test ANOVA, et que seuls les paramètres présentant une différence significative de leurs moyennes ont été ensuite comparés deux à deux, aux temps intéressants, à l'aide du test de Student.

21. Paramètres lipidiques classiques

211. Effet de charge lipidique

	T0	T0+3 h	t	p(t)
Cholestérol total (mmol/l)	5,75 ± 1,26	6,76 ± 1,48	NF	NF
Cholestérol-HDL (mmol/l)	0,97 ± 0,15	0,95 ± 0,14	NF	NF
Triglycérides (mmol/l)	2,79 ± 1,70	8,89 ± 4,36	3,45	< 0,01
Phospholipides (mmol/l)	2,78 ± 0,38	4,57 ± 1,20	3,73	< 0,01
HDL (%)	23,45 ± 5,23	24,57 ± 6,50	NF	NF
VLDL (%)	28,58 ± 15,75	34,69 ± 19,19	NF	NF
LDL (%)	46,81 ± 12,85	38,87 ± 15,42	NF	NF
Glycémie (mmol/l)	12,21 ± 1,76	10,45 ± 1,41	9,87	< 0,001
AGL (mmol/l)	0,74 ± 0,22	1,59 ± 0,73	3,16	< 0,01

NF = non fait (i.e. lorsque le test ANOVA ne montrait pas de différence significative entre les moyennes).

Les pourcentages des lipoprotéines ont été obtenus à partir du lipoprotéinogramme.

La perfusion d'Ivélip modifie de façon significative les taux sériques de triglycérides, de phospholipides, d'AGL ainsi que la glycémie.

La figure 10 montre que l'évolution du cholestérol HDL n'apparaît pas influencée par la perfusion lipidique alors que celle du cholestérol total montre une tendance à la hausse, sous l'influence de la perfusion lipidique. Ce profil d'évolution est retrouvé pour chacun des patients. Concernant les lipoprotéines (figure 11), la perfusion d'Ivélip serait à l'origine d'une diminution des LDL avec augmentation compensatrice des VLDL, les HDL restant plutôt stables. Cependant, ce profil d'évolution n'est pas retrouvé chez 3 patients.

212. Entre T0+3h et T0+6h

	T0+3 h	T0+6 h	t	p(t)
Cholestérol total (mmol/l)	6,76 ± 1,48	6,24 ± 1,32	NF	NF
Cholestérol-HDL (mmol/l)	0,95 ± 0,14	0,87 ± 0,17	NF	NF
Triglycérides (mmol/l)	8,89 ± 4,36	4,29 ± 2,07	2,37	< 0,05
Phospholipides (mmol/l)	4,57 ± 1,20	4,01 ± 1,77	0,66	NS
HDL (%)	24,57 ± 6,50	21,94 ± 5,80	NF	NF
VLDL (%)	34,69 ± 19,19	31,24 ± 9,88	NF	NF
LDL (%)	38,87 ± 15,42	45,51 ± 5,31	NF	NF

Trois heures après l'arrêt de la perfusion d'Ivélip, seul le taux de triglycérides sériques a significativement diminué; par contre, le taux de phospholipides reste encore à un seuil anormalement élevé (figure 12). Le profil d'évolution montre que le taux de cholestérol total revient lentement à la valeur de départ; il en est de même pour les lipoprotéines.

213. Effet normoglycémique

	T0	T0+72 h	t	p(t)
Cholestérol total (mmol/l)	5,75 ± 1,26	5,51 ± 1,47	NF	NF
Cholestérol-HDL (mmol/l)	0,97 ± 0,15	0,81 ± 0,16	NF	NF
Triglycérides (mmol/l)	2,79 ± 1,70	2,05 ± 0,92	1,01	NS
Phospholipides (mmol/l)	2,78 ± 0,38	2,58 ± 0,43	1	NS
HDL (%)	23,45 ± 5,23	26,31 ± 6,10	NF	NF
VLDL (%)	28,58 ± 15,75	23,24 ± 9,91	NF	NF
LDL (%)	46,81 ± 12,85	48,52 ± 7,34	NF	NF

Trois jours après la perfusion "ponctuelle" d'Ivélip, et sous insulinothérapie, le bilan lipidique montre des valeurs identiques à celles mesurées à T0, avant la perfusion lipidique: c'est le retour aux valeurs de départ.

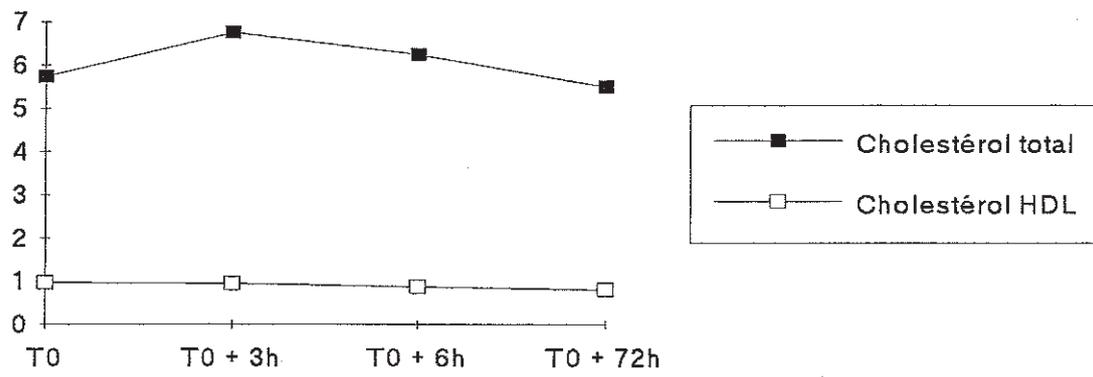


Figure 10: Evolution des cholestérol total et HDL au cours du protocole.

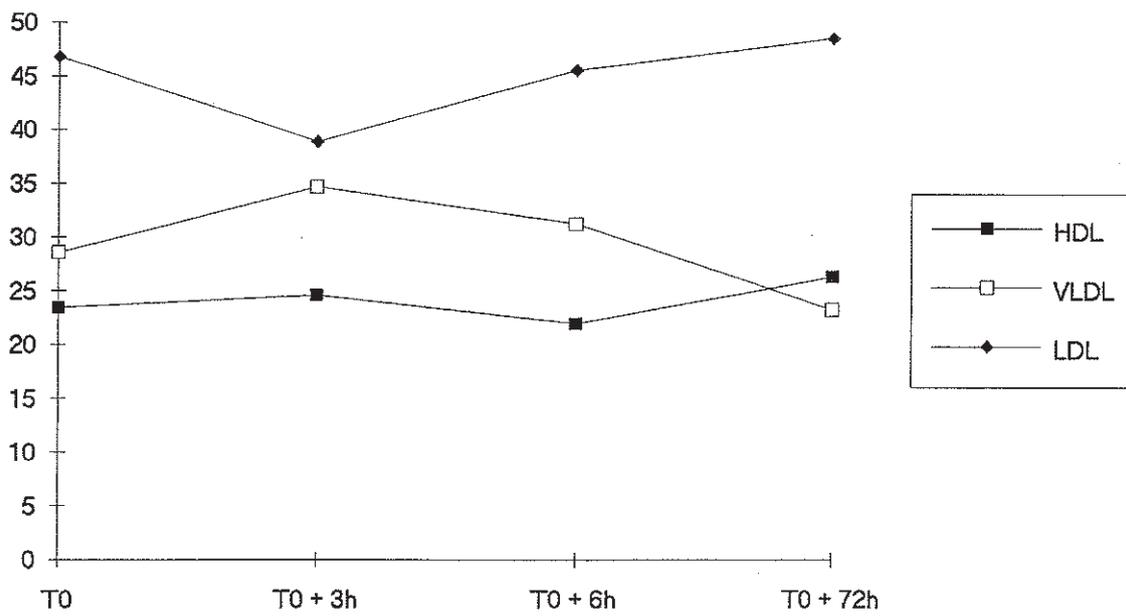


Figure 11: Evolution des lipoprotéines au cours du protocole.

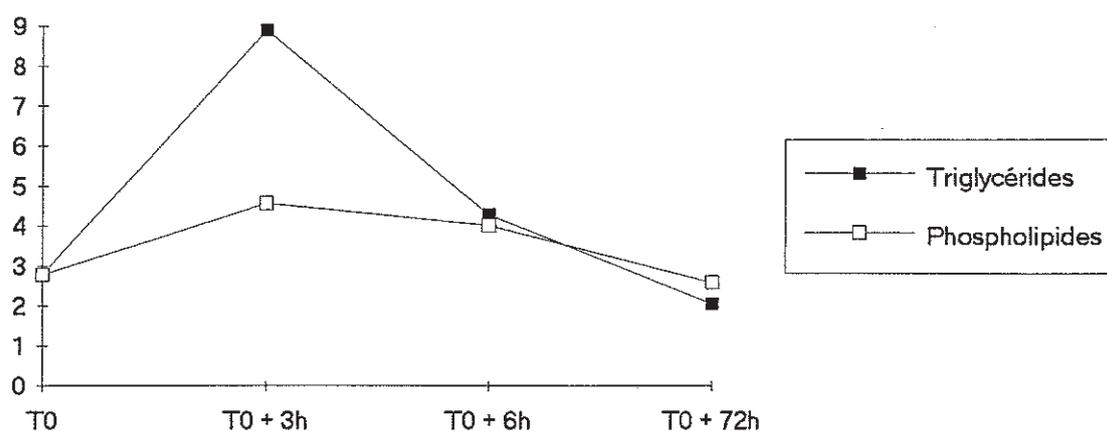


Figure 12: Evolution des triglycérides et phospholipides au cours du protocole.

22. Apolipoprotéines et lipoparticules

221. Effet de charge lipidique

- Apolipoprotéines

	T0	T0+3h	t	p(t)
Apo AI (g/l)	1,28 ± 0,23	1,25 ± 0,20	NF	NF
Apo B (g/l)	1,17 ± 0,35	1,57 ± 0,49	NF	NF
Apo AI/Apo B	1,18 ± 0,40	0,87 ± 0,27	NF	NF
Apo CII (mg/l)	56,87 ± 22,62	301 ± 83,82	7,28	< 0,001
Apo CIII (mg/l)	133,25 ± 58,64	326,85 ± 150,03	3,18	< 0,01
Apo CII/Apo CIII	0,45 ± 0,09	0,78 ± 0,08	6,6	< 0,001
Apo E (mg/l)	51,5 ± 11,62	182,33 ± 106,27	3,2	< 0,01

La population DNID présente, au départ, quelques anomalies des apolipoprotéines: un taux moyen d'apo AI à la limite inférieure de la normalité et des taux moyens d'apo CII et d'apo CIII augmentés par rapport à la normale.

La perfusion d'Ivélip ne modifie significativement que les taux d'apo CII, CIII et E, qui augmentent considérablement.

Les taux d'apo AI et d'apo B ne sont pas modifiés de façon significative; même si on note une tendance à l'augmentation de l'apo B et une stabilité de l'apo AI (le rapport diminuant) (figure 13).

- *Lipoparticules*

	T0	T0+3h
Lp(a) (g/l)	0,17 ± 0,27	0,13 ± 0,25
LPAI (g/l)	0,39 ± 0,04	0,52 ± 0,13
LPAI:AII (g/l)	0,89 ± 0,22	0,73 ± 0,18
LPAI/LPAI:AII	0,47 ± 0,11	0,78 ± 0,34
Apo AII (g/l)	0,26 ± 0,06	0,27 ± 0,04
LPCIII totales (mg/l)	36,12 ± 12,94	51,75 ± 19,34
LPCIII non B (mg/l)	27,37 ± 9,82	38 ± 17,92
LPB:CIII (mg/l)	8,75 ± 5,09	13,75 ± 7,28
LPE totales (mg/l)	66,37 ± 22,30	75,12 ± 20,63
LPE non B (mg/l)	25,75 ± 9,39	25,5 ± 13,79
LPE:B (mg/l)	40,62 ± 18,20	49,62 ± 12,19

Le résultat de l'apo AII est donné en même temps que ceux des LP AI:AII et LP AI, car il a été dosé pour aider à expliquer les variations de ces lipoparticules.

Il n'existe aucune différence significative entre les moyennes des lipoparticules et de l'apo AII au cours du protocole. Il n'était donc pas intéressant de les comparer 2 à 2 à l'aide du test de Student.

L'évolution montre cependant une légère tendance à l'augmentation de la LP AI, compensée par une légère diminution de la LP AI:AII (avec augmentation logique du rapport). En fait, les moyennes à T0 et T0+3h ne sont pas représentatives des valeurs individuelles dont l'évolution montre une grande variabilité (figure 15).

L'apo AII reste constante et cela correspond à l'évolution individuelle.

Toutes les autres lipoparticules (sauf les LPE non B) montrent une tendance moyenne à l'augmentation (figures 16 et 17). De façon individuelle, cela est assez bien retrouvé pour les lipoparticules contenant l'apo CIII; par contre les LPE et LPB:E n'augmentent que dans 4 cas sur 8.

222. Entre T0+3h et T0+6h*- Apolipoprotéines*

	T0+3h	T0+6h	t	p(t)
Apo AI (g/l)	1,25 ± 0,20	1,14 ± 0,32	NF	NF
Apo B (g/l)	1,57 ± 0,49	1,32 ± 0,44	NF	NF
Apo AI/Apo B	0,87 ± 0,27	0,94 ± 0,41	NF	NF
Apo CII (mg/l)	301 ± 83,82	55,71 ± 21,89	6,85	< 0,001
Apo CIII (mg/l)	326,85 ± 150,03	139,28 ± 51,26	2,93	< 0,02
Apo CII/Apo CIII	0,78 ± 0,08	0,40 ± 0,08	7,89	< 0,001
Apo E (mg/l)	182,33 ± 106,27	58,71 ± 18,19	2,78	< 0,02

Seules les apo CII, CIII et E montrent une diminution significative avec retour aux valeurs de départ (T0) (figure 14). Les apo AI et B montrent une tendance lente de retour vers les valeurs de départ (figure 13).

- Lipoparticules

	T0+3h	T0+6h
Lp(a) (g/l)	0,13 ± 0,25	0,13 ± 0,25
LPAI (g/l)	0,52 ± 0,13	0,41 ± 0,06
LPAI:AII (g/l)	0,73 ± 0,18	0,73 ± 0,31
LPAI/LPAI:AII	0,78 ± 0,34	1,12 ± 1,50
Apo AII (g/l)	0,27 ± 0,04	0,26 ± 0,07
LPCIII totales (mg/l)	51,75 ± 19,34	36,86 ± 16,92
LPCIII non B (mg/l)	38 ± 17,92	28 ± 12,35
LPB:CIII (mg/l)	13,75 ± 7,28	8,86 ± 8,67
LPE totales (mg/l)	75,12 ± 20,63	77 ± 41,19
LPE non B (mg/l)	25,5 ± 13,79	27,71 ± 17,24
LPE:B (mg/l)	49,62 ± 12,19	44,71 ± 29,19

Les lipoparticules contenant les apo AI et AII montrent aussi une légère tendance de retour aux valeurs de départ. Cette évolution est par contre bien vérifiée pour toutes les lipoparticules contenant l'apo CIII.

Les LP E ne contenant pas l'apo B augmenteraient légèrement, alors que les LP B:E ont tendance à diminuer (figures 15, 16, 17).

223. Effet normoglycémique

- Apolipoprotéines

	T0	T0+72h	t	p(t)
Apo AI (g/l)	1,28 ± 0,23	1,18 ± 0,20	NF	NF
Apo B (g/l)	1,17 ± 0,35	1,04 ± 0,40	NF	NF
Apo AI/Apo B	1,18 ± 0,40	1,29 ± 0,51	NF	NF
Apo CII (mg/l)	56,87 ± 22,62	52,71 ± 23,58	0,32	NS
Apo CIII (mg/l)	133,25 ± 58,64	103,28 ± 37,37	1,08	NS
Apo CII/Apo CIII	0,45 ± 0,09	0,51 ± 0,10	1,2	NS
Apo E (mg/l)	51,5 ± 11,62	45,57 ± 10,67	0,95	NS

Il n'existe aucune différence significative: c'est le retour aux valeurs de départ. Le taux d'apo CIII se trouve désormais dans la fourchette de normalité; par contre, l'apo CII montre un taux toujours à la limite supérieure et l'apo AI, un taux encore plus bas.

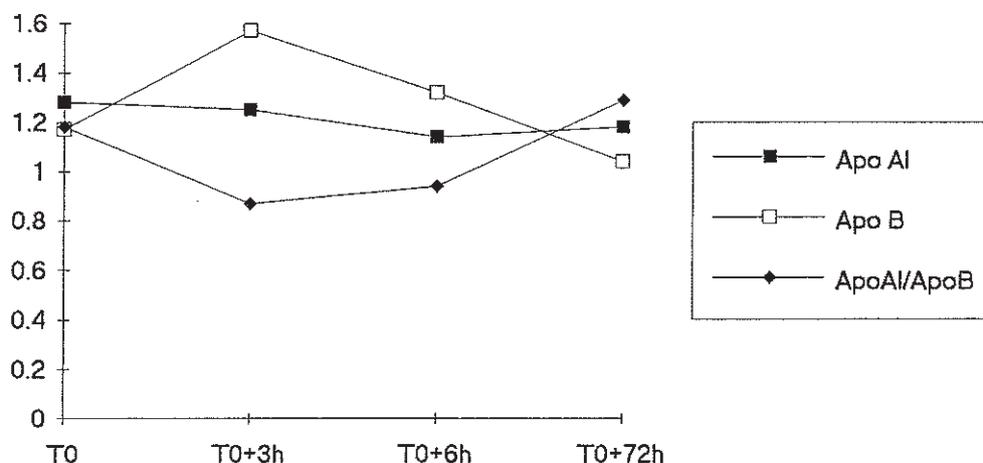


Figure 13: Evolution des apo AI et B au cours du protocole.

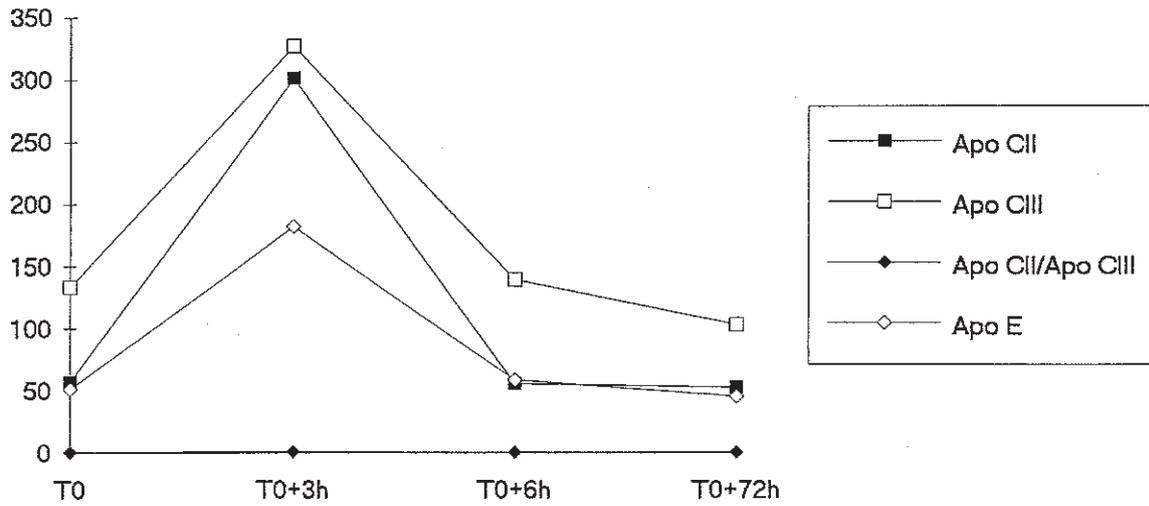


Figure 14: Evolution des apo CII, CIII et E au cours du protocole.

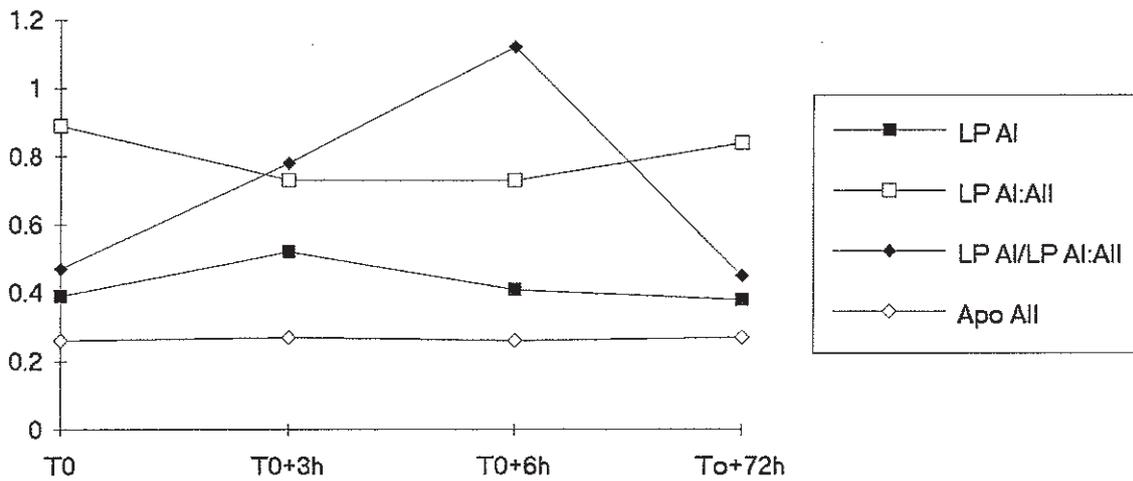


Figure 15: Evolution des LP AI, LP AI:AII et apolipoprotéine AII.

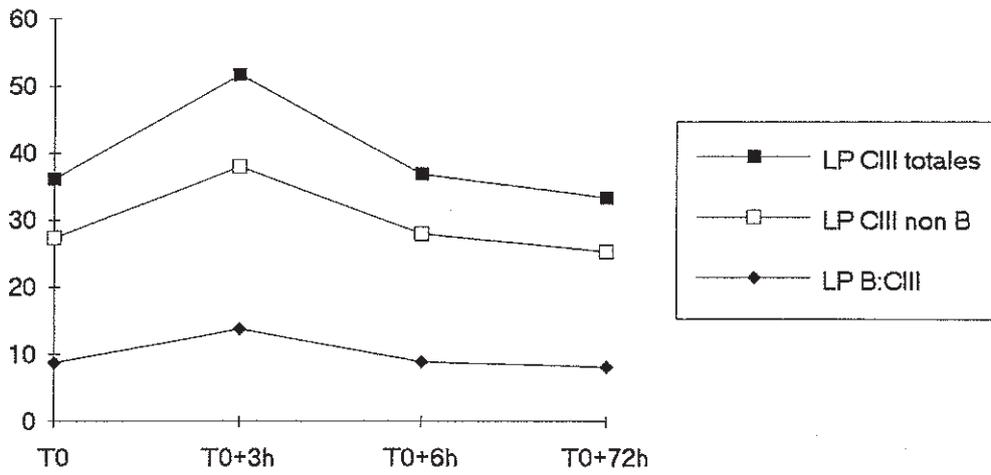


Figure 16: Evolution des LP CIII au cours du protocole.

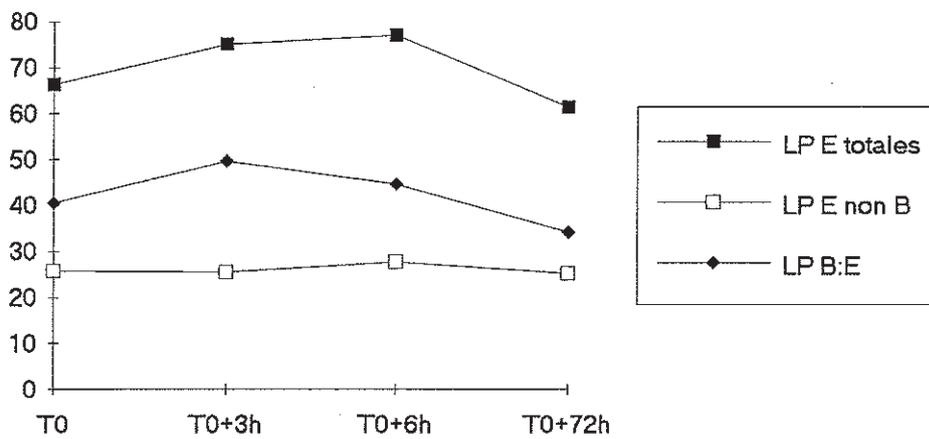


Figure 17: Evolution des LP E au cours du protocole.

- Lipoparticules

	T0	T0+72h
Lp(a) (g/l)	0,17 ± 0,27	0,09 ± 0,14
LPAI (g/l)	0,39 ± 0,04	0,38 ± 0,07
LPAI:AII (g/l)	0,89 ± 0,22	0,84 ± 0,14
LPAI/LPAI:AII	0,47 ± 0,11	0,45 ± 0,08
Apo AII (g/l)	0,26 ± 0,06	0,27 ± 0,1
LPCIII totales (mg/l)	36,12 ± 12,94	33,37 ± 15,10
LPCIII non B (mg/l)	27,37 ± 9,82	25,25 ± 10,81
LPB:CIII (mg/l)	8,75 ± 5,09	8,12 ± 5,72
LPE totales (mg/l)	66,37 ± 22,30	61,5 ± 20,78
LPE non B (mg/l)	25,75 ± 9,39	25,37 ± 11,10
LPE:B (mg/l)	40,62 ± 18,20	34,25 ± 14,51

Nous constatons un retour aux valeurs de départ. La LP E:B, qui présentait un taux un peu élevé au départ, retrouve une valeur plus proche des valeurs normales (figures 15, 16, 17).

23. Stress oxydatif

231. Evolution dans le protocole2311. Effet de charge lipidique

La pl GPX n'apparaît pas influencée par la perfusion lipidique. Pourtant, l'ETA montre une augmentation significative, durant la même période (figures 18 et 19).

	T0	T0+3h	t	p(t)
Etat total antioxydant (mmol/l)	1,47 ± 0,15	1,72 ± 0,16	3,12	< 0,01
plGPX (mg/ml)	5,78 ± 2,01	5,87 ± 1,82	NF	NF

2312. Entre T0+3h et T0+6h

La pl GPX n'est pas non plus influencée par l'arrêt de la perfusion lipidique. Celui-ci influence à nouveau et de façon significative l'ETA, qui revient presque aux valeurs de départ.

	T0+3h	T0+6h	t	p(t)
Etat total antioxydant (mmol/l)	1,72 ± 0,16	1,5 ± 0,16	2,63	< 0,05
plGPX (mg/ml)	5,87 ± 1,82	5,89 ± 1,82	NF	NF

2313. Effet normoglycémique

Il n'existe pas de différence significative. C'est le retour aux valeurs de départ pour l'ETA et la stabilité pour la pl GPX.

	T0	T0+72h	t	p(t)
Etat total antioxydant (mmol/l)	1,47 ± 0,15	1,44 ± 0,15	0,43	NS
plGPX (mg/ml)	5,78 ± 2,01	5,50 ± 1,56	NF	NF

232. Evolution par rapport aux témoins

Il nous a paru intéressant de comparer les valeurs obtenues aux différents temps du protocole, pour le stress oxydatif, aux résultats des témoins qui nous servent de référence ainsi que de comparer les valeurs du stress oxydatif chez les sujets avec ou sans complication.

Les moyennes de chaque paramètres et pour chaque population ont été comparées grâce à l'analyse de la variance.

Les tableaux de la page suivante donnent les résultats de ces comparaisons.

Comparaison du stress oxydatif au cours du protocole par rapport aux résultats des témoins

	Nombre	pl GPX (mg/ml)	ETA (mmol/l)
(1) Témoins	15	8,39 ± 3,43	1,38 ± 0,24
(2) DNID à T0	8	5,78 ± 2,01	1,47 ± 0,15
(3) DNID sans complication	4	6,66 ± 2,31	1,47 ± 0,17
(4) DNID avec complication	4	4,91 ± 1,43	1,47 ± 0,15

	Nombre	pl GPX (mg/ml)	ETA (mmol/l)
(1) Témoins	15	8,39 ± 3,43	1,38 ± 0,24
(2) DNID à T0+3h	8	5,87 ± 1,82	1,72 ± 0,16
(3) DNID sans complication	4	6,27 ± 2,25	1,7 ± 0,15
(4) DNID avec complication	4	5,47 ± 1,49	1,74 ± 0,2

	Nombre	pl GPX (mg/ml)	ETA (mmol/l)
(1) Témoins	15	8,39 ± 3,43	1,38 ± 0,24
(2) DNID à T0+6h	8	5,89 ± 1,82	1,5 ± 0,16
(3) DNID sans complication	4	6,55 ± 2,01	1,6 ± 0,18
(4) DNID avec complication	4	5,40 ± 1,78	1,42 ± 0,09

	Nombre	pl GPX (mg/ml)	ETA (mmol/l)
(1) Témoins	15	8,39 ± 3,43	1,38 ± 0,24
(2) DNID à T0+72h	8	5,5 ± 1,56	1,44 ± 0,15
(3) DNID sans complication	4	5,74 ± 1,95	1,55 ± 0,1
(4) DNID avec complication	4	5,27 ± 1,3	1,32 ± 0,07

En fait, seul l'état total antioxydant à T0+3h, montre une différence significative ($p < 0,001$) entre les 4 populations étudiées (témoins, DNID dans leur globalité, avec ou sans complication). Le test de Student permet de mettre en évidence une différence significative de l'ETA entre la population témoin et:

- les sujets DNID à T0+3h ($p < 0,01$)
- les sujets DNID sans complication à T0+3h ($p < 0,02$)
- les sujets DNID avec complication à T0+3h ($p < 0,01$)

Par contre, il n'existe pas de différence significative entre les 2 populations de DNID, avec ou sans complication.

Globalement, les sujets DNID ont des valeurs d'ETA supérieures aux valeurs trouvées chez les témoins, alors que les valeurs de la pl GPX apparaissent abaissées par rapport aux témoins. (figures 18 et 19)

233. Stress oxydatif et équilibre glycémique

Dans notre étude, aucune corrélation n'a été objectivée entre:

- l'état total antioxydant et la glycémie à jeun à T0 ($r = 0,48$, résultat NS)
- la pl GPX et la glycémie à jeun à T0 ($r = -0,2$, résultat NS)
- l'état total antioxydant à T0 et l'hémoglobine A1c ($r = 0,07$, résultat NS)
- la pl GPX à T0 et l'hémoglobine A1c ($r = 0,24$, résultat NS)

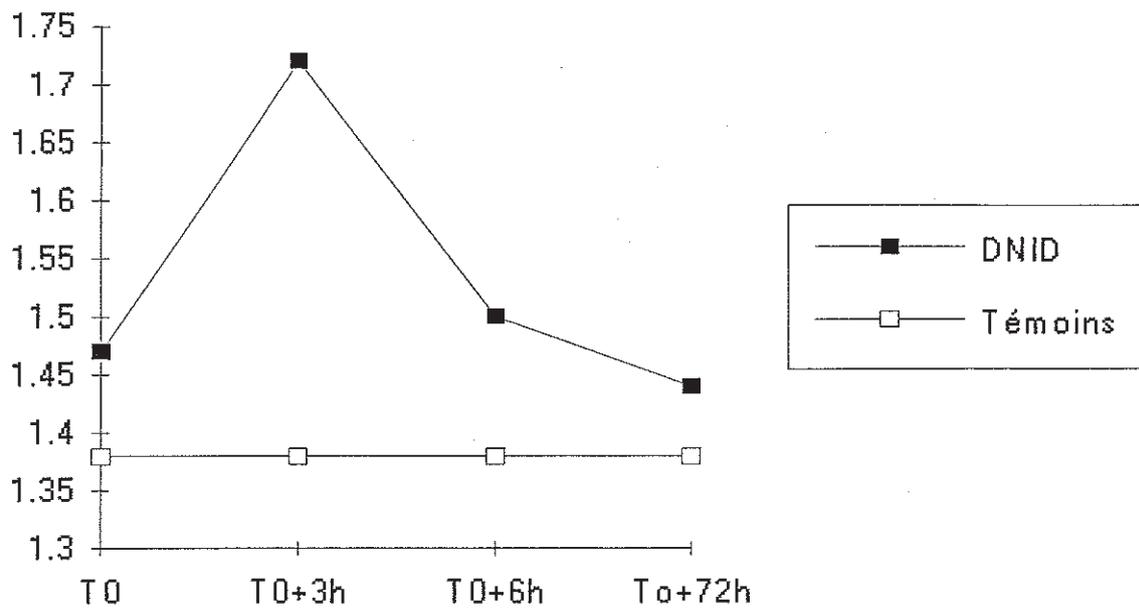


Figure 18: Evolution de l'état total antioxydant des sujets DNID.

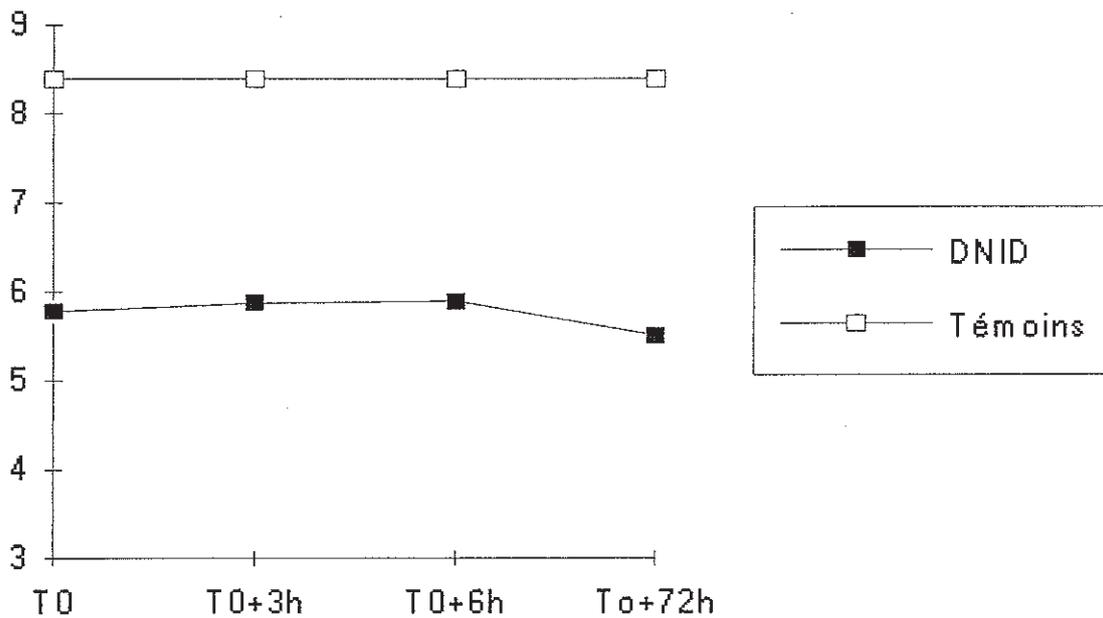


Figure 19: Evolution de la glutathion peroxydase plasmatique chez les sujets DNID.

D. DISCUSSION

1. CONCERNANT LES SUJETS TEMOINS

11. Caractères démographiques et lipidiques

Les sujets témoins ont été choisis parmi des volontaires sains, mais le lieu de leur recrutement (hôpital) n'a pas permis une homogénéité parfaite avec le groupe patient étudié, notamment en ce qui concerne l'âge.

La population témoin montre effectivement une répartition homogène et régulière de 29 à 50 ans, à laquelle s'ajoute un sujet de 58 ans, alors que la population DNID, partagée en 2 tranches d'âge (41-50 et 61-64) est significativement plus âgée. Même s'il a été évoqué que les moyens de défense contre les radicaux libres s'affaiblissent avec l'âge et sont responsables du vieillissement (30), nous considérons dans notre étude que la différence d'âge n'a pas d'influence sur le stress oxydatif.

Concernant les paramètres lipidiques, la population témoin est normolipémique et fait office de "référence" pour l'analyse des sujets DNID.

12. Stress oxydatif

Notre population témoin montre une valeur moyenne de l'ETA équivalente à celle retrouvée habituellement (60). Si certaines valeurs individuelles apparaissent anormalement hautes ou basses, il semble probable que ces variations soient liées à la technique (manuelle) de dosage elle-même en raison de la difficulté de contrôler parfaitement ses conditions de réalisation. A moins que ces variations ne soient le fait de variations physiologiques individuelles.

Aucune étude, concernant la pl GPX chez l'homme, ne semble avoir encore été publiée. Le laboratoire Bioxytech qui commercialise le kit d'évaluation laisse supposer que les valeurs normales s'échelonnent de 4 à 8 $\mu\text{g/ml}$. Dans ces conditions, notre population témoin montre une valeur moyenne normale mais à la limite supérieure. En observant la répartition des différentes valeurs, nous remarquons que cette moyenne -un peu haute- est le fait de 5 valeurs, quatre s'échelonnant de 9,57 à 11,7 $\mu\text{g/ml}$, une atteignant 17,7. Là encore, il est probable que ces variations soient liées à des différences physiologiques individuelles.

2. CONCERNANT LES SUJETS DNID

21. Sur les paramètres lipidiques classiques

211. Bilan de base

Nous remarquons que la population DNID présente, à T0 -c'est-à-dire avant l'expérimentation- des anomalies du bilan lipidique:

- le taux de triglycérides est anormalement élevé,
- le lipoprotéinogramme montre une répartition anormale des lipoprotéines, avec diminution des HDL au profit des VLDL,
- le C-HDL apparait également anormalement diminué,
- le taux d'AGL est supérieur à la normale.

Ces anomalies sont habituellement décrites chez les sujets DNID (13) et ont été détaillées dans le chapitre IIB1. Elles sont secondaires à l'insulino-résistance.

212. Effet de charge lipidique

La perfusion d'Ivélip apporte des acides gras principalement sous forme de triglycérides et un peu sous forme de phospholipides; il est donc logique d'observer une augmentation significative des taux de triglycérides et de phospholipides, sous l'influence de la perfusion.

Des résultats analogues ont été observés chez des patients de réanimation (65): cette étude ne constate pas par ailleurs de modification du cholestérol total ni du cholestérol-HDL. Dans notre travail, nous remarquons une légère tendance globale à l'augmentation du cholestérol total, sans modification du HDL-C; mais cette évolution homogène est sans doute un hasard, d'autant que celle du cholestérol total après charge lipidique orale est habituellement extrêmement variable (41).

De même, le lipoprotéinogramme ne montre pas d'évolution homogène. Sous l'effet de la perfusion d'Ivélip, les VLDL (forme de transport des triglycérides) sont augmentées dans 5 cas sur 8 avec diminution compensatrice des LDL. Dans les 3 cas restants, l'augmentation des VLDL survient à T0+6h et ce sont soit les LDL, soit les HDL, soit les deux qui diminuent en parallèle. Il est vrai que le raisonnement est basé sur des pourcentages de lipoprotéines à partir du lipoprotéinogramme et non sur des valeurs absolues, ce qui aurait été plus juste. Par ailleurs, les lipoprotéinogrammes à T0 sont hétérogènes: trois montrent un profil normal alors que les cinq autres présentent différentes anomalies. Ces différences de départ pourraient expliquer une partie de l'hétérogénéité dans l'évolution du lipoprotéinogramme.

La glycémie a diminué de façon significative entre le début et la fin de la perfusion d'Ivélip alors que le taux d'AGL a significativement augmenté dans le même temps. En fait cette augmentation est modérée par rapport à celle obtenue chez d'autres diabétiques dans des conditions analogues (62), chez lesquels la glycémie reste stable pendant la perfusion lipidique.

D'un point de vue métabolique, les sujets diabétiques étudiés dans notre travail sont en lipogénèse et stockent les lipides apportés, tout en épuisant les réserves glucidiques; alors qu'ils devraient au contraire utiliser les acides gras perfusés pour fournir l'énergie nécessaire et préserver les réserves glucidiques compte tenu de leur état postabsorptif.

Chez les sujets normaux, l'augmentation des AGL après une perfusion lipidique est également variable et serait corrélée positivement avec l'activité de la lipoprotéine lipase (52).

Dans ces conditions, notre population diabétique présente certainement une activité normale de la LPL permettant une assimilation tissulaire des AGL au taux de production enzymatique; alors qu'une activité augmentée de la LPL aurait été à l'origine d'une accumulation d'AGL. Il aurait cependant été intéressant de mesurer cette activité.

213. Entre T0+3h et T0+6h.

Il est un peu tôt après l'arrêt de la perfusion pour constater des variations intéressantes: en effet, d'après le laboratoire CLINTEC, qui commercialise l'émulsion Ivélip, la clarification du sérum peut apparaître jusque 6 heures après la perfusion. Par ailleurs, chez des patients en réanimation, la normalisation des taux de triglycérides et de phospholipides est apparue à la 8^{ème} heure après l'arrêt de la perfusion (65).

Cependant, nous remarquons que le retour à la normale du taux de triglycérides se fait plus rapidement que pour les phospholipides. Il est vrai que l'insuline active la lipoprotéine lipase du tissu adipeux (63), ce qui peut favoriser le catabolisme des triglycérides, même si c'est le tissu musculaire (dont la LPL est insensible à l'insuline) qui est le site le plus important d'hydrolyse des triglycérides (66). Le catabolisme des phospholipides fait appel par contre à la lipase hépatique (54).

De façon globale, le lipoprotéinogramme évoque des remaniements importants avec diminution des VLDL et augmentation des LDL: en effet, l'hydrolyse des triglycérides des VLDL transforme celles-ci en IDL puis en LDL. L'évolution individuelle rappelle que cette hydrolyse s'effectue plus ou moins rapidement.

D'ailleurs, une augmentation prolongée des chylomicrons plasmatiques a été observée après une charge lipidique orale chez des sujets DNID hypertriglycéridémiques (41).

Notre travail ne permet pas la même observation car l'évolution est hétérogène parmi les sujets hypertriglycéridémiques et il manque des sujets sains témoins pour connaître l'évolution normale.

214. Effet normoglycémique

Même s'il n'existe pas de différence significative du bilan lipidique entre T0 et T0+72h et si on retrouve quasiment les valeurs de départ, il semble que la perfusion continue d'insuline entraîne un effet bénéfique lorsqu'il existe des anomalies à T0. En effet, nous remarquons une légère baisse du taux de triglycérides (sauf pour 2 patients) et la répartition des lipoprotéines évoque une évolution vers un profil normal avec plus de HDL et moins de VLDL. Cette tendance à l'amélioration du lipoprotéinogramme est retrouvée dans 5 cas sur 8. Il a été décrit qu'une insulinothérapie peut normaliser le taux de triglycérides (59, 66). Il semble que l'insuline exerce son effet normolipémiant par action au niveau des voies de synthèse des lipides plutôt que sur la cascade de délipidation des VLDL-LDL (66). Les résultats de notre étude font penser que le traitement par insuline n'a pas été d'assez longue durée pour permettre une normalisation du bilan lipidique et vont dans le sens du rôle - souvent évoqué (1) - de l'insulino-résistance dans les troubles lipidiques du sujet DNID.

22. Sur les apolipoprotéines et lipoparticules

221. Bilan de base

Les anomalies observées à T0 sont décrites chez les sujets DNID (13).

Des taux bas d'apo AI et d'apo AII vont de pair avec le taux bas de C-HDL observé. Le taux d'apo CIII est habituellement augmenté ainsi que le rapport apo CIII/apo CII (3, 8). Dans notre étude, l'augmentation parallèle des taux d'apo CII et CIII reste cohérente avec l'augmentation des VLDL.

Parmi les lipoparticules, la LPAI est à la limite inférieure de la normale en relation avec des taux bas d'apo AI et de C-HDL. Par ailleurs, seule la LPB:E est anormalement augmentée; cela a déjà été noté dans d'autres études (28).

Chez le sujet DNID, Alaupovic et coll. notent des modifications dans la composition en lipoparticules des VLDL qui sont enrichies en LP-B, LP-B:C et LP-B:C:E (3). L'augmentation de la LPB:E est donc liée à celle des VLDL. Cette lipoparticule étant la forme de captation hépatique des VLDL, son augmentation pourrait évoquer une adaptation de l'organisme pour un catabolisme normal des VLDL en nombre augmenté. Les LPB:CIII et apo CIII étant normales, les taux importants de triglycérides et VLDL observés ne peuvent être rapportés à une inhibition de la lipoprotéine lipase comme certains l'ont évoqué (8); cette

hypertriglycéridémie et hyperVLDLémie seraient plutôt en relation avec une hyperproduction hépatique (59).

222. L'effet de charge lipidique

Les taux d'apo AI et AII ne changent pas et correspondent au taux constant de C-HDL, confirmant des résultats déjà publiés (65).

La constatation d'une légère augmentation de la LPAI (évolution retrouvée chez 5 patients sur 8), compensée par une égale diminution des LPAI:AII, laisse entrevoir une répartition différente de l'apo AI entre les LPAI et LPAI:AII sous l'influence de la charge lipidique. Les LPAI:AII sont appauvries en apoAI. Parmi les HDL, les LPAI occupent alors une place prépondérante, dont le rôle, ici, reste à définir.

La légère augmentation de l'apo B (non significative dans notre étude mais retrouvée chez les 8 patients) et celle plus importante de l'apo E ont déjà été rapportées (65). Notre étude montre en plus une forte élévation des taux d'apo CII et CIII. On sait que les acides gras jouent un rôle de stimulation spécifique de la biosynthèse des apo B et C par le foie (54). Par ailleurs, il est primordial que les lipides exogènes (globules lipidiques d'Ivélip), perfusés en grand nombre, soient catabolisés: cela implique justement la fixation de ces apolipoprotéines, dont la synthèse est augmentée.

L'augmentation concomitante des VLDL, apo E, apo CII et apo CIII montre que la prise en charge des lipides exogènes s'effectue surtout sous forme de VLDL constituées de LPCIII porteuses ou non de l'apo B et en quantité moins importante de LPE représentées majoritairement par les LPB:E. Une partie de ces lipoparticules est probablement représentée par des LPB:E:CIII. En fait, les LPCIII pourraient être impliquées dans l'hydrolyse des triglycérides (surtout si elles contiennent aussi l'apo CII) alors que les LPB:E interviendraient dans l'épuration plasmatique de l'émulsion. D'ailleurs, celle-ci fait certainement intervenir plutôt les récepteurs apoB/E hépatiques que les récepteurs spécifiques des apoE (LRP), étant donné que le taux de LPE non B reste inchangé; à moins que les 2 types de récepteurs soient utilisés, mais alors, il serait plus logique d'observer une augmentation parallèle des LPE non B, que l'on n'a pas notée dans notre étude.

Il est important de rappeler que si l'apo B est nécessaire à la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides, elle fait partie intégrante d'une lipoparticule et n'est jamais échangée (17). Dans ces conditions il est normal que le taux d'apo B soit très peu augmenté. Par contre, les lipoprotéines contenant l'apo B -dont on observe une augmentation dans notre étude- sont des lipoprotéines endogènes qui se sont chargées de triglycérides exogènes. La présence non négligeable de LPCIII non B pourrait être le reflet d'une prise en charge des TG exogènes, étalée dans le temps et limitée par le taux d'apoB.

Nous remarquons, par ailleurs, que les taux d'apo E et CIII triplent comme le taux de triglycérides, alors que le taux d'apo CII est multiplié par un facteur 6. Cette dernière permettant justement l'activation de la lipoprotéine lipase, l'augmentation du rapport apoCII/apoCIII est en faveur d'une hydrolyse accrue des triglycérides.

L'évolution individuelle montre quelques curiosités, notamment des taux constants d'apo E avec élévation des taux de LP E ou le contraire au cours de la perfusion d'Ivélip (noté dans 4 cas sur 8). Il n'existe pas d'explication logique et il aurait été souhaitable de contrôler ses paramètres par un nouveau dosage.

223. Entre T0+3h et T0+6h

Les apoAI et AII montrent la même stabilité que précédemment. Trois heures après l'arrêt de la perfusion, les autres apolipoprotéines et lipoparticules ont quasiment retrouvé leurs valeurs de départ, sauf la LPE qui reste élevée et dont l'augmentation serait due à celle des LPB:E (6 cas sur 7) et semble être en rapport avec le phénomène de captation hépatique. Concernant les lipoparticules, il faut noter que leur retour à la normale est plus ou moins rapide selon les individus. Quant aux triglycérides et phospholipides, ils restent toujours à des taux très élevés, mais peut-être tels qu'ils puissent être répartis entre les différentes lipoprotéines sans nécessiter davantage d'apolipoprotéines.

224. Effet normoglycémique

Même si les valeurs observées sont très proches de celles à T0, nous constatons une légère amélioration. La baisse de l'apoCIII dans la fourchette de normalité pourrait être rapprochée de la baisse des triglycérides observée dans notre travail. En effet, d'autres études rapportent cette corrélation (13). De même, la "normalisation" de la LPB:E est sans doute en relation avec la baisse des VLDL.

Quant à la Lp(a), son évolution au cours du protocole n'apparaît pas très intéressante. Il est vrai que cette lipoparticule circule intacte dans le plasma, sans transformation ni échange d'apolipoprotéines (51). Elle ne pouvait donc pas jouer de rôle important dans notre étude. D'autre part, l'insuline ne semble pas avoir d'influence directe sur la Lp(a), puisque celle-ci ne montre pas de variations chez le diabétique de type I traité en continu par insuline (38).

23. Stress oxydatif

231. Bilan de base

La population DNID montre des valeurs d'ETA et de pl GPX comprises dans la fourchette de référence établie dans notre population témoin, ainsi que dans celle habituellement admise (60). Chez les DNID, le taux moyen d'ETA est plus élevé que celui de la population témoin et inversement, le taux moyen de pl GPX est plus bas, même s'il n'existe aucune différence significative entre les 2 populations.

Il est possible que le taux bas de pl GPX observé chez les DNID, soit en relation avec une augmentation du taux de lipoperoxydes plasmatiques décrite par certains auteurs (71), laquelle n'aurait pas d'influence sur le taux de GPX intra-érythrocytaire retrouvé, dans la même étude, normal mais supérieur à celui de témoins.

Il est cependant étonnant de ne pas retrouver de différence significative des paramètres du stress oxydatif entre les DNID et les témoins, comme cela est décrit dans la littérature (6, 18, 31, 36, 48). Le fait est que nos paramètres sont des marqueurs indirects de la LPX, alors que le MDA -habituellement dosé- est un marqueur direct, dont la neutralisation fait intervenir des acteurs cellulaires et plasmatiques. Il est probable que, pour une élévation donnée de MDA, la participation antioxydante plasmatique ne soit pas très importante, ce qui donnerait un sens à nos résultats.

De même, nous ne notons pas de différence significative de la pl GPX ni de l'ETA entre les sujets DNID avec ou sans complication. Pourtant, les sujets avec complication montrent des taux de pl GPX inférieurs à ceux des sujets sans complication, et ce à tous les temps du protocole; cela laisse supposer une consommation accrue de pl GPX et pourrait confirmer un rôle possible -déjà rapporté par d'autres auteurs (18, 31) - de la LPX dans la survenue des complications diabétiques.

232. Effet de charge lipidique

La surcharge lipidique est responsable d'une augmentation significative du taux d'ETA: ceci pourrait s'expliquer par le fait que les triglycérides de l'Ivélip sont apportés sous forme d'huile de soja purifiée riche en tocophérols (69). En effet, la mesure de l'ETA correspond à l'évaluation globale de l'activité des systèmes de protection extracellulaires, dont font partie le glutathion, la SOD plasmatique, la vitamine C, l' α -tocophérol et la pl GPX.

Dans ces conditions, il est logique de ne pas observer de modification du taux de pl GPX.

On s'attendait à ce que les lipoprotéines enrichies en triglycérides et surtout en AGPI soient plus susceptibles à l'oxydation, comme cela a été démontré pour les LDL (32). En fait, grâce aux tocophérols apportés, l'Ivélip protégerait le temps de la perfusion contre la lipoperoxydation qui pourrait être induite.

233. Entre T0+3h et T0+6h

Après la perfusion, dès que l'équilibre lipidique est quasiment retrouvé, le taux d'ETA revient à sa valeur de départ. Ce retour à la normale est vraisemblablement lié au catabolisme normal des tocophérols; il est cependant possible qu'une partie de ceux-ci ait participé à limiter le phénomène de lipoperoxydation induit par la perfusion de lipides.

234. Effet normoglycémique

Certains auteurs ont noté une normalisation du taux de MDA dans les 48 à 72 heures après la normalisation glycémique par insuline (6). Dans notre étude, l'insulinothérapie ne semble pas influencer l'ETA ni la pl GPX. Il est vrai que ce sont des marqueurs de protection contre la lipoperoxydation et non des marqueurs directs. Leur évolution sous insuline est sans doute différente.

Les études sont souvent contradictoires au sujet d'une possible corrélation entre stress oxydatif et équilibre glycémique. Dans notre travail, nous ne notons aucune corrélation avec l'équilibre glycémique à court ou moyen terme. Cela pourrait être lié à une trop grande hétérogénéité de notre population DNID, si on en juge par les écarts-type de l'âge, du BMI, de la glycémie à jeun et de l'HbA1c. En effet, les études décrivant une corrélation concernent des populations diabétiques très bien ciblées (6, 48); alors qu'une autre étude qui, comme nous, ne retrouve pas de corrélation, se rapporte justement à une population plutôt hétérogène sur le plan de l'âge et des paramètres glycémiques (31).

Il reste également possible qu'il n'existe aucune relation directe entre le stress oxydatif et l'équilibre glycémique, mais plutôt une relation indirecte par le biais de l'équilibre lipidique.

CONCLUSION

Devant l'augmentation modérée des AGL avec un taux plus ou moins important de triglycérides, la mesure de l'activité de la lipoprotéine lipase aurait pu être intéressante, puisque la lipolyse intra-vasculaire des triglycérides perfusés est variable selon les individus (52).

Notre travail aura permis de rendre compte indirectement d'une certaine protection contre la lipoperoxydation apportée par la perfusion d'Ivélip. Ce cadre d'étude apparaît malgré tout intéressant pour l'étude des lipoparticules et du stress oxydatif chez le diabétique de type 2 en choisissant d'autres marqueurs directs ou indirects de la lipoperoxydation. Par ailleurs, il faudrait travailler sur un nombre plus important de patients DNID plus homogènes et en présence de témoins.



V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABBOTT W.G.H., LILLIOJA S., YOUNG A.A., ZAWADZKI J.K., YKI-JÄRVINEN H., CHRISTIN L., HOWARD B.V.- Relationships between plasma lipoprotein concentrations and insulin action in an obese hyperinsulinemic population. **Diabetes**, 1987, **36**, pp 897-904.
2. ALAUPOVIC P.- The concepts, classification systems and nomenclatures of human plasma lipoproteins . *In*: Lewis L.A., Oppl J.J., **Lipoproteins: basic principles and concepts. CRC Handbook of Electrophoresis.** (CRC Press), 1980, pp 27-46.
3. ALAUPOVIC P., BARD J.M., TAVELLA M., SHAFER D.- Identification of apoB-containing lipoprotein families in NIDDM. **Diabetes**, 1992, **41**, (suppl 2), pp 18-25.
4. ALBERTI K.G.G.M.- Quelques problèmes posés par la définition et l'épidémiologie du diabète de type 2 dans le monde. **Diabète Métab**, 1994, **20**, pp 315-324.
5. ALLANNIC H., DELAMBRE C., LE GUERRIER A.M., POIRIER J.Y., PAILLARD F.- Dépistage et prévention de l'athérome du diabétique. Conduite à tenir. **Rev. Franç. Endocrinol. Clin.**, 1991, **32**, pp 383-395.
6. ALTOMARE E., VENDEMIALE G., CHICCO D., PROCACCI V., CIRELLI F.- Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. **Diabète Métab.**, 1992, **18**, pp 264-71.
7. ARAI K., MAGUCHI S., FUJII S., ISHIBASHI H., OIKAWA K., TANIGUCHI L.- Glycation and inactivation of human Cu,Zn-superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.**, 1987, **262**, pp 16969-16972.
8. BETTERIDGE D.J.- Diabetes, lipoprotein metabolism and atherosclerosis. **Br. Med. Bull.**, 1989, **45**, pp 285-311.
9. BITTOLO BON G., CAZZOLATO G., AVOGARO P.- Preparative isotachopheresis of human plasma high density lipoproteins HDL 2 and HDL 3. **J. Lipid Res.**, 1981, **22**, pp 998-1002.
10. BLECH D.M., BORDERS C.M.- Hydroperoxide anion, HO₂⁻, is an affinity reagent for the inactivation of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase: modification of one histidine per subunit. **Arch. Biochem. Biophys.**, 1983, **224**, pp 579-586.

11. BODEN G., JADALI F.- Effects of lipid on basal carbohydrate metabolism in normal men. **Diabetes**, 1991, **40**, pp 686-692.
12. BOWIE A., OWENS D., COLLINS P., JOHNSON A., TOMKIN G.H.- Glycosylated low density lipoprotein is more sensitive to oxidation: implications for the diabetic patient? **Atherosclerosis**, 1993, **102**, pp 63-67.
13. BROWN W.V.- Lipoprotein disorders in diabetes mellitus. **Med. Clin. North Am.**, 1994, **78**, pp 143-161.
14. CAPRON L.- Insuline et athérosclérose. **Sang, Thrombose, Vaisseaux**, 1989, **1**, pp 18-23.
15. CAPRON L.- Mécanismes de l'atteinte macrovasculaire du sujet diabétique. **Diabète Métab.**, 1994, **20**, pp 357-361.
16. CHARBONNEL B.- Compréhension et traitement du diabète non insulino-dépendant. **IMPACT Le praticien P.P.P.** Numéro spécial HOECHST, septembre 1987, pp 4-8.
17. CLAVEY V.- Structure des apolipoprotéines et leur rôle dans le métabolisme des lipoprotéines chez l'homme. **Méd. Nutr.**, 1990, **26**, pp 132-140.
18. COLLIER A., RUMLEY A., RUMLEY A.G., PATERSON J.R., LEACH J.P., LOWE G.D.O., SMALL M.- Free radical activity and hemostatic factors in NIDDM patients with and without microalbuminuria. **Diabetes**, 1992, **41**, pp 909-913.
19. COLLIER A., WILSON R., BRADLEY H., THOMSON J.A., SMALL M.- Free radical activity in type 2 diabetes. **Diabet Med**, 1990, **7**, pp 27-30.
20. CURTISS L.K., WITZTUM J.L.- Plasma apolipoproteins AI, AII, B, CI, E are glycosylated in hyperglycaemic diabetic subjects. **Diabetes**, 1985, **34**, pp 452-461.
21. DEBY C., PINCEMAIL J.- Toxicité de l'oxygène, radicaux libres et moyens de défense. **Presse Méd.**, 1986, **15**, pp 1468-1474.
22. DEJAGER S., COHEN R., BRUCKERT E.- Hétérogénéité des lipoprotéines de basse densité (LDL) et athérosclérose. **Ann. Biol. Clin.**, 1990, **48**, pp 154-160.

23. DROUIN P.- Les complications vasculaires du diabète. **IMPACT Le praticien P.P.P.** Numéro spécial HOECHST, 1987, pp 14-19.
24. DURANTEAU L., CHEDIN P., TIELMANS D. ASSAYAG M., AJZENBERG C., BEAUDEUX J. L., PEYNET J., LUBETZKI J., WARNET A., GUILLAUSSÉAU P.J.- Facteurs de risque cardiovasculaire et diabète non insulino-dépendant. **Diabète Métab.**, 1994, **20**: 23A.
25. DURIEZ P., FRUCHART J.C.- Dosage des lipoprotéines définies selon leur composition en apolipoprotéines en vue de la prédiction du risque cardiovasculaire. **Ann. Biol. Clin.**, 1994, **52**, pp 179-183.
26. EMERIT J., BONNEFONT D., GALLI A.- Rôle de la peroxydation lipidique dans la constitution de la plaque d'athérome. **Presse Méd.**, 1989, **18**, pp 832-836.
27. FARNIER M., VERGES B., GAMBERT P., VAILLANT-PIARD G., BIDAN Y., BRUN J.M.- High density lipoprotein subfraction 2 in type 2 (non insulin-dependant) diabetes mellitus. **Diabetologia**, 1986, **29**, pp 535A-536A.
28. FRUCHART J.C.- Insulin-resistance and lipoprotein abnormalities. **Diabète Métab.**, 1991, **17**, pp 244-448.
29. FUJIWARA Y., KONDO T., MURAKAMI K., KAWAKAMI Y.- Decrease of the inhibition of lipid peroxidation by glutathione-dependant system in erythrocytes of non-insulin dependant diabetics. **Klin. Wochenschr.**, 1989, **67**, pp 336-41.
30. FULBERT J.C., CALS M.J.- Les radicaux libres en biologie clinique: origine, rôle pathogène et moyens de défense. **Path. Biol.**, 1992, **40**, pp 66-77.
31. GALLOU G., RUELLAND A., LEGRAS B., MAUGENDRE D., ALLANNIC H., CLOAREC L.- Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. **Clin Chim Acta**, 1993, **214**, pp 227-34.
32. GALLOU G., RUELLAND A., CAMPION L., ALLANNIC H., LEGRAS B., CLOAREC L.- Susceptibilité des LDL à la peroxydation lipidique dans le diabète non insulino-dépendant avec ou sans macroangiopathie. **Ann. Biol. Clin.**, 1994, **52**, pp 695-699.

33. GIRARD J.- Insulinorésistance: quel rôle dans le diabète de type 2? **Diabète Métab.**, 1994, **20**, pp 330-336.
34. GUILLAUSSEAU P.J.- Le diabète non insulino-dépendant: nouvelles acquisitions. **Brochure de l'Institut Servier du diabète**, 1994, 48 p.
35. HUNT J.V., SMITH C.C.T., WOLFF S.P.- Autoxydative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. **Diabetes**, 1990, **39**, pp 1420-1424.
36. JENNINGS P.E., JONES A.F., FLORKOWSKI C.M., LUNEC J., BARNETT A.H.- Increased diene conjugates in diabetic subjects with microangiopathy. **Diabet. Med.**, 1987, **4**, pp 452-456.
37. KAWAMURA N., OOKAWARA T., SUZUKI K., KONISHI K., MINO M., TANIGUCHI N.- Increased glycated Cu,Zn-superoxide dismutase levels in erythrocytes of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 1992, **74**, pp 1352-1354.
38. KOSTNER G.M., KARADI L.- Lipoprotein alterations in diabetes mellitus. **Diabetologia**, 1988, **31**, pp 717-722.
39. LEE D., ALAUPOVIC P.- Studies of the composition and structure of plasma lipoproteins. Isolation, composition and immunochemical characterization of low density lipoprotein subfractions of human plasma. **Biochemistry**, 1970, **9**, pp 2244-2252.
40. LESOBRE B.- Les facteurs de risque cardiovasculaire dans le diabète de type 2. **Diabète Métab**, 1994, **20**, pp 351-356.
41. LEWIS G.F., O'MEARA N.M., SOLTYS P.A., BLACKMAN J.D., IVERIUS P.H., PUGH W.L., GETZ G.S., POLONSKY K.S.- Fasting hypertriglyceridemia in noninsulin-dependent diabetes mellitus is an important predictor of postprandial lipid and lipoprotein abnormalities. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 1991, **72**, pp 934-944.
42. LI H., TANG Z.H., XIA T.Q.- Relationship between free radicals and diabetic microangiopathy. **Chung-Hua Nei Ko Tsa Chih**, 1991, **30**, pp 402-404.

43. MATKOVICS B., VARGA S.I., SZABO L., WITAS H.- The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. **Horm. Metabol. Res.**, 1982, **14**, pp 77-79.
44. MAZZONE T., FOSTER D., CHAIT A.- In vivo stimulation of low density lipoprotein degradation by insulin. **Diabetes**, 1984, **33**, pp 333-338 .
45. MEYLAN M., HENNY C., TEMLER E., JEQUIER E., FELBER J.P.- Metabolic factors in the insulin resistance in human obesity. **Metabolism**, 1987, **36**, pp 256-261.
46. MEZDOUR H., PARRA H.J., AGUIE-AGUIE G., FRUCHART J.C.- La lipoprotéine (a): un marqueur additionnel de l'athérosclérose. **Ann. Biol. Clin.**, 1990, **48**, pp 139-153.
47. NIKKILA E.A.- High density lipoproteins in diabetes. **Diabetes**, 1981, **30** (suppl 2), pp 82-87.
48. NOBERASCO G., ODETTI P., BOERI B., MAIELLO M., ADEZATI L.- Malondialdehyde level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin. **Biomed Pharmacother**, 1991, **45**, pp 193-96.
49. NORMAN I., KRINSKY- Mechanism of action of biological antioxydants. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 1992, **200**, pp 248-254.
50. ODA A., BANNAI C., YAMAOKA T., KATORI T., MATSUSHIMA T., YAMASHITA K.- Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by in vitro glycosylation and in erythrocytes of diabetic patients. **Horm. Metab. Res.**, 1994, **26**, pp 1-4.
51. PARRA H.J.- Une lipoprotéine particulière: la Lp(a). **Méd. Nutr.**, 1990, **26**, pp 181-191.
52. PETERSON J., BIHAIN B. E., BENGTSSON-OLIVECRONA G., DECKELBAUM R. J., CARPENTIER Y.A., OLIVECRONA T.- Fatty acid control of lipoprotein lipase: a link between energy metabolism and lipid transport. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1990, **87**, pp 909-913.

53. PEYNET J., GUILLAUSSEAU P.J., LEGRAND A., ALTMAN J.J., FLOURIE F., CHANSON P., POUPON J., N'GUYEN M., WARNET A., LUBETZKI J., ROUSSELET F.- Serum LpAI lipoprotein particles in diabetic patients with and without renal lesions of different grades. **Diabète Métab.**, 1993, **19**, pp 355-360.
54. POLONOVSKI J.- Métabolisme des lipoprotéines plasmatiques. **Rev. Fr. Lab.**, 1990, **211**, pp 35-49.
55. PRE J.- La lipoperoxydation. **Path. Biol.**, 1991, **39**, pp 716-736.
56. PUCHOIS P., ALAUPOVIC P., FRUCHART J. C.- Mise au point sur les classifications des lipoprotéines plasmatiques. **Ann. Biol. Clin.**, 1985, **43**, pp 831-840.
57. RAJESWARI P., NATARAJAN R., NADLER J.L., KUMAR D., KALRA V.K.- Glucose induces lipid peroxidation and inactivation of membrane-associated ion-transport enzymes in human erythrocytes in vivo and in vitro. **J. Cell. Physiol.**, 1991, **149**, pp 100-109.
58. RANDLE P.J., HALES C.N., GARLAND P.B., NEWSHOLME E.A.- The glucose fatty acid cycle, its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, 1963, **1**, pp 785-789.
59. REAVEN G.M.- Abnormal lipoprotein metabolism in non-insulin-dependant diabetes mellitus : pathogenesis and treatment . **Am. J. Med.**, 1987, **83**, pp 31-40.
60. RICE-EVANS C., MILLER N.J.- Total antioxidant status in plasma and body fluids. **Methods Enzymol.**, 1994, **234**, pp 279-293.
61. RIGALLEAU V., GUILLOT C., DE TINGUY E., IRON A., DELERIS G., GIN H.- Effect of lipid infusion on postabsorptive glucose metabolism in non-insulin-dependant diabetic patients. **Metabolism**, 1994, **43**, pp 1300-1304.
62. RIGALLEAU V., DE TINGUY E., IRON A., AUBERTIN J., GIN H.- Effet d'une perfusion lipidique sur la glycémie postabsorptive chez le patient diabétique non insulinodépendant. **Cah. Nutr. Diét.**, (abstract), 1995, sous presse.
63. RIOU J.P., BEYLOT M.- L'insuline et ses effets physiologiques. **Cah. Méd.**, 1980, **6**, pp 135-146.

64. SELBY J.V., AUSTIN M.A., NEWMAN B., ZHANG D., QUESENBERRY C.P., MAYER E.J., KRAUSS R.M.- LDL subclass phenotypes and the insulin resistance syndrome in women. **Circulation**, 1993, **88**, pp 381-387.
65. SOULIER A., COHEN S., FROUCHT S., GIRAL P., BRUCKERT E., VIARS P.- Nutrition parentérale lipidique chez les patients de réanimation: quelle émulsion? **Ann. Fr. Anesth. Réanim.**, 1989, **8**, Suppl., R247.
66. TASKINEN M.R., PACKARD C.J., SHEPHERD J.- Effect of insulin therapy on metabolic fate of apolipoprotein B-containing lipoproteins in NIDDM. **Diabetes**, 1990, **39**, pp 1017-1027.
67. TAUS M., FERRETTI G., CURATOLA G., DOUSSET N., SOLERA M.L., VALDIGUIE P.- Lower susceptibility of low density lipoprotein to in vitro oxidation in diabetic patients. **Biochem. Int.**, 1992, **28**, pp 835-842.
68. THORNALLEY P.J.- Monosaccharide autoxidation in health and disease. **Environ. Health Perspect.**, 1985, **64**, pp 297-307.
69. UZZAN A., Les corps gras. *In* DUPIN H., CUQ J.L., MALEWIAK M.I., LEYNAUD-ROUAUD C., BERTHIER A.M.- Alimentation et Nutrition humaines. ESS, PARIS, 1992, pp 887-918.
70. VERGES B., BRUN JM., VAILLANT G., QUANTIN C., BRUNET-LECOMTE P., FARNIER M., GAMBERT P.- Influence of obesity and hypertriglyceridaemia on the low HDL2-cholesterol level and on its relationship with prevalence of atherosclerosis in type 2 diabetes. **Diabète Métab.**, 1992, **18**, pp 289-297.
71. WALTER R.M., URIU-HARE J.Y., OLIN K.L., OSTER M.H., ANAWALT B.D., CRITCHFIELD J.W., KEEN C.L.- Copper, zinc, manganese, and magnesium status and complications of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 1991, **14**, pp 1050-1056.
72. World Health Organization Study Group- Diabetes Mellitus. Technical Report series N°727, WHO Ed (Genève) 1985: pp 9-17.

TABLE DES MATIERES

I - INTRODUCTION	11
II - METABOLISME LIPIDIQUE ET DNID: REVUE DE LA LITTERATURE	13
A. GENERALITES	14
1. LIPOPROTEINES	14
11. Structure des lipoprotéines et remaniements	14
12. Classification et concept de particule lipoprotéique	17
121. Classification en fonction de critères physicochimiques	17
a) Electrophorèse de zone	17
b) Ultracentrifugation de flottation	18
c) Méthodes de précipitation sélective	18
d) Comparaison de ces différentes techniques	18
122. Classification en fonction de la composition en apolipoprotéines	20
13. Métabolisme des lipoprotéines: rappel	20
131. Apports lipidiques	20
a) Apports exogènes	20
b) Apports endogènes	22
132. Métabolisme des lipoprotéines intestinales	22
133. Métabolisme des VLDL et LDL	24
134. Métabolisme des HDL	25
2. PEROXYDATION LIPIDIQUE ou LIPOPEROXYDATION	26
21. La réaction radicalaire	26
211. Notion de radical libre	26
212. Principaux radicaux libres impliqués dans la lipoperoxydation	26
213. Processus en 3 phases	27
a) Initiation	27
b) Propagation	27
c) Terminaison	28
214. Conséquences de la réaction radicalaire	28
22. Systèmes de protection	29
221. Systèmes de protection intracellulaires	29
a) Enzymes cytosoliques	29
b) Antioxydants	30
222. Les systèmes de protection extracellulaires	31
23. Evaluation de la lipoperoxydation : marqueurs	31

III - NOTRE TRAVAIL : ETUDE DES PARAMETRES LIPIDIQUES ET DU SYSTEME DE DEFENSE ANTIOXYDANTS CHEZ LE DIABETIQUE DE TYPE 2 SOUMIS A UNE PERFUSION DE TRIGLYCERIDES SUIVIE D'UNE NORMALISATION DE SA GLYCEMIE PAR INSULINE	47
A. INTRODUCTION	48
B. MATERIEL ET METHODES	49
1. SUJETS ETUDIES	49
11. Sujets DNID	49
12. Sujets témoins	50
2. PROTOCOLE D'ETUDE	50
3. METHODES	51
31. Prélèvements sanguins	51
32. Méthodes de dosage	51
321. Bilan lipidique	51
a) Cholestérol total	51
b) Triglycérides	52
c) Phospholipides	52
d) Cholestérol HDL	53
e) Lipoprotéinogramme	53
f) Apolipoprotéines A1, CII, CIII et E	53
g) Lipoprotéine (a)	54
h) Lipoparticules LP A1, LP CIII et LP E	54
i) Apolipoprotéine AII	55
j) Acides gras non estérifiés	55
322. Glycémie	56
323. Stress oxydatif	56
a) Glutathion peroxydase plasmatique	56
b) Etat total antioxydant	57
4. ANALYSE STATISTIQUE	57
C. RESULTATS	58
1. SUJETS ETUDIES	58
11. Caractères démographiques	58
12. Paramètres lipidiques	59
13. Le stress oxydatif	60
2. SUJETS DNID	61
21. Paramètres lipidiques classiques	62
211. Effet de charge lipidique	62

212. Entre T0+3h et T0+6h	63
213. Effet normoglycémique	63
22. Apolipoprotéines et lipoparticules	65
221. Effet de charge lipidique	65
222. Entre T0+3h et T0+6h	67
223. Effet normoglycémique	68
23. Stress oxydatif	71
231. Evolution dans le protocole	71
a) Effet de charge lipidique	71
b).Entre T0+3h et T0+6h	72
c) Effet normoglycémique	72
232. Evolution par rapport aux témoins	72
233. Stress oxydatif et équilibre glycémique	74
D. DISCUSSION	76
1. CONCERNANT LES SUJETS TEMOINS	76
11. Caractères démographiques et lipidiques	76
12. Stress oxydatif	76
2. CONCERNANT LES SUJETS DNID	77
21. Sur les paramètres lipidiques classiques	77
211. Bilan de base	77
212. Effet de charge lipidique	77
213. Entre T0+3h et T0+6h	78
214. Effet normoglycémique	79
22. Sur les apolipoprotéines et lipoparticules	79
221. Bilan de base	79
222. Effet de charge lipidique	80
223. Entre T0+3h et T0+6h	81
224. Effet normoglycémique	81
23. Sur le stress oxydatif	82
231. Bilan de base	82
232. Effet de charge lipidique	82
233. Entre T0+3h et T0+6h	83
234. Effet normoglycémique	83
IV - CONCLUSION	84
V - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	87



RESUME

L'évaluation du système de défense antioxydants (SDAO) à travers les dosages de la glutathion peroxydase plasmatique et de l'état total antioxydant et celle des paramètres lipidiques (dont lipoparticules et apolipoprotéines) ont été faites chez 8 patients diabétiques de type 2: (1) à l'état de déséquilibre métabolique, (2) après une perfusion d'Ivélip (émulsion de triglycérides) susceptible d'augmenter la lipoperoxydation, (3) après normalisation de leur glycémie par insulinothérapie continue.

(1) Outre les anomalies lipidiques classiques, les sujets DNID n'ont pas montré de différence significative des paramètres du SDAO par rapport à un groupe de témoins sains.

(2) La perfusion d'Ivélip a induit une nette augmentation des taux d'apo CII, apo CIII, apo E ainsi que de l'état total antioxydant, sans modification significative des taux de lipoparticules et de la glutathion peroxydase plasmatique.

(3) Le traitement par insuline n'a modifié significativement aucun paramètre par rapport aux taux de base.

L'évolution des paramètres lipidiques serait en faveur d'une prise en charge des lipides perfusés sous forme de VLDL qui seraient des LP CIII:B, LP CIII non B et en moindre quantité des LP B:E. Les LP CIII pourraient intervenir dans l'hydrolyse des triglycérides et les LP B:E dans l'épuration plasmatique de l'émulsion.

L'élévation du niveau de l'état total antioxydant reflèterait en fait l'apport d'antioxydants par la perfusion lipidique.

La glycémie des sujets DNID a continué de diminuer sous perfusion lipidique traduisant un métabolisme de lipogénèse.

Le traitement par insuline semble avoir été trop court pour normaliser les paramètres lipidiques qui montrent cependant une tendance à l'amélioration.

MOTS-CLES

- Diabète non insulino-dépendant (DNID)
- Perfusion lipidique
- Paramètres lipidiques
- Lipoparticules
- Lipoperoxydation
- Glutathion peroxydase
- Etat total antioxydant

