

MAG/574.88-31/01

UNIVERSITE ABOU-BAKR BELKAID TLEMCCEN

FACULTE DES SCIENCES

MEMOIRE

PRESENTE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE

~~64/0A~~

Magister

EN

BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

par

Amal BRIKCI-NIGASSA née SAIDI

M82

Thème

**Evaluation de quelques paramètres
du statut antioxydant et profil lipidique
chez une population diabétique traitée à
l'insuline dans la région de Tlemcen**

Soutenu devant la commission d'examen :

Président :	Anouar KHELIL	Professeur
Promoteur :	Daoudi CHABANE-SARI	Professeur
Examineurs :	Hafida MERZOUK	Maître de conférences
	Mohammed-Seghir KENDOUCI-TANI	Maître-assistant
	Djamil KROUF	Maître-assistant

Remerciements

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à **Monsieur D. CHABANE-SARI**, Professeur au département de Biologie à la Faculté des Sciences de l'Université de Tlemcen, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de m'encadrer. Qu'il trouve ici tous mes sincères remerciements.

J'adresse mes vifs remerciements à **Monsieur D. KROUF** Maître assistant chargé de cours au département de Biologie à la Faculté des Sciences de l'Université d'Oran Es-Sénia, pour avoir accepté d'examiner ce travail, lui exprimant ainsi ma profonde gratitude pour toute l'aide indispensable qu'il m'a apportée tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier **Monsieur D. SAIDI** Professeur au département de Biologie à la Faculté des Sciences de l'Université d'Oran Es-Sénia, pour son aide précieuse et pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire. Qu'il trouve ici le témoignage de mon profond respect.

Je remercie **Monsieur A. KHELIL**, Professeur au département de Biologie à la Faculté des Sciences, université de Tlemcen, d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance. Qu'il accepte l'expression de mon entière reconnaissance.

Je remercie aussi **Docteur M.-S. KENDOUCI-TANI**, Maître-assistant au service de Médecine Interne au CHU de Tlemcen pour l'honneur qu'il me fait d'accepter d'examiner ce travail et pour m'avoir autorisé l'accès à son service. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je tiens à remercier également **Madame H. MERZOUK**, Maître de conférences au département de Biologie à la Faculté des Sciences de l'Université de Tlemcen, pour l'honneur qu'elle me fait d'accepter d'examiner ce travail. Qu'elle accepte l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent aussi à **Monsieur F. LAHFA**, chargé de cours au département de Biologie à la Faculté des Sciences de l'Université de Tlemcen, pour ses conseils et son aide précieuse. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude et de mon profond respect.

Mes remerciements s'adressent également à **Monsieur BOUDELMI**, Directeur du Centre Vétérinaire de Mansourah, pour avoir bien voulu accepter de me laisser travailler avec le matériel du centre vétérinaire.

Je remercie également tout le personnel travaillant au Centre des Diabétiques de Sidi-Chaker. Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mes vifs remerciements.

Que tous ceux qui m'ont aidée, concrètement, moralement, ou par leur simple présence à mener à bien ce mémoire soient gratifiés par Le Tout-Puissant. Ils se reconnaîtront.

Abstract

The interest in metabolic disturbances of plasma lipoproteins and in oxidative stress usually observed in patients with both type 1 and type 2 diabetes rely on the links between these disturbances and apparition of cardiovascular complications. Our study was based on the evaluation of lipid and lipoprotein disturbances and of some antioxidant status parameters in diabetics with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) and insulin-requiring diabetes mellitus (IRDM) in Tlemcen city (n=24, women/men) aged 28 to 57. All of patients and control healthy subjects were selected from several criteria (no disease, physiological state or drugs which can interfere with lipids and lipoproteins metabolisms)

These 2 groups of diabetics did not present any significant difference in the rate of HDL-C, triglycerides, Lp(a) and non-esterified free fatty acids compared with controls. However, the concentrations of CT are lowered in men with IDDM and women with IRDM, and LDL-C and apo B were found to be decreased in patients with IDDM and women with IRDM compared to controls.

The 2 groups of diabetics also presented an increase in Apo A-I, LCAT cofactor, compared to controls. HDL3 subfractions phospholipids, substrates of this enzyme, are increased in men with IRDM but remain normal for the rest of the diabetic population compared to controls. The LCAT activity determination revealed an increase for patients with IDDM of both genders.

The measure of serum vitamin C rates revealed an increase in patients with IDDM and women with IRDM. However, patients with IDDM presented a decreased catalase activity, suggesting the existence of an oxidative stress.

In conclusion, all of the diabetics do not present any unfavourable variation of cardiovascular diseases markers (HDL-C, triglycerides, LDL-C and Lp(a)), suggesting the absence of atherogenic profile. Moreover, these diabetics present very similar lipids and lipoproteins profiles, which presume that type of treatment, in this case insulin therapy, influence these profiles.

Keywords: insulin-dependent diabetes mellitus, insulin-requiring diabetes mellitus, lipoproteins, antioxidant, LCAT, catalase.

الخلاصة :

إن الإختلال الحاصل في أيض البروتينات الدهنية البلازمية والملاحظ عند المرضى بداء السكري من نوع 1 ، 2 يعتمد أساسا على العلاقات بينها وبين المضاعفات الجهاز الدوري يهدف هذا العمل إلى تقييم المضاعفات الدهنية والبروتينات الدهنية وبعض المقاييس المضادة للأكسدة عند المرضى بداء السكري والمعالجين بالأنسولين (DID) أو المعتمدين عليه كليا (DIN). بمنطقة تلمسان (n=24 نساء ورجالا) والذين تتراوح أعمارهم ما بين 28 إلى 57 سنة . إن كل المرضى مع الشواهد تم اختيارهم على عدة أسس منها أنهم لا يتعاطون أدوية ، لا توجد عندهم حالات مرضية ، ولا حالات أيضية يمكنها التداخل مع أيض المواد الدهنية .

إن المجموعتين موضع الدراسة لم يظهر أي اختلافات دالة على كميات الأحماض الثلاثية ، أو الأحماض الدهنية غير المأسترة بالمقارنة مع الشاهد ، في حين أن كميات CT تناقصت عند (DID) للرجال و (DIN) للنساء وأن LDC-C و ApoB تناقصت عند (DID) للجنسين و (DIN) للنساء مقارنة مع الشاهد.

بينت الدراسة كذلك أن المجموعتين من مرضى السكري ظهر بهما ارتفاعا في ApoA-1 وهو العامل المساعد للـ LCAT ، بالمقارنة مع الشاهد. إن الفوسفوليبيدات الجزأة من HDL₃ إرتفعت عند (DIN) للرجال و بقيت بحالتها الطبيعية عند النساء بالمقارنة مع الشاهد ، كما أن تحديد نشاط LCAT بين ارتفاعا عند (DID) مهما كان جنس المريض.

إن تقدير كميات فيتامين C تبين من خلاله ارتفاعا ملحوظا عند (DID) مع (DIN) للنساء ، في حين أن (DID) أوضحت نشاطا منخفضا للكاتالاز ، مما يعد شاهدا على احتمال خلل في الأكسدة.

نستخلص من ذلك كله أن أغلب المرضى لا يظهرون اختلالات نوعية للدلائل المرضية للجهاز الدوري ، زيادة على ذلك فإن هؤلاء المرضى أظهروا تقاربا في كميات الدهون والبروتينات الدهنية البلازمية ، مما ينتج عنه أن نوع الوصفات الطبية والتي منها المعالجة بالإنسولين أثرت بشكل ملحوظ على هذه المعطيات.

الكلمات المفتاحية :

السكري المعتمد على الإنسولين ، السكري المحتاج للأنسولين ، البروتينات الدهنية ، مضادات الأكسدة ، LCAT ، الكاتالاز.

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
MATERIEL & METHODES	5
1 POPULATION ETUDIEE.....	6
2 METHODES.....	7
2.1 PRELEVEMENTS SANGUINS	7
2.2 ANALYSE BIOCHIMIQUE	8
2.2.1 Dosage des paramètres sériques	8
2.2.2 Séparation des différentes fractions de lipoprotéines.....	9
2.2.3 Purification des différentes fractions de lipoprotéines	10
2.2.4 Analyse des différentes fractions lipoprotéiques	10
2.3 ANALYSE STATISTIQUE	10
RESULTATS & INTERPRETATION.....	13
1 DOSAGE DES PARAMETRES SERIQUES.....	14
1.1 TENEURS SERIQUES EN GLUCOSE, CREATININE ET UREE CHEZ LES POPULATIONS DIABETIQUES ET LES TEMOINS DE SEXE MASCULIN	14
1.2 TENEURS SERIQUES EN GLUCOSE, CREATININE ET UREE CHEZ LES POPULATIONS DIABETIQUES ET LES TEMOINS DE SEXE FEMININ.....	14
1.3 TENEURS SERIQUES EN CHOLESTEROL, TRIGLYCERIDES ET AGNE CHEZ LES HOMMES DIABETIQUES.....	15
1.4 TENEURS SERIQUES EN CHOLESTEROL, TRIGLYCERIDES ET AGNE CHEZ LES FEMMES DIABETIQUES	15
1.5 TENEURS SERIQUES EN CHOLESTEROL TOTAL DES DIFFERENTES FRACTIONS DE LIPOPROTEINES CHEZ LES HOMMES DIABETIQUES	18
1.6 TENEURS SERIQUES EN CHOLESTEROL TOTAL DES DIFFERENTES FRACTIONS DE LIPOPROTEINES CHEZ LES FEMMES DIABETIQUES.....	18
1.7 TENEURS SERIQUES EN TRIGLYCERIDES DES SOUS-FRACTIONS DES HDL CHEZ LES HOMMES DIABETIQUES.....	19
1.8 TENEURS SERIQUES EN TRIGLYCERIDES DES SOUS-FRACTIONS DES HDL CHEZ LES FEMMES DIABETIQUES.....	19
1.9 TENEURS SERIQUES EN APO A-I, APO B ₁₀₀ ET LP(A) CHEZ LES HOMMES DIABETIQUES.....	20
1.10 TENEURS SERIQUES EN APO A-I, APO B ₁₀₀ ET LP(A) CHEZ LES FEMMES DIABETIQUES	20

2	ETUDE DE L'ACTIVITE DE LA LCAT	23
2.1	TENEURS SERIQUES EN PHOSPHOLIPIDES DES HDL ET ACTIVITE DE LA LCAT CHEZ LES HOMMES DIABETIQUES.....	23
2.2	TENEURS SERIQUES EN PHOSPHOLIPIDES DES HDL ET ACTIVITE DE LA LCAT CHEZ LES FEMMES DIABETIQUES.....	23
3	ANALYSE DE QUELQUES PARAMETRES DU STATUT ANTIOXYDANT	26
3.1	TENEURS SERIQUES EN ASCORBATE ET ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE CHEZ LES HOMMES DIABETIQUES	26
3.2	TENEURS SERIQUES EN ASCORBATE ET ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE CHEZ LES FEMMES DIABETIQUES.....	26
	<u>DISCUSSION.....</u>	28
	<u>CONCLUSION</u>	36
	<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	39
	<u>ANNEXES</u>	53

Liste des abréviations

A.D.A.	American Diabetes Association
DID	Diabète insulino-dépendant
DIN	Diabète insulino-nécessitant
CL	Cholestérol libre
CE	Cholestérol estérifié
CT	Cholestérol total
TG	Triglycéride
PL	Phospholipide
apo	Apolipoprotéine
VLDL	Very low density lipoprotein
LDL	Low density lipoprotein
HDL	High density lipoprotein
AGNE	Acide gras non estérifié
LP	Lipoprotéine
LPL	Lipoprotéine lipase
PLTP	Phospholipid transfer protein
CETP	Cholesterol ester transfer protein
LCAT	Lécithine cholestérol acyltransférase
TGLH	Triglycéride lipase hépatique
CAT	Catalase
Gpx	Glutathion peroxydase
SOD	Superoxyde dismutase
IMC	Indice de masse corporelle
Hb	Hémoglobine

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Caractéristiques des hommes diabétiques et des témoins	7
<u>Tableau 2</u> : Caractéristiques des femmes diabétiques et des témoins	7
<u>Tableau 3</u> : Teneurs sériques moyennes en glucose, créatinine et urée chez les populations diabétiques et les témoins de sexe masculin	14
<u>Tableau 4</u> : Teneurs sériques moyennes en glucose, créatinine et urée chez les populations diabétiques et les témoins de sexe féminin	14
<u>Tableau 5</u> : Teneurs sériques moyennes en CT des différentes fractions de LP chez les populations diabétiques et les témoins de sexe masculin	18
<u>Tableau 6</u> : Teneurs sériques moyennes en CT des différentes fractions de LP chez les populations diabétiques et les témoins de sexe féminin	18
<u>Tableau 7</u> : Teneurs sériques moyennes en TG des sous fractions des HDL chez les populations diabétiques et les témoins de sexe masculin	19
<u>Tableau 8</u> : Teneurs sériques moyennes en TG des sous fractions des HDL chez les populations diabétiques et les témoins de sexe féminin	19

Le diabète sucré correspond à un ensemble de troubles métaboliques caractérisés par une hyperglycémie qui résulte d'un déficit de la sécrétion d'insuline et/ou d'une résistance à l'action de celle-ci [89,103].

Le diabète sucré se manifeste sous deux formes majeures : diabète de type 1 ou « insulino-dépendant » (DID) et diabète de type 2 ou « non insulino-dépendant » (DNID). Ensemble, ces deux types présentaient en 1992 une prévalence de 2,1 % dans la région d'Alger [13]. Au Maghreb, les études à grande échelle basées sur une analyse statistique précise sont rares [93]. Dans le Monde, l'incidence de cette pathologie est de 1 à 5 % [49] et le nombre de patients diabétiques augmente dans des proportions épidémiques [60,124].

Le diabète de type 1 survient le plus souvent chez le sujet jeune non obèse. Il est caractérisé par un déficit de la production d'insuline secondaire à une destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Lorsque l'hyperglycémie est cliniquement manifeste, l'atteinte touche déjà 80 % des cellules β [98]. Les individus atteints sont absolument dépendants de l'insuline exogène pour survivre. En absence d'insulinothérapie, l'évolution se fait inexorablement vers l'acidocétose [77]. Sa fréquence est faible : 3 % des diabètes à travers le monde [6].

Le diabète de type 2 survient plus tard dans la vie (après 40 ans généralement) et il est souvent associé à l'obésité (dans 80 % des cas). Il est beaucoup plus répandu : il représente plus de 80 % de l'ensemble des diabètes. L'hyperglycémie résulte de l'association d'une insulino-pénie relative (dysfonctionnement des cellules β) et d'une résistance à l'action de l'insuline avec une prédominance de l'insulinorésistance ou de l'insulino-pénie [116]. Au niveau du foie, cette résistance à l'insuline se traduit par une augmentation de la production hépatique de glucose par néoglucogenèse [89]. Le manque d'insuline n'est pas absolu chez les diabétiques de type 2. Par conséquent, l'insulinothérapie n'est pas indispensable à leur survie. Cette insulinothérapie devient nécessaire quand des troubles tels que la cétose apparaissent sous l'effet de facteurs déclenchants (stress, infections...) ou si le régime et les antidiabétiques oraux ne suffisent plus à réguler la glycémie [89]. Ces diabétiques sont alors dits « *insulino-nécessitants* » (DIN).

Le diabète se complique fréquemment de macroangiopathie qui constitue la principale cause de morbidité et de mortalité chez les diabétiques (type 1 et 2) [15,23,80,100,102]. La relation entre diabète et athérosclérose n'est pas complètement élucidée. Cependant, le défaut de l'action de l'insuline et l'hyperglycémie semblent jouer un rôle important dans le dévelop-

pement de cette complication en perturbant la production et le catabolisme des lipoprotéines plasmatiques [11,15,40,44]. Ces altérations conduisent à la dyslipidémie diabétique, caractérisée essentiellement par une élévation des triglycérides plasmatiques ainsi qu'une diminution des HDL [20,44]. Cette diminution est considérée par certains auteurs comme un facteur causal des maladies cardiovasculaires. Pour d'autres, la baisse du HDL-C n'est qu'un marqueur de l'accumulation de lipoprotéines riches en triglycérides, traduite par une hypertriglycéridémie, qui est responsable du développement de ces complications. Ces deux facteurs agissent certainement ensemble ; il est donc intéressant de prendre en compte les variations relatives des triglycérides et du HDL-C [101]. Les mécanismes physiopathologiques de la dyslipidémie diabétique sont différents selon le type du diabète (types 1 et 2). Toutefois, la défaillance de l'insuline est l'élément principal, commun aux deux groupes. En effet, cette hormone joue des rôles multiples, notamment celui de régulation de l'activité de nombreuses enzymes (lipoprotéine lipase, lipase hormonosensible, etc.) et de la production hépatique des apoprotéines. Celles-ci peuvent servir à leur tour de régulateurs d'enzymes ou de ligands aux récepteurs cellulaires pour moduler le catabolisme des lipoprotéines plasmatiques [44,117]. Ceci explique l'intérêt de l'insulinothérapie au cours du diabète non seulement pour réduire la glycémie mais aussi pour prévenir les complications qui peuvent aggraver cette maladie. Par ailleurs, les facteurs environnementaux (régime alimentaire, exercice physique, tabagisme, obésité...) et génétiques peuvent aussi influencer le profil lipidique et lipoprotéique chez les diabétiques [20,32].

En outre, plusieurs études menées chez les diabétiques de type 1 et 2 ont souligné également l'importance du stress oxydatif, qui est augmenté chez ces patients [118], dans la physiopathologie de la macroangiopathie [41,50,56]. En effet, au cours du diabète l'équilibre oxydant/antioxydant est modifié, en augmentant la production des radicaux libres et/ou en déprimant les défenses antioxydantes naturelles. Le système glucose/insuline influe là aussi profondément sur l'apparition du stress oxydatif [69,112]. Ainsi, l'effet protecteur des enzymes antioxydantes peut diminuer suite à leur glycation [106]. D'autre part, l'hyperglycémie peut réduire certains antioxydants naturels tels que la vitamine C (acide ascorbique) [73]. Celle-ci est considérée comme un antioxydant plasmatique majeur, de par ces effets bénéfiques, notamment son action synergique avec les tocophérols dans la protection des LDL contre l'oxydation [24,62,66,74]. De plus, les phénomènes d'oxydation et de glycation confèrent aux lipoprotéines des propriétés athérogènes [10,38,39,78].

L'accélération des maladies vasculaires chez les diabétiques semble être le résultat d'interactions complexes entre les désordres métaboliques tels que l'hyperglycémie, les anomalies du métabolisme lipidique et les troubles des mécanismes de défense antioxydante [94]. Ces désordres sont considérés comme des marqueurs de risque des complications liées au diabète.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à ces indicateurs chez une population de diabétiques de types 1 et 2. Par ailleurs, les diabétiques de type 2 sélectionnés se traitent exclusivement par insulinothérapie. Ce choix a été effectué afin de déterminer d'éventuelles interactions entre le type de traitement et les différents troubles du métabolisme lipidique et du statut antioxydant au cours du diabète. Ces patients sont suivis au Centre de Santé de Sidi-Chaker à Tlemcen ("Maison du Diabétique"). Une population témoin est utilisée comme référence. Ce travail s'est basé sur :

- la détermination du profil lipidique et lipoprotéique par le dosage des lipides plasmatiques et leur distribution au niveau des fractions lipoprotéiques,
- le dosage de l'activité de la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT),
- le dosage de certains paramètres du statut antioxydant.

1 Population étudiée

Ce travail a été réalisé chez des patients diabétiques insulino-dépendants et insulino-nécessitants de la région de Tlemcen, dans le but d'évaluer les troubles du métabolisme lipidique et de déterminer quelques paramètres du statut antioxydant.

La population étudiée a été choisie sur la base de critères bien précis. L'étude concerne 24 sujets d'âges compris entre 28 et 57 ans, ayant un diabète de plus de 5 ans d'évolution et qui se traitent à l'insuline. Ces patients sont répartis en quatre groupes en fonction du sexe et du type de diabète :

- 6 hommes DID
- 6 femmes DID
- 6 hommes DIN
- 6 femmes DIN

Le recrutement des patients s'est effectué au niveau de la Maison des Diabétiques (Centre de Santé de Sidi-Chaker) de Tlemcen, entre mars et juin 2002, où ont été mesurés :

- le poids et la taille pour le calcul de l'indice de masse corporelle (IMC) qui représente le rapport du poids corporel divisé par la taille au carré,
- la pression artérielle

Sont exclus de cette étude tous les sujets présentant des pathologies pouvant entraîner une dyslipidémie secondaire : insuffisance rénale chronique, syndrome néphrotique, hypothyroïdie, atteinte hépatique, obésité, hyperlipoprotéinémie iatrogène (œstroprogestatifs, anti-hypertenseurs). Le tabagisme, l'éthylisme ainsi que la grossesse et la ménopause font aussi partie de ces critères d'exclusion en raison de leur influence sur le métabolisme lipidique. Ont également été écartées les personnes ayant des antécédents d'hypercholestérolémie ou de maladies cardiovasculaires.

- Une population témoin saine (exempte de toutes pathologies) sert de référence.
- Tous les participants ont donné leur consentement par écrit. Une fiche a été remplie pour chacun d'eux (**Annexes 1 et 2**).

Tableau 1 : Caractéristiques des hommes diabétiques et des témoins

Type de diabète	Age (ans)	IMC (kg/m ²)	Durée du diabète (ans)	Glycémie (g/l)
Témoins N=20	37,5 ± 5,5	23,5 ± 1,4	–	0,8 ± 0,3
DID N=6	37,0 ± 3,4	23,1 ± 1,4	13,3 ± 2,4	1,5 ± 0,3
DIN N=6	51,7 ± 2,5	23,7 ± 1,0	13,0 ± 2,3	2,4 ± 0,3

Tableau 2 : Caractéristiques des femmes diabétiques et des témoins

Type de diabète	Age (ans)	IMC (kg/m ²)	Durée du diabète (ans)	Glycémie (g/l)
Témoins N=20	37,0 ± 5,3	23,6 ± 1,8	–	0,9 ± 0,2
DID N=6	44,3 ± 3,8	24,5 ± 1,8	13,5 ± 3,2	1,5 ± 0,5
DIN N=6	42,7 ± 2,9	25,6 ± 1,9	10,7 ± 2,1	1,4 ± 0,3

Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard

IMC : Index de Masse Corporelle (poids/taille²)

DIN : diabète insulino-nécessitant

DID : diabète insulino-dépendant

2 Méthodes

2.1 Prélèvements sanguins

Le prélèvement des échantillons de sang veineux est effectué à jeun chez chacun des participants (après un jeûne de 12 heures au minimum).

- 10 ml de sang sont prélevés chez ces sujets dans des tubes secs.
- Le sang est centrifugé à 3500 tours/min pendant 15 min à 5°C.
- 3 ml pour les fractions de lipoprotéines (LP) (conservateur : EDTA Na₂ (0,1%) + azide de sodium (0,02%) à raison de 10 µl/ml de sérum).
- La quantité restante de sérum est destinée aux dosages des différents paramètres au niveau sérique.

- Le culot contenant les globules rouges est lavé trois fois avec une solution physiologique froide (4°C). Les globules rouges sont hémolysés en ajoutant un volume égal d'eau distillée et sont congelés à -20°C.

2.2 Analyse biochimique

2.2.1 Dosage des paramètres sériques

Les dosages des paramètres sériques sont effectués par les méthodes des kits enzymatiques (**Annexe 3**).

2.2.1.1 Glucose (kit Prochima[®])

Le glucose sérique est déterminé par la méthode **enzymatique et colorimétrique** usuelle en présence de la glucose oxydase (GOD). Les teneurs en glucose sont exprimées en **grammes par litre**.

2.2.1.2 Créatinine par la méthode de Jaffé (kit Biocon[®])

Le dosage de la créatinine sérique sans déprotéinisation est un dosage **cinétique colorimétrique photométrique**. Les teneurs en créatinine sont exprimées en **micromoles par litre**.

2.2.1.3 Urée par la méthode de Berthelot (kit Biocon[®])

Le dosage de l'urée sérique est un dosage **enzymatique et colorimétrique**. Les taux d'urée sont exprimés en **millimoles par litre**.

2.2.1.4 Triglycérides (kit GPO-PAP Biocon[®])

Le dosage des triglycérides est un dosage **enzymatique et colorimétrique**. Les concentrations en triglycérides sont exprimées en **millimoles par litre**.

2.2.1.5 Cholestérol total (kit CHOD-PAP Biocon[®])

Le dosage du cholestérol total est un dosage **enzymatique et colorimétrique**. Le cholestérol total est exprimé en **millimoles par litre**.

2.2.1.6 Phospholipides (kit PAP 150 bioMérieux[®])

Les phospholipides sériques sont déterminés par méthode **enzymatique et colorimétrique**. Les taux de phospholipides sont exprimés en **millimoles par litre**.

2.2.1.7 Détermination des acides gras libres ou AGNE (kit ACS-ACOD Wako[®])

Le dosage des acides gras non estérifiés (AGNE) ou libres est un dosage **enzymatique colorimétrique**. Les taux d'AGNE sont exprimés en **milliéquivalents par litre**.

2.2.1.8 Apolipoprotéine A-I (apo A-I) (kit Human[®])

Le dosage sérique de l'apo A-I est effectué par l'**immuno-essai turbidimétrique**. Les teneurs en apo A-I sont exprimées en **grammes par litre**.

2.2.1.9 Apolipoprotéine B (apo B) (kit Human[®])

Le dosage sérique de l'apo B est effectué par l'**immuno-essai turbidimétrique**. Les concentrations en apo B sont exprimées en **grammes par litre**.

2.2.1.10 Lipoprotéine (a) (Lp(a)) (kit Human[®])

Le dosage sérique de la Lp(a) est effectué par **test turbidimétrique**. Les concentrations en Lp(a) sont exprimées en **milligrammes par litre**.

2.2.1.11 Dosage de l'acide ascorbique

Le dosage sérique de l'acide ascorbique est effectué par la méthode de **Mc GOWN et al. (1982) [76]**. Les teneurs en acide ascorbique sont exprimées en **milligrammes par litre (Annexe 3)**.

2.2.1.12 Détermination de l'activité de la LCAT

L'activité de la Lécithine Cholestérol Acyl Transférase (LCAT EC 2.3.1.43) est déterminée par conversion du cholestérol non estérifié (³H) en cholestérol estérifié (³H) selon la méthode de **GLOMSET et WRIGHT (1964) [42]** modifiée par **KNIPPING (1986) [61]**. L'activité d'estérification du cholestérol est exprimée en **nanomoles.ml⁻¹.h⁻¹ (Annexe 3)**.

2.2.1.13 Détermination de l'activité de la catalase

L'activité de la catalase (CAT EC 1.11.1.6) est mesurée par analyse spectrophotométrique du taux de décomposition de peroxyde d'hydrogène à 240 nm (**AEBI, 1974 [1]**). L'activité de l'enzyme a été exprimée en U/mg de protéine, où U est défini comme la constante de taux de premier ordre observée pour la dégradation de H₂O₂.

2.2.2 Séparation des différentes fractions de lipoprotéines

La séparation des différentes fractions de lipoprotéines est réalisée par précipitation selon **BURSTEIN et al. (1970 ; 1989) [21,22] (fig. 1, Annexe 3)**.

- Les agents précipitants diffèrent selon la densité de chaque classe de lipoprotéines.
- Les lipoprotéines de faible densité (VLDL et LDL) sont précipitées par du phosphotungstate (Prolabo, Paris, France) et du MgCl₂ (Merck)
- Celles de haute densité (HDL₂ et HDL₃) par du sulfate de dextran (Wt 500 000) (Sigma Chemical Company, St Louis) et du MgCl₂.

2.2.3 Purification des différentes fractions de lipoprotéines

Pour minimiser la contamination par les protéines plasmatiques, les lipoprotéines sont purifiées (**Fig. 2**) (**Annexe 3**).

2.2.4 Analyse des différentes fractions lipoprotéiques

Après séparation des différentes fractions des lipoprotéines, le cholestérol total, les phospholipides ainsi que les triglycérides des VLDL, LDL, HDL₂ et HDL₃ sont dosés par les méthodes des kits décrites précédemment.

2.3 Analyse Statistique

L'analyse des résultats est effectuée par le logiciel **STATISTICA** (Version 4.1, Statsoft, Tulsa, OK). Le traitement statistique des données est réalisé par le test **ANOVA**. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm ES. Les résultats sont significatifs à $P < 0,05$.

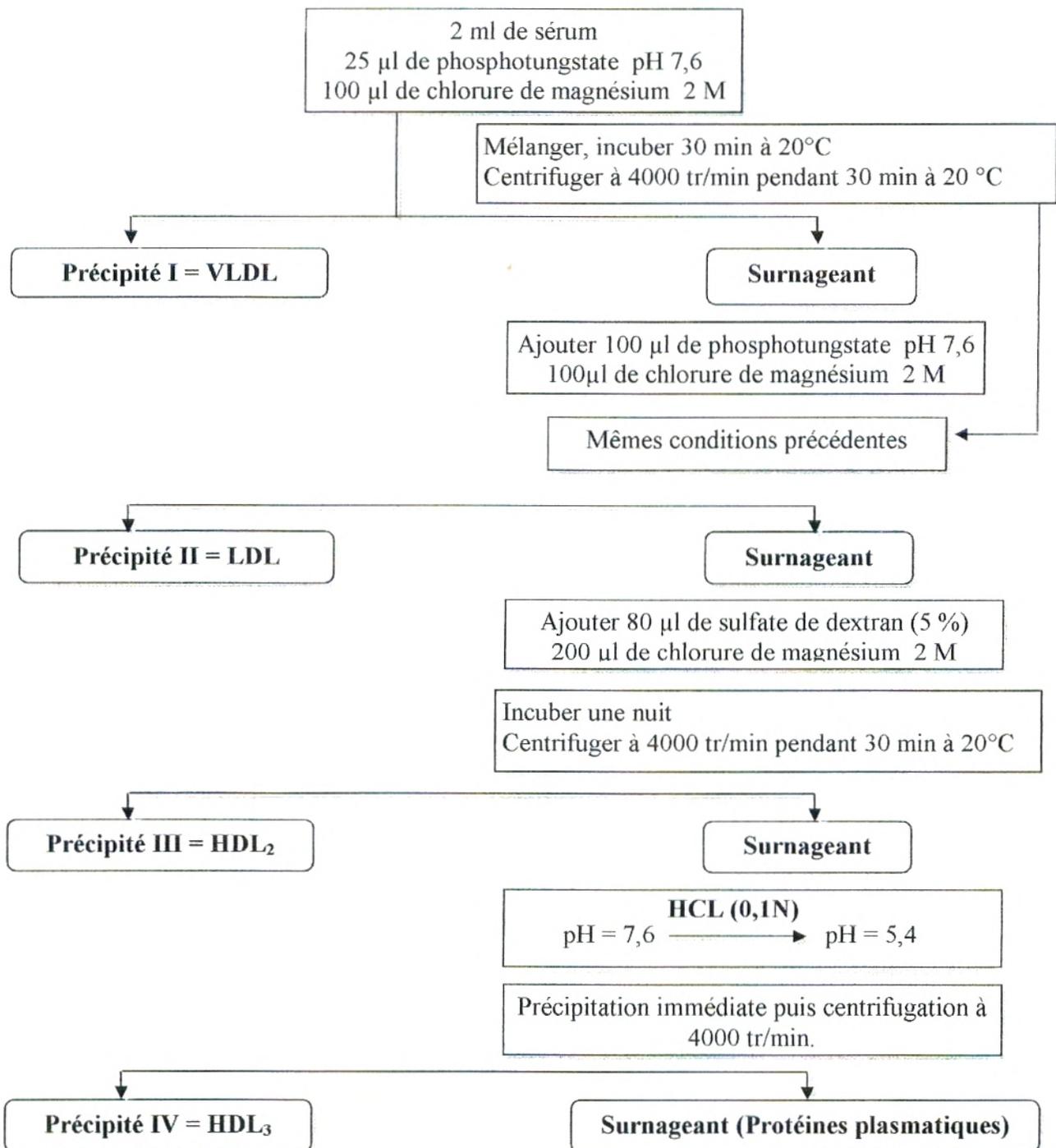


Figure 1 : Séparation des différentes fractions de lipoprotéines par précipitation au sulfate de dextran (BURSTEIN *et al.*, 1970 ; 1989) [21,22]

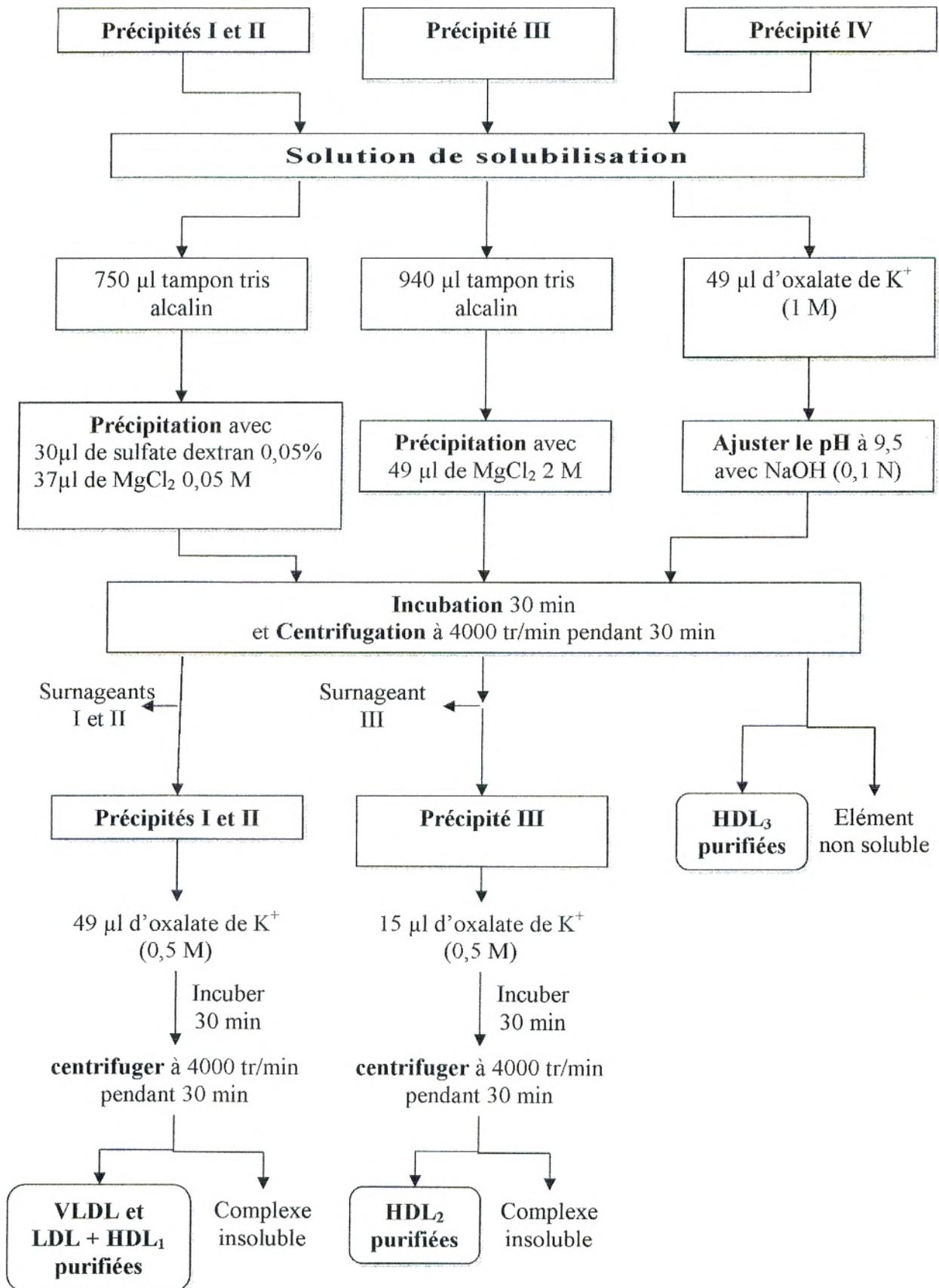


Figure 2 : Purification des différentes fractions de lipoprotéines (BURSTEIN *et al.*, 1970 ; 1989) [21,22]

Résultats

&

Interprétation

1 Dosage des paramètres sériques

1.1 Teneurs sériques en glucose, créatinine et urée chez les populations diabétiques et les témoins de sexe masculin

La glycémie ainsi que l'urémie et la créatininémie sont significativement élevées chez les DIN par rapport aux autres groupes (tableau 3).

Tableau 3 Teneurs sériques moyennes en glucose, créatinine et urée chez les populations diabétiques et les témoins de sexe masculin

Paramètres	Témoins N=20	DIN N=6	DID N=6
Glucose (g.l ⁻¹)	0,8 ±0,3	2,4 ±0,3*#	1,5 ±0,3
Créatinine (µmol.l ⁻¹)	58,5 ±4,1	70,3 ±5,6*	60,8 ±4,9
Urée (mmol.l ⁻¹)	5,6 ±0,2	7,9 ±1,3*#	5,3 ±1,7

* P<0,05 : DIN vs témoins ; § P<0,05 : DID vs témoins ; # P<0,05 DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant DID : diabète insulindépendant

1.2 Teneurs sériques en glucose, créatinine et urée chez les populations diabétiques et les témoins de sexe féminin

Aucune différence significative n'a été notée pour la glycémie, créatininémie et urémie pour l'ensemble des groupes (tableau 4).

Tableau 4 : Teneurs sériques moyennes en glucose, créatinine et urée chez les populations diabétiques et les témoins de sexe féminin

Paramètres	Témoins N=20	DIN N=6	DID N=6
Glucose (g.l ⁻¹)	0,9 ± 0,2	1,4 ±0,3	1,5 ± 0,5
Créatinine (µmol.l ⁻¹)	52,5 ±6,3	54,2 ±6,2	59,2 ±6,2
Urée (mmol.l ⁻¹)	4,2 ±0,8	5,9 ±1,6	6,7 ±1,1

* P<0,05 : DIN vs témoins ; § P<0,05 : DID vs témoins ; # P<0,05 DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant DID : diabète insulindépendant

1.3 Teneurs sériques en cholestérol, triglycérides et AGNE chez les hommes diabétiques

Une diminution significative du cholestérol total (CT), concomitante avec une diminution significative du LDL-C, est observée chez les DID comparés aux témoins. Par contre le HDL-C, les triglycérides (TG) et les AGNE ne varient pas significativement entre les différents groupes (**Annexe 4, Figure 3**).

1.4 Teneurs sériques en cholestérol, triglycérides et AGNE chez les femmes diabétiques

Aucune différence significative n'a été observée pour les teneurs sériques en HDL-C, TG et AGNE pour l'ensemble des groupes. Cependant, on note une diminution significative du CT chez les DIN comparées aux témoins. Elle est concomitante avec une baisse significative du LDL-C chez les DIN et DID comparées aux témoins (**Annexe 4, Figure 4**).

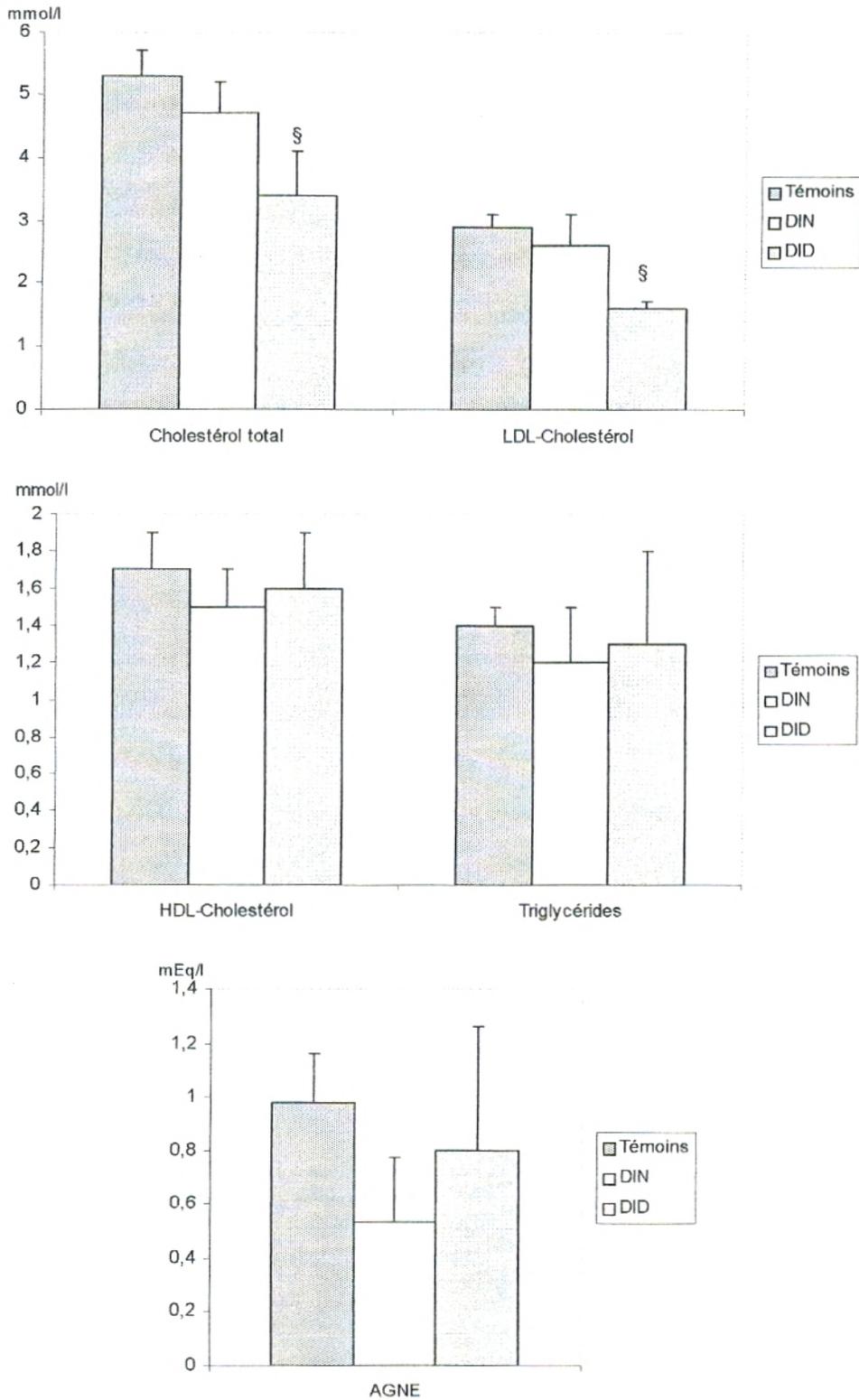


Figure 3 Concentrations sériques moyennes en cholestérol total, HDL-Cholestérol, LDL-Cholestérol, TG et AGNE chez les hommes diabétiques comparés aux témoins.

* P<0,05 : DIN vs témoins ; § P<0,05 : DID vs témoins ; # P<0,05 DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant **DID** : diabète insulinodépendant

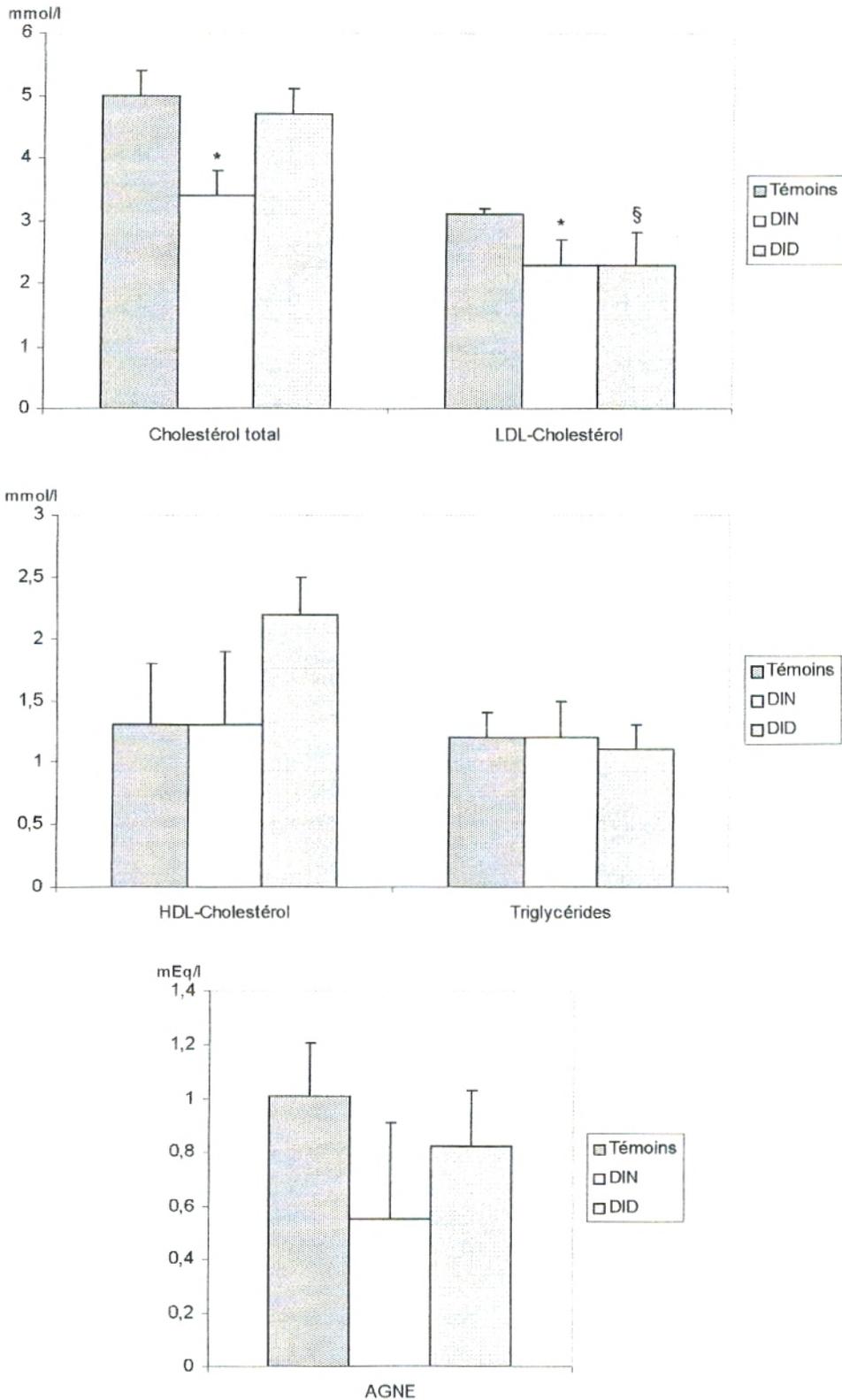


Figure 4 Concentrations sériques moyennes en cholestérol total, HDL-cholestérol, LDL-cholestérol, TG et AGNE chez les femmes diabétiques comparées aux témoins.

* $P < 0,05$: DIN vs témoins ; § $P < 0,05$: DID vs témoins ; # $P < 0,05$ DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant **DID** : diabète insulinodépendant

1.5 Teneurs sériques en cholestérol total des différentes fractions de lipoprotéines chez les hommes diabétiques

Le cholestérol total des fractions HDL₂, HDL₃ et VLDL chez les deux groupes ne présente aucune différence significative comparé aux témoins. Cependant, le cholestérol total des LDL est diminué significativement chez les DID comparés aux témoins (**tableau 5**).

Tableau 5 Teneurs sériques moyennes en CT des différentes fractions de LP chez les populations diabétiques et les témoins de sexe masculin (mmol.l⁻¹ sérum).

Paramètres	Témoins N=20	DIN N=6	DID N=6
HDL ₂	0,52 ± 0,09	0,3 ± 0,03	0,63 ± 0,04
HDL ₃	1,1 ± 0,12	1,2 ± 0,15	0,95 ± 0,10
VLDL	0,29 ± 0,06	0,21 ± 0,04	0,28 ± 0,05
LDL	2,92 ± 0,20	2,64 ± 0,10	1,64 ± 0,17§

**P*<0,05 ; DIN vs témoins ; §*P*<0,05, DID vs témoins ; #*P*<0,05, DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant DID : diabète insulindépendant

1.6 Teneurs sériques en cholestérol total des différentes fractions de lipoprotéines chez les femmes diabétiques

Aucune différence significative n'est observée entre les diabétiques et les témoins pour les concentrations en cholestérol total des HDL₂, HDL₃ et VLDL. Néanmoins, l'ensemble des diabétiques présente une diminution significative du CT des LDL comparés aux témoins (**tableau 6**).

Tableau 6 Teneurs sériques moyennes en CT des différentes fractions de LP chez les populations diabétiques et les témoins de sexe féminin (mmol.l⁻¹ sérum).

Paramètres	Témoins N=20	DIN N=6	DID N=6
HDL ₂	0,85 ± 0,20	0,69 ± 0,22	0,90 ± 0,11
HDL ₃	1,20 ± 0,40	0,89 ± 0,15	1,52 ± 0,20
VLDL	0,20 ± 0,08	0,18 ± 0,03	0,11 ± 0,06
LDL	3,10 ± 0,10	2,32 ± 0,42*	2,3 ± 0,28*

**P*<0,05 ; DIN vs témoins ; §*P*<0,05, DID vs témoins ; #*P*<0,05, DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant DID : diabète insulindépendant

1.7 Teneurs sériques en triglycérides des sous-fractions des HDL chez les hommes diabétiques

Aucune variation significative n'est notée pour les TG des différentes sous-fractions HDL₂ et HDL₃ chez les diabétiques comparés aux témoins (**tableau 7**).

Tableau 7 Teneurs sériques moyennes en TG des sous fractions des HDL chez les populations diabétiques et les témoins de sexe masculin (mmol.l⁻¹ sérum).

Paramètres	Témoins N=20	DIN N=6	DID N=6
HDL ₂	0,13 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,02
HDL ₃	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,03

**P*<0,05 ; DIN vs témoins ; §*P*<0,05, DID vs témoins ; #*P*<0,05, DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant DID : diabète insulino-dépendant

1.8 Teneurs sériques en triglycérides des sous-fractions des HDL chez les femmes diabétiques

Les teneurs sériques en TG des sous-fractions HDL₂ et HDL₃ ne varient pas significativement entre les diabétiques et les témoins (**tableau 8**).

Tableau 8 Teneurs sériques moyennes en TG des sous fractions des HDL chez les populations diabétiques et les témoins de sexe féminin (mmol.l⁻¹ sérum).

Paramètres	Témoins N=20	DIN N=6	DID N=6
HDL ₂	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,12 ± 0,02
HDL ₃	0,07 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,07 ± 0,01

**P*<0,05 ; DIN vs témoins ; §*P*<0,05, DID vs témoins ; #*P*<0,05, DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant DID : diabète insulino-dépendant

1.9 Teneurs sériques en apo A-I, apo B₁₀₀ et Lp(a) chez les hommes diabétiques

Les teneurs sériques en apo A-I sont augmentées de façon significative chez les DIN et DID comparés aux témoins. Cependant l'apo B₁₀₀ est diminuée chez les DID comparés aux témoins. La Lp(a) ne varie pas significativement chez les diabétiques par rapport aux témoins (**Annexe 5, Figure 5**).

1.10 Teneurs sériques en apo A-I, apo B₁₀₀ et Lp(a) chez les femmes diabétiques

Les teneurs sériques en apo A-I sont augmentées de façon significative chez les deux groupes de diabétiques comparés aux témoins. Cependant, les deux groupes de diabétiques présentent une diminution significative de l'apo B₁₀₀ comparés aux témoins. La Lp(a) ne varie pas significativement chez les diabétiques par rapport aux témoins (**Annexe 5, Figure 6**).

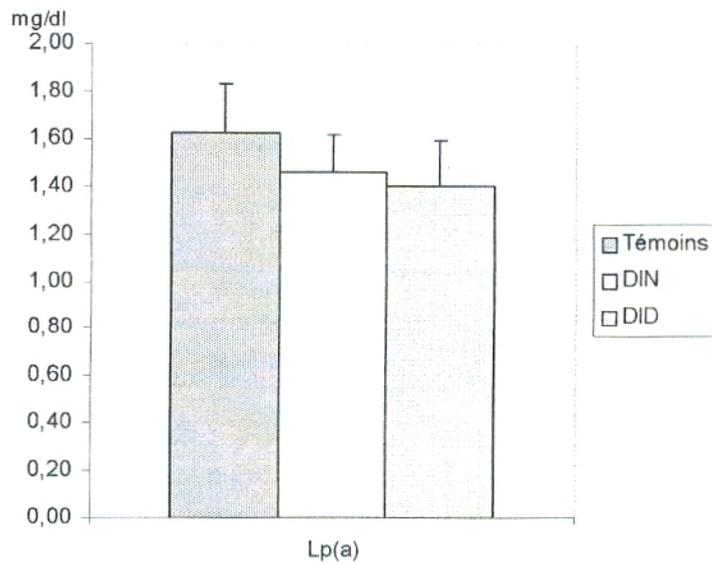
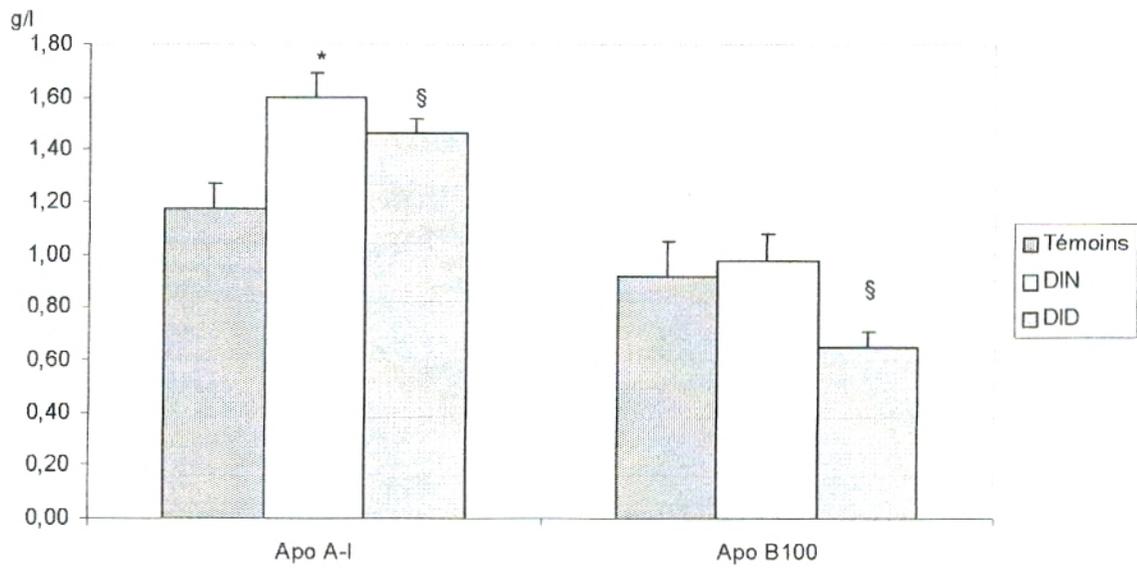


Figure 5 Teneurs sériques moyennes en apo A-I, apo B₁₀₀ et Lp(a) chez les populations diabétiques et les témoins de sexe masculin.

* $P < 0,05$, DIN vs témoins ; § $P < 0,05$, DID vs témoins ; # $P < 0,05$, DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant **DID** : diabète insulino-dépendant

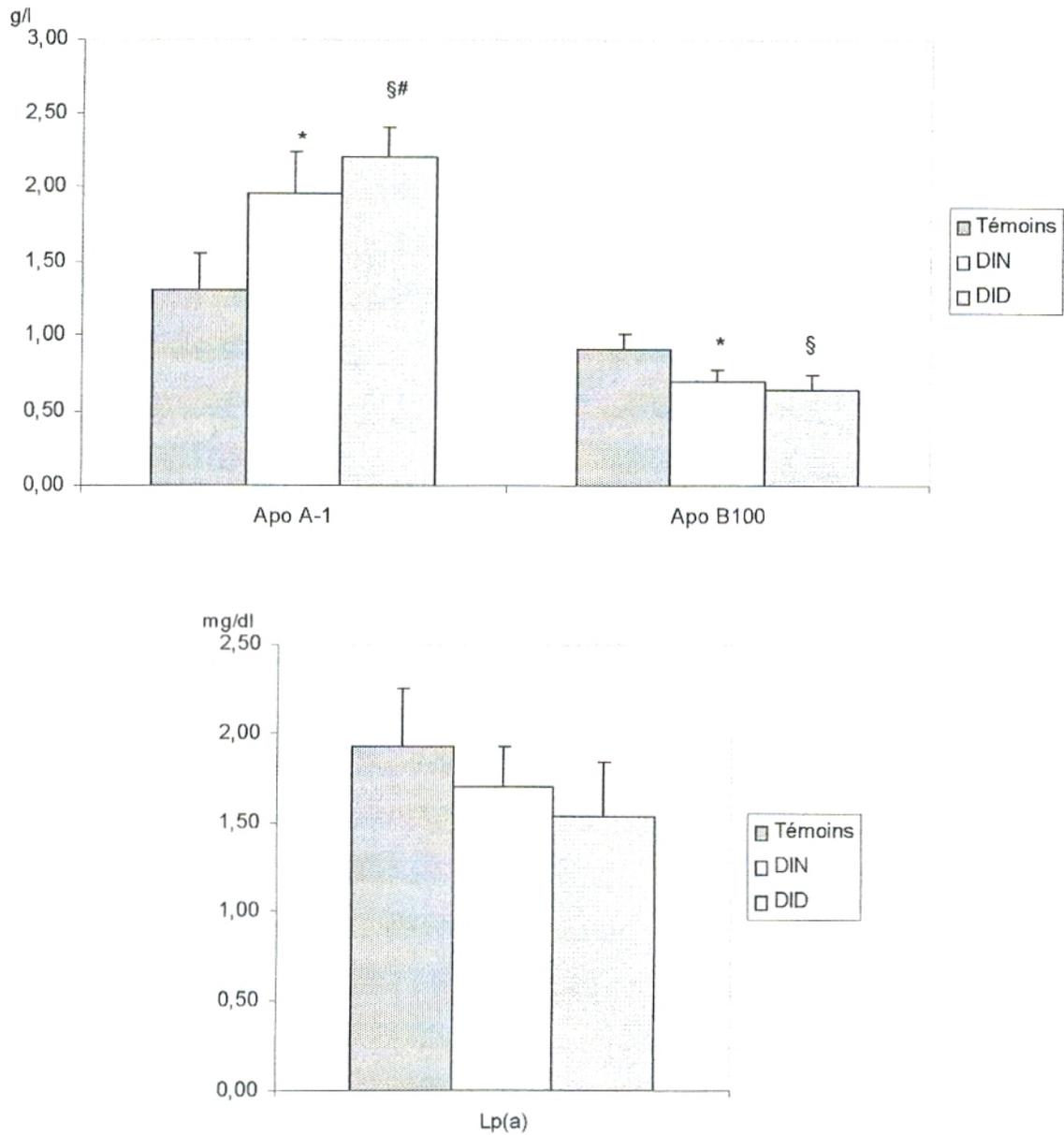


Figure 6 Teneurs sériques moyennes en apo A-I, apo B₁₀₀ et Lp(a) chez les populations diabétiques et les témoins de sexe féminin.

* $P < 0,05$, DIN vs témoins ; § $P < 0,05$, DID vs témoins ; # $P < 0,05$, DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant **DID** : diabète insulinodépendant

2 Etude de l'activité de la LCAT

2.1 Teneurs sériques en phospholipides des HDL et activité de la LCAT chez les hommes diabétiques

Le dosage de l'activité de la LCAT a révélé une augmentation significative chez les DID comparés aux témoins. Elle s'est avérée également plus élevée que chez les DIN. Par ailleurs, les teneurs en phospholipides (PL) sont augmentées dans les fractions HDL₃ chez les DIN comparés aux témoins (**Annexe 6, Figure 7**).

2.2 Teneurs sériques en phospholipides des HDL et activité de la LCAT chez les femmes diabétiques

L'activité de la LCAT est augmentée chez les DID comparés aux témoins. Elle est plus importante que chez les DIN. Les teneurs en PL des fractions HDL₃ ne présentent aucune variation par rapport aux témoins (**Annexe 6, Figure 8**).

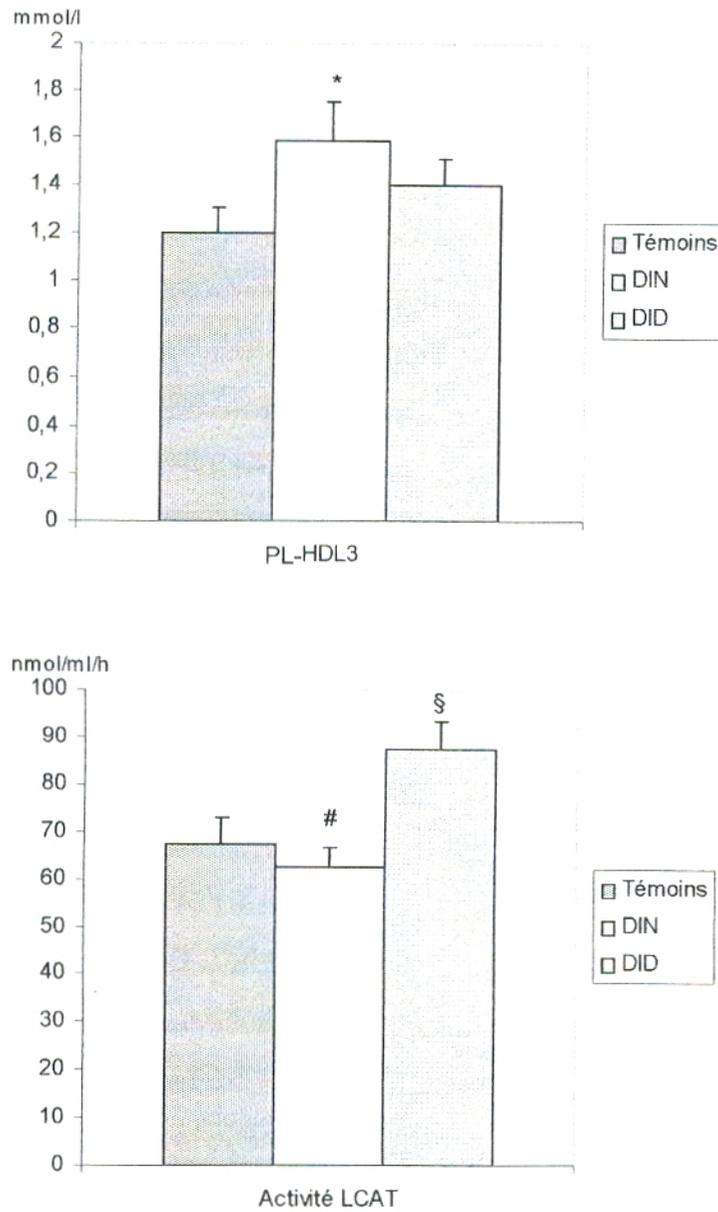


Figure 7 Teneurs sériques moyennes en phospholipides des HDL et activité de la LCAT chez les populations diabétiques et les témoins de sexe masculin.

* $P < 0,05$; DIN vs témoins ; § $P < 0,05$, DID vs témoins ; # $P < 0,05$, DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant **DID** : diabète insulino-dépendant

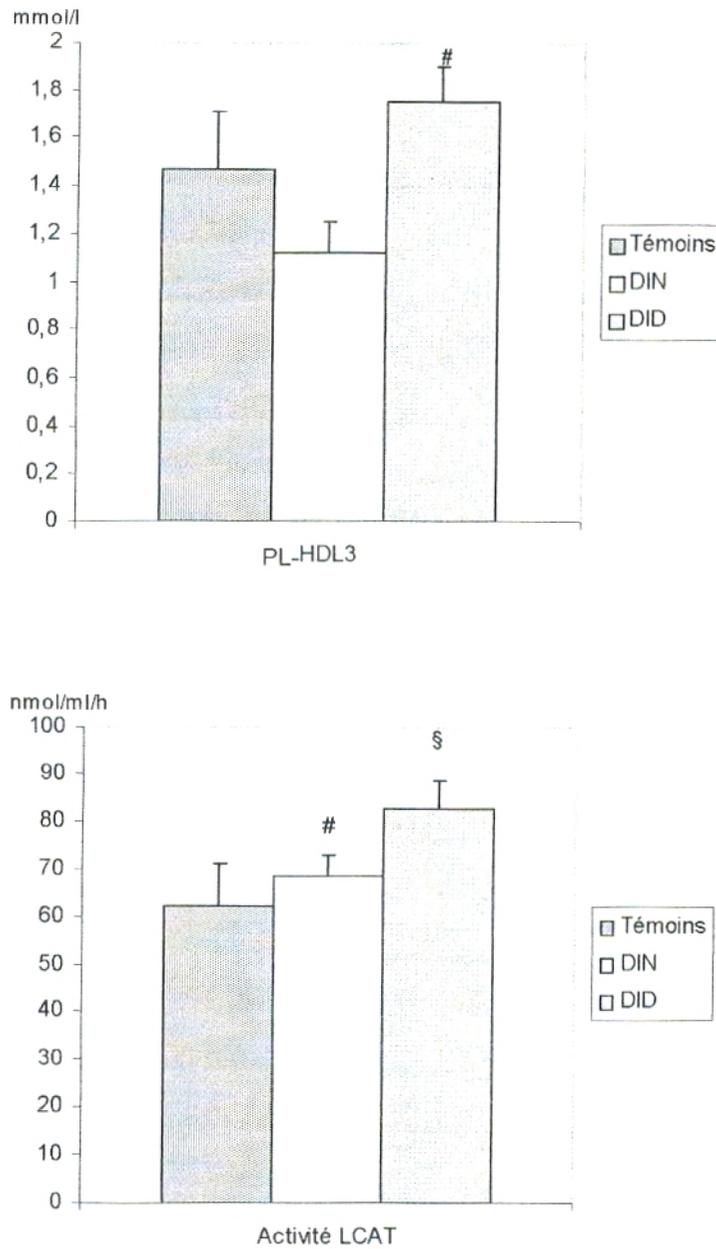


Figure 8 : Teneurs sériques moyennes en phospholipides des HDL et activité de la LCAT chez les populations diabétiques et les témoins de sexe féminin

* $P < 0,05$; DIN vs témoins ; § $P < 0,05$, DID vs témoins ; # $P < 0,05$, DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant DID : diabète insulino-dépendant

3 Analyse de quelques paramètres du statut antioxydant

3.1 Teneurs sériques en ascorbate et activité enzymatique de la catalase chez les hommes diabétiques

La vitamine C est augmentée de façon significative chez les DID comparés aux témoins. L'activité de la catalase est par contre diminuée chez les DID comparés aux témoins (Annexe 7, Figure 9).

3.2 Teneurs sériques en ascorbate et activité enzymatique de la catalase chez les femmes diabétiques

La vitamine C est augmentée chez les DIN et les DID comparés aux témoins. Cependant, les DID présentent une activité de la catalase diminuée comparées aux témoins (Annexe 7, Figure 10).

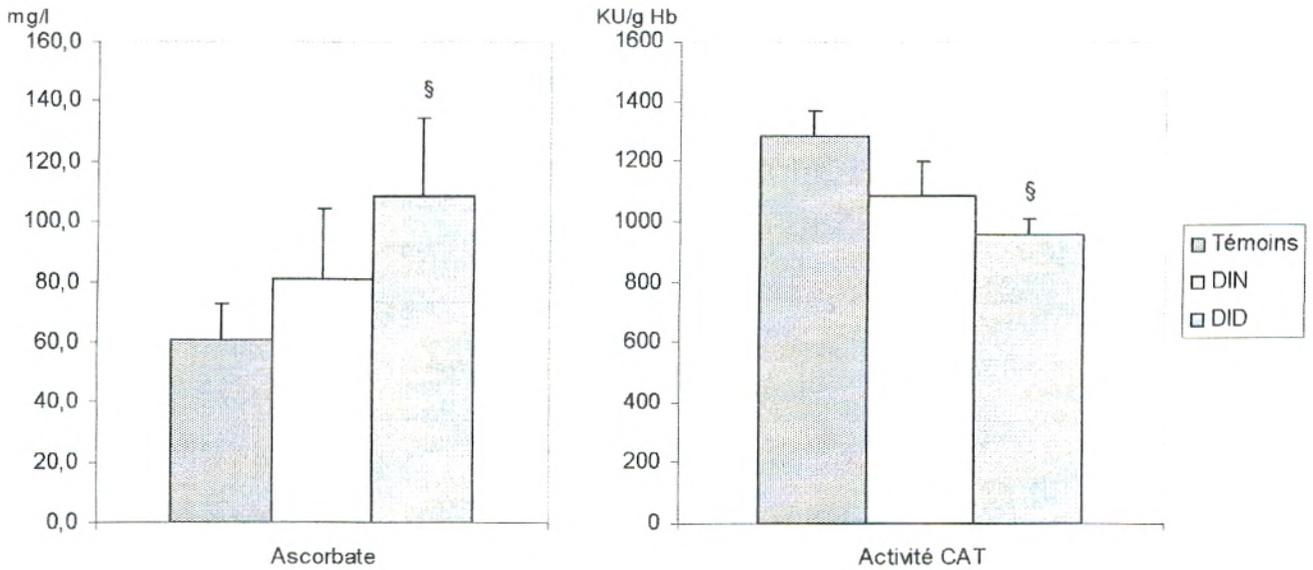


Figure 9 Teneurs sériques moyennes en ascorbate et activité enzymatique de la catalase (CAT) chez les populations diabétiques et les témoins de sexe masculin.

* $P < 0,05$, DIN vs témoins ; § $P < 0,05$, DID vs témoins ; # $P < 0,05$, DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant **DID** : diabète insulindépendant

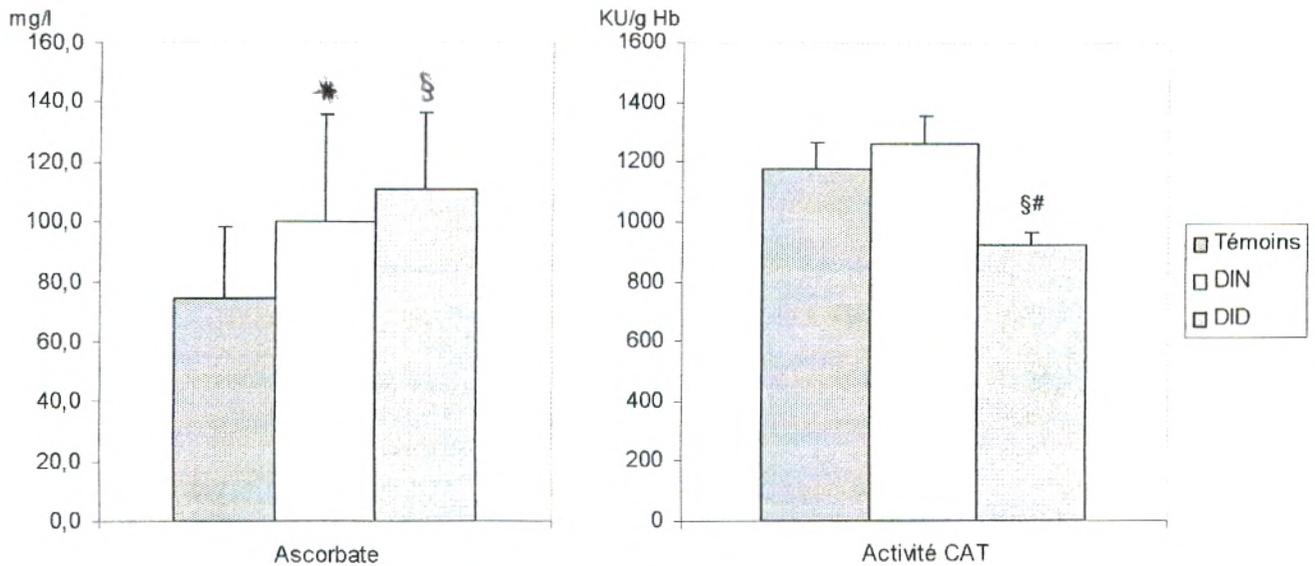


Figure 10 Teneurs sériques moyennes en ascorbate et activité enzymatique de la catalase (CAT) chez les populations diabétiques et les témoins de sexe féminin.

* $P < 0,05$, DIN vs témoins ; § $P < 0,05$, DID vs témoins ; # $P < 0,05$, DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant **DID** : diabète insulindépendant.

Discussion

Le diabète non contrôlé conduit à une importante perturbation de l'homéostasie du glucose et des autres combustibles, suite à une production insuffisante d'insuline par le pancréas et/ou à une résistance des tissus à l'action de l'insuline. L'ensemble de ces troubles constitue un problème majeur chez les diabétiques en favorisant l'apparition des complications liées au diabète.

Dans les conditions physiologiques normales, l'insuline joue le rôle principal dans la régulation des métabolismes glucidique et lipidique de par ses multiples sites d'action [65]. Ainsi, le manque relatif ou absolu de l'insuline chez les diabétiques altère profondément le métabolisme des lipoprotéines (LP) et ceci de manière quantitative et qualitative [53,83,114].

(Sur le plan quantitatif, l'anomalie des lipides plasmatiques la plus fréquemment rencontrée dans les deux types de diabète non contrôlés est l'hypertriglycéridémie] [20,79,105] associée à des taux bas de HDL-C [11,79]. Ces derniers sont inversement corrélés aux taux des triglycérides [113] et c'est par cette relation que les TG jouent leur rôle principal dans l'athérosclérose [7]. L'hypertriglycéridémie diminue le taux des HDL par l'accélération de la destruction de ces dernières par la triglycéride-lipase hépatique (TGLH) [27] suite à leur enrichissement en TG. C'est pourquoi l'activité de cette enzyme est inversement corrélée avec le taux de HDL-C [57].

Le taux de HDL-C est un indicateur significatif du risque cardiovasculaire chez les diabétiques [101]. L'effet protecteur des HDL contre les maladies cardiovasculaires, assuré principalement par l'apo A-I [96], est double. D'une part, les HDL assurent un rôle majeur dans le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie où il peut être catabolisé et excrété sous forme de sels biliaires [85]. D'autre part, elles présentent des effets antioxydants [78].

Le retour du cholestérol au foie passe par plusieurs étapes et dépend de plusieurs enzymes et protéines de transfert lipidique. Le cholestérol libre (CL) ainsi que les phospholipides sont d'abord captés par des HDL dites HDL_n (natives ou naissantes), puis estérifiés par la Lécithine Cholestérol Acyl Transférase (LCAT : EC.2.3.1.43) [68], enzyme présente au niveau de ces lipoprotéines. L'action de la LCAT sur le CL va d'abord participer à la transformation des HDL_n en petites HDL appelées HDL₃, puis à la transformation de ces dernières en HDL plus grandes dites HDL₂ [90]. Cette estérification constitue la première étape du retour du cholestérol vers le foie. Le dosage de l'activité de la LCAT chez nos DID a révélé une augmentation significative par rapport aux témoins quel que soit le sexe. Ces résultats sont en

accord avec **SCHERNTHANER et al. (1983) [92]** qui ont constaté que l'activité de la LCAT est normale ou légèrement augmentée chez les DID traités ainsi que chez les DNID exempts d'obésité et d'hyperlipoprotéïnémie. L'augmentation de l'activité de la LCAT peut être attribuée tout d'abord à l'insulinothérapie, puisque l'insuline active la LCAT [114]. De plus, les teneurs sériques élevées en apo A-I observées chez notre population diabétique comparée aux témoins peuvent expliquer l'augmentation de l'activité de la LCAT puisque l'apo A-I est un cofacteur de cette enzyme [36,104]. En revanche, l'activité de la LCAT chez les DIN s'est avérée normale, ce qui pourrait s'expliquer par la présence d'autres facteurs pouvant altérer sa fonction, comme la présence des LDL oxydées [14].

Une partie du cholestérol estérifié (CE) portée par les HDL₂ est délivrée directement au foie, mais cette voie semble être mineure. La majeure partie du CE est transférée aux autres LP (VLDL et LDL) en échange des TG par la cholestérol ester transfer protein (CETP) [63]. Elle sera par la suite transportée au foie par la voie des récepteurs à LDL [9] ou vers les autres tissus comme les glandes stéroïdiennes où il peut être réutilisé [87]. Une autre protéine de transfert des lipides impliquée dans le retour inverse du cholestérol est la phospholipid transfer protein (PLTP), qui est considérée comme le facteur majeur du métabolisme des HDL [28]. Cette protéine facilite le transfert des PL et du CL des VLDL, suite à leur lipolyse par la lipoprotéine lipase (LPL), vers les HDL [64]. C'est par ce biais qu'elle favorise la transformation des HDL₃ en HDL₂ [70]. Les PL des HDL sont considérés comme des paramètres essentiels dans la première étape du retour du cholestérol au foie, puisqu'ils sont utilisés par la LCAT pour estérifier le CL. Ainsi, une réduction même subtile de ces PL peut conduire à l'altération du transport inverse du cholestérol [8]. Chez nos diabétiques, l'analyse des PL des HDL₃, considérés comme des substrats de la LCAT, n'a révélé aucune variation significative par rapport aux témoins, à l'exception des DIN hommes qui présentent des teneurs augmentées en PL.

L'augmentation de l'apo A-I indépendamment du HDL-C a été constatée par les travaux de **ECKEL et al. (1981) [35]** et pourrait être expliquée par les travaux de **GRANINGER et al. (1982) [45]** qui ont noté qu'un traitement par pompe à insuline chez les DID augmente significativement l'apo A-I mais n'augmente que légèrement le HDL-C. Par ailleurs, **COLHOUN et al. (2002) [28]** ont rapporté également une augmentation de l'apo A-I chez les DID et ont suggéré l'existence d'une corrélation positive entre l'apo A-I et la PLTP.

Ainsi, il apparaît clair que le taux et la composition des sous-classes des HDL sont influencés par plusieurs facteurs tels que les apolipoprotéines, les enzymes lipolytiques, les pro-

téines de transfert lipidique et les récepteurs cellulaires des apoprotéines. Cependant, la plupart de ces facteurs sont régulés par l'insuline. C'est pourquoi le HDL-C est *diminué* chez les diabétiques (type 1 et type 2) mal équilibrés [40,46], et *normal* [32,83] comme nous l'avons trouvé chez notre population diabétique comparée aux témoins ou *légèrement augmenté* (10 à 20 %) chez les diabétiques de type 1 ayant un équilibre glycémique favorable [79]. L'insulinothérapie intensifiée augmente le HDL-C [32] au profit des fractions HDL₂ [111], qui pourraient être en relation avec l'excès d'activation de la LPL par l'insulinothérapie [114].

En outre, les valeurs de HDL-C trouvées chez nos diabétiques ($\geq 1,3$ mmol/l) sont supérieures aux teneurs optimales de HDL-C ($\geq 1,02$ mmol/l) recommandées par l'A.D.A. (2003) [5] pour les adultes diabétiques, alors que les valeurs de HDL-C recommandées pour la population générale sont inférieures à celles recommandées pour les diabétiques ($\geq 0,9$ mmol) [3,51] (Annexe 4).

Par ailleurs, l'exploration des teneurs en TG plasmatiques, véhiculés essentiellement par les VLDL plasmatiques, n'a révélé aucune différence significative chez nos diabétiques par rapport aux témoins. Ceci s'accorde avec les résultats de plusieurs auteurs qui notent que les niveaux de TG-VLDL sont normaux ou même subnormaux chez les DID [33,88,109] et les DIN [16]. Ceci s'explique probablement par une augmentation du catabolisme des VLDL ou une diminution de leur production suite à l'insulinothérapie. En effet, l'insuline régule finement le catabolisme des VLDL, puisque cette hormone est considérée comme un activateur potentiel de la LPL, qui est l'enzyme clé du catabolisme des LP riches en TG [20,114]. De plus, l'insuline peut baisser la production des VLDL en diminuant l'afflux des acides gras non estérifiés au niveau du foie. Cette hormone inhibe la lipase hormonosensible au niveau du tissu adipeux, entraînant ainsi une diminution de la libération des AGNE qui sont les intermédiaires clés dans le métabolisme lipidique. C'est pourquoi le taux des AGNE est généralement augmenté chez les diabétiques mal équilibrés [77]. Cependant, nos diabétiques présentent des taux normaux d'AGNE quel que soit le type du diabète et quel que soit le sexe.

A côté des HDL et des VLDL, les teneurs en LDL constituent également un facteur important au cours du diabète de par leurs propriétés athérogènes. Ces LP sont formées à partir des VLDL hépatiques par un processus complexe de lipolyse intravasculaire [52]. Le catabolisme des LDL circulantes est principalement assuré par la voie des récepteurs ^{LDL} qui rend compte de 70% de la dégradation des LDL [19]. La moitié de cette dégradation est assurée par le foie qui, par conséquent, exerce un contrôle prépondérant non seulement sur la concentration plasmatique mais aussi sur l'homéostasie du cholestérol [81]. Ceci nous permet de suggé-

rer que les taux diminués de LDL-C et d'apolipoprotéine B (apo B) (qui reflètent probablement une réduction des LDL) retrouvés chez notre population diabétique, à l'exception des DIN hommes, sont probablement dus à une augmentation de leur catabolisme. Plusieurs facteurs peuvent moduler le taux des LDL, cependant l'équilibre glycémique semble jouer un rôle important, puisque l'**A.D.A. (2003) [5]** estime que le LDL-C peut diminuer de 10 à 15 % si le contrôle glycémique est optimal chez les diabétiques. Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec les constatations des auteurs qui ont observé des taux normaux ou même diminués de LDL-C et d'apo B chez les DID bien équilibrés **[32,54,110,120]** ainsi que chez les DIN **[16]**. Quelques études suggèrent que le contrôle glycémique strict abaisse les taux de LDL-C même à court terme **[34]**. Etant donné que l'équilibre glycémique est déterminé par l'insulinothérapie chez nos diabétiques, l'insuline semble alors jouer un rôle important. D'une part, elle augmente le catabolisme des LDL et ceci de plusieurs manières. Elle stimule la dégradation des LDL par la voie des récepteurs, en augmentant l'expression des récepteurs spécifiques des LDL (apo B/E) **[31]**, en activant ces récepteurs **[26,75]** et en stimulant également la liaison des LDL à leurs récepteurs **[55]**. Ces derniers sont responsables de l'homéostasie du cholestérol non seulement au niveau de chaque cellule mais aussi à l'échelle de l'organisme entier **[19]**. La diminution des LDL peut aussi être attribuée à la réduction de la glycation de leur apo B induite par l'insulinothérapie intensive et par conséquent à l'augmentation de leur catabolisme **[69]**. La glycation de l'apo B réduit l'affinité des LDL pour leurs récepteurs **[121]** et ces LP seront plutôt captées par un système de récepteurs non régulés au niveau des macrophages **[86]**. Ainsi, le défaut de reconnaissance des LDL glyquées par leurs récepteurs perturbe l'homéostasie cellulaire du cholestérol au sein de l'hépatocyte, et conduirait à une synthèse accrue du cholestérol par le foie **[46]**. D'autre part, l'insuline peut agir directement ou indirectement sur la diminution de l'apo B, apoprotéine majeure des VLDL et des LDL. En effet, quelques études ont montré que l'insuline augmente directement la dégradation d'apo B nouvellement synthétisées **[97]** et c'est l'addition de lipides qui prévient cette dégradation. Par conséquent, la déficience en insuline ou l'insulinorésistance hépatique peuvent augmenter la sécrétion de l'apo B sous forme de VLDL. En outre, l'effet indirect de l'insuline sur la sécrétion de l'apo B passe par le transport des AGNE au foie, qui est finement régulé par cette hormone **[44]**. En effet, plusieurs auteurs s'accordent à noter que les AGNE sont des régulateurs de la production de cette apoprotéine **[29,67,108]**.

ainsi que le contrôle glycémique, qui reste le facteur principal [84,106]. Ainsi, un contrôle glycémique strict par une insulinothérapie intensive au cours du diabète de type 1 ne s'accompagne généralement pas de modifications considérables dans la balance oxydant-antioxydant puisque l'insuline améliore l'équilibre glycémique. De plus, elle peut induire la synthèse des enzymes antioxydantes [59]. En effet, de nombreux auteurs s'accordent à montrer que l'activité de la CAT érythrocytaire, enzyme antioxydante la plus importante consommant le H_2O_2 plasmatique [2,37], ne semble pas être altérée chez les patients diabétiques de type 1 et 2 [43,58,72,107].

Cependant, nos résultats montrent bien l'existence d'un stress oxydatif dans les érythrocytes des diabétiques de type 1, puisqu'ils présentent une activité diminuée de la CAT. Ceci s'accorde avec les résultats de DOMINGUEZ *et al.* (1998) [30] et de SANTINI *et al.* (1997) [91] qui ont constaté que, chez les DID bien contrôlés, le stress oxydatif est augmenté et les défenses antioxydantes sont défectueuses indépendamment de l'âge des patients, de la durée du diabète, de son contrôle métabolique ou de la présence de complications. Cette diminution est probablement liée à la glycation de la CAT, puisque l'activité de cette dernière dépend de la durée des périodes de déséquilibre glycémique antérieures [106].

Par ailleurs, selon MARRA *et al.* (2002) [71], la réduction de l'activité antioxydante et l'augmentation du stress oxydatif se produisent tôt avant le diagnostic du diabète de type 1. Ceci suggère que des facteurs autres que la glycation sont capables d'altérer la fonction des enzymes antioxydantes.

L'action antioxydante des enzymes est complétée par des molécules représentées essentiellement par le couple vitamine E / vitamine C, les caroténoïdes et le glutathion [99].

Plusieurs recherches ont démontré que les concentrations plasmatique et tissulaire de certains antioxydants comme l'acide ascorbique, antioxydant plasmatique majeur, sont diminuées chez les patients diabétiques par rapport aux témoins [73,95,115,122]. Le statut en vitamine C dépend de l'interaction entre la consommation alimentaire de cette vitamine et les concentrations plasmatiques d'insuline et de glucose [119]. Ainsi, la diminution de la vitamine C au cours du diabète peut être la conséquence d'une *réduction* de la captation cellulaire de l'acide ascorbique, puisque le glucose (qui se trouve en excès) entre en compétition avec l'acide ascorbique, d'une *augmentation* d'excrétion urinaire de l'acide ascorbique et d'une *réduction* de concentration du glutathion indispensable à la régénération enzymatique de l'acide ascorbique à partir du déhydroascorbate [17]. Toutefois, nos résultats concernant le

dosage de l'acide ascorbique ont révélé une augmentation, concomitante avec une glycémie normale, chez nos DID ainsi que chez nos DIN femmes comparés aux témoins. Ceci est probablement dû à l'insulinothérapie qui inhibe la néoglucogenèse et stimule la captation du glucose par le muscle et le tissu adipeux, diminuant ainsi la compétition du glucose avec l'acide ascorbique. Ceci s'accorde avec les résultats de **PARK et CHOI (2002) [82]**, qui ont montré qu'une glycémie normale chez les diabétiques de type 2 traités par l'insuline conduit à des concentrations élevées d'acide ascorbique plasmatique. Par ailleurs, les DIN hommes ont présenté une hyperglycémie associée à des teneurs normales d'acide ascorbique.

Le diabète est une maladie métabolique qui s'accompagne généralement d'une altération du métabolisme des lipoprotéines ainsi que d'une augmentation du stress oxydatif. Ces troubles étant parmi les principaux facteurs qui favorisent l'apparition des complications liées aux diabète, il apparaît alors judicieux d'étudier le profil lipidique et quelques paramètres du statut antioxydant chez des diabétiques insulinodépendants et insulino-nécessitants de la région de Tlemcen.

Le profil lipidique et lipoprotéique étudié présente des modifications favorables aussi bien sur le plan quantitatif que qualitatif.

(Sur le plan quantitatif, l'analyse des lipides plasmatiques a révélé une diminution des teneurs sériques en cholestérol total chez les DID hommes, ainsi que chez les DIN femmes. Cependant, aucune variation de la triglycéridémie ni du taux des acides gras non estérifiés n'a été remarquée pour l'ensemble de la population diabétique.)

Sur le plan qualitatif, l'analyse des différentes fractions lipoprotéiques a montré des modifications de leur composition en lipides et en apoprotéines. Ces variations se traduisent par une réduction du cholestérol total des LDL (LDL-C) et de l'apo B pour l'ensemble des DID ainsi que pour les DIN femmes. Cependant, le cholestérol total des HDL (HDL-C) et la Lp(a) se sont avérés normaux pour l'ensemble des diabétiques. Par ailleurs, le dosage de l'Apo A-I, cofacteur de la LCAT, a révélé une augmentation pour l'ensemble de la population diabétique. Les phospholipides des sous-fractions HDL₃, substrats de cette enzyme, sont augmentés chez les DIN hommes mais restent normaux pour le reste de la population diabétique comparée aux témoins.

La détermination de l'activité de la LCAT a révélé une augmentation chez les DID quel que soit le sexe. Cette élévation suggère que le taux d'estérification du cholestérol libre est augmenté, ce qui pourrait être favorable chez ces DID en stimulant le retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie.

Par ailleurs, le dosage des paramètres du statut antioxydant a révélé une augmentation des teneurs sériques en vitamine C chez les DID ainsi que les DIN femmes, suggérant un équilibre glycémique favorable. Cependant, les DID ont présenté une activité réduite de la catalase, témoin d'un stress oxydatif probable.

Les résultats relatifs au profil lipidique et lipoprotéique suggèrent que notre population diabétique ne présente pas de profil athérogène. En effet, les marqueurs des maladies cardiovasculaires (HDL-C, triglycérides, LDL-C et Lp(a)) ne montrent pas de variation défavorable.

Ces résultats s'avèrent en outre très proches chez les DID et les DIN, malgré la grande différence de ces deux types sur le plan physiopathologique. Cette convergence est probablement sous l'influence du type de traitement, en l'occurrence l'insulinothérapie, sur le profil lipidique et lipoprotéique.)

Ce travail incite à d'éventuelles recherches :

– sur les troubles lipidiques et lipoprotéiques au cours du diabète en s'intéressant d'avantage à d'autres facteurs de régulation comme les protéines de transfert lipidique (CETP, PLTP) et les lipases (LPL, TGLH), et aux autres variations d'aspect qualitatif des lipoprotéines comme la taille, la glycation, ... qui perturbent profondément leur métabolisme.

– sur le statut antioxydant au cours du diabète en complétant ce travail par l'étude des variations des autres antioxydants.

Références

Bibliographiques

- [1] **AEBI H., 1974** – *Catalase. In Methods of enzymatic analysis.*
Bergmeyer, H., ed. Verlag Chemie, Weinheim : 673-384.
- [2] **AGAR N.S., SADRZADEH S.M.H., HALLAWAY P.E. et EATON J.W., 1986**
– *Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense?*
J. Clin. Invest., 77:319-321.
- [3] **AHMED S.M., CLASEN M.E. et DONNELLY J.F., 1998** – *Management of Dyslipidemia in adults.*
American Family Physician. 1^{er} mai 1998.
- [4] **American Diabetes Association, 1998** – *Standards of medical care for patients with diabetes mellitus.*
Diabetes Care ; 21 : S23–S31.
- [5] **American Diabetes Association, 2003** – *Management of Dyslipidemia in Adults With Diabetes.*
Diabetes Care 26 : S83-S86.
- [6] **AMOS A.F., McCARTY D.J. et ZIMMET P., 1997** – *the rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010.*
Diabet. Med. 14 (Suppl. 5) : S1-S85.
- [7] **ASSMAN G. et SCHULTE H., 1992** – *Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglyceride to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience).*
Am. J. Cardiol.; 70:733-737.
- [8] **BAGDADE J.D., HELVE E. et TASKINEN M.R., 1991** – *effect of continuous insulin infusion therapy on lipoprotein surface and core lipid composition in insulin-dependent diabetes mellitus.*
Metabolism ; 40 : 445-449.
- [9] **BARTER P.J., BREWER H.B., CHAPMAN M.J. et al., 2003** – *Cholesteryl Ester Transfer Protein. A Novel Target for Raising HDL and Inhibiting Atherosclerosis.*
Arterioscler Thromb Vasc Biol.; 23:160.
- [10] **BERLINER J.A. et HEINECKE J.W., 1996** – *The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis.*
Free Radic Biol Med; 20 : 707–27.

- [11] **BETTERIDGE D.J., 1996** – *Diabetic dyslipidaemia – implications for vascular risk.* in **BETTERIDGE D.J.** – *Edition Lipids : Current perspective*
London : Martin Dunitz. 135-57.
- [12] **BETTERIDGE D.J., 1999** – *Diabetic dyslipidaemia.*
Eur. J. Clin. Invest. 29 (Suppl. 2) : 12-16.
- [13] **BEZZAOUCHA A. et DEKKAR N., 1992** – *Le diabète sucré connu à Alger: Fréquence et conséquences.*
Diabète et métabolisme ; 18 : 229-235.
- [14] **BIELICKI J.K. et FORTE T.M., 1999** – *Evidence that lipid hydroperoxides inhibit plasma lecithin:cholesterol acyltransferase activity*
The Journal of Lipid Research, Vol. 40, 948-954.
- [15] **BIERMAN E.L., 1992** – *Atherogenesis in diabetes.*
Arterioscler. Thromb.;12: 647-656.
- [16] **BILLINGHAM M.S., MILLES J.J., BAILEY C.J. et HALL R.A., 1989** – *Lipoprotein subfraction composition in non-insulin-dependent diabetes treated by diet, sulphonylurea, and insulin.*
Metabolism; 38:850-857.
- [17] **BODE A.M., YAVAROW C.R., FRY D.A., VARGAS T., 1993** – *Enzymatic basis for altered ascorbic acid and dehydroascorbic acid levels in diabetes.*
Biochem Biophys Res Commun;191:1347-53.
- [18] **BOURDON E., LOREAU N., BLACHE D., 1999** – *Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin.*
FASEB J.;13:233-244.
- [19] **BROWN M.S. et GOLDSTEIN J.L., 1986** – *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis.*
Science; 232:34-46.
- [20] **BRUN J.M., 1997** – *Quel objectif de triglycéridémie rechercher lors du traitement du diabète non-insulinodépendant ?*
Diabetes & Metabolism (Paris). 23 : 258-263.
- [21] **BURSTEIN M., FINE A., ATGER V. et al., 1989** – *Rapid method for the isolation of two purified subfractions of high density lipoproteins by differential dextran sulfate-magnesium chloride precipitation.*
Biochem. 71 : 741-746.

- [22] BURSTEIN M., SCHOLNICK H. R. et MORFIN R., 1970 – *Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions.*
J. Lipid. Res. 11 : 583-595.
- [23] CALLES-ESCANDON J. et CIPOLLA M., 2001 – *Diabetes and Endothelial Dysfunction: A Clinical Perspective*
Endocrine Reviews 22 (1): 36-52.
- [24] CARR A. C., ZHU B.Z., FREI B., 2000 – *Potential Antiatherogenic Mechanisms of Ascorbate (Vitamin C) and α -Tocopherol (Vitamin E).*
Circulation Research.;87:349.
- [25] CERIELLO A., DELLO RUSSO P., AMSTAD P., CERUTTI P., 1996 – *High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture: evidence linking hyperglycemia and oxidative stress.*
Diabetes. 45:471–477.
- [26] CHAIT A., BIERMAN E.I. et ALBERT J.J., 1979 – *Low density lipoprotein receptor activity in cultured skin fibroblasts.*
J. Clin. Invest.; 64 : 1309-1319.
- [27] CLAY M.A., NEWNHAM H.H. et BARTER P.J., 1991 – *Hepatic lipase promotes a loss of apolipoprotein AI from triglyceride-enriched human high density lipoproteins during incubation in vitro.*
Arterioscl. Thromb. ; 11 : 415,422.
- [28] COLHOUN H. M., TASKINEN M.-R., OTVOS J. D., et al., 2002 – *Relationship of Phospholipid Transfer Protein Activity to HDL and Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins in Subjects With and Without Type 1 Diabetes*
Diabetes, 51(11): 3300 – 3305
- [29] DIXON J.L., FURUKAWA S. et GINSBERG H.N., 1991 – *Oleate stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from Hep G2 cells by inhibiting early intracellular degradation of apolipoprotein B.*
J Biol Chem. 266:5080–5086.
- [30] DOMINGUEZ C., RUIZ E., GUSSINYE M., CARRASCOSA A., 1998 – *Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents.*
Diabetes Care 21:1736–1742.

- [31] **DOUSTE-BLAZY P., HANAIRE-BROUTIN H. et AZIZI M., 1989** – *Hyperlipoprotéinémies secondaires.*
Encycl. Méd. Chir. (Paris-France). Glandes-Nutrition, 10368 F¹⁰.
- [32] **DULLAART R.P.F., 1995** – *Plasma lipoprotein abnormalities in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus.*
Netherlands Journal of Medicine. 46: 44-54.
- [33] **DUNN F.L., 1992** – *Plasma lipid and lipoprotein disorders in IDDM.*
Diabetes ; 41 (2) : 102-106.
- [34] **DUNN F.L., PIETRI A. et RASKIN P., 1981** – *Plasma lipid and lipoprotein levels with continuous subcutaneous insulin infusion.*
Ann. Intern. Med.; 95:426-431.
- [35] **ECKEL R.H., ALBERS JJ., CHERING MC., et al., 1981** – *High density lipoprotein composition in insulin dependent diabetes mellitus.*
Diabetes; 30: 132-138.
- [36] **EISENBERG G., 1984** – *High density lipoprotein metabolism.*
J Lipid Res; 25: 1017-1058.
- [37] **ENGSTROM P.C., EASTERLING L., BABER R.R. et MATALON S., 1990** – *Mechanisms of extracellular hydrogen peroxide clearance by alveolar type II pneumocytes.*
J. Appl. Physiol.; 69:2078-2084.
- [38] **FEKI M., SOUISSI M., MOKHTAR E. et al., 2000** – *Vitamin E and Coronary Heart Disease in Tunisians.*
Clinical Chemistry : 46 : 9 : 1401-1405
- [39] **FULLER C.J., CHANDALIA M., GARG A. et al., 1996** – *RRR-alpha-tocopheryl acetate supplementation at pharmacologic doses decreases low-density-lipoprotein oxidative susceptibility but not protein glycation in patients with diabetes mellitus.*
American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 63: 753-759.
- [40] **GARG A., 1994** – *Management of dyslipidémie in IDDM patients.*
Diabetes Care; 17: 224-234.
- [41] **GIUGLIANO D., CERIELLO A. et PAOLISSO G., 1995** – *Diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular disease: which role of oxidative stress?*
Metab. Clin. Exp., 44:363-368.

- [42] **GLOMSET J.A. et WRIGHT J.L., 1964** – *Some properties of cholesterol esterifying enzyme in human plasma.*
 Biochim. Biophys. Acta. 89 : 266-71.
- [43] **GODIN D.V., WOHAIEB S.A., GARNETT M.E. et GOUMENIOUK A.D., 1988** – *Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes.*
 Mol Cell Biochem;84:223-231.
- [44] **GOLDBERG I.J., 2001** – *Diabetic Dyslipidemia: Causes and Consequences.*
 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism Vol. 86, No. 3 965-971.
- [45] **GRANINGER W., SCHERNTHANER G., CONCA W. et KOSTNER G.M., 1982** – *Influence of normoglycemia on apolipoproteins, Lp(a) and LCAT activity in type-I diabetics.*
 In: 16th Annual Meeting of the European Society for Clinical Investigation, INSERM, France, Abstract No.82, p.14.
- [46] **GUERCI B., ZIEGLER O. et DROUIN P. 1994** – *Hyperlipidémie au cours du diabète notions récentes.*
 La presse médicale : 23, n°2 : 82-88.
- [47] **GUERMAZ R., ZEKRI S., BOUMEDIENE S. et BROURI M., 1998** – *La néphropathie dans le DNID.*
 La revue Médico-Pharmaceutique N°4 : pp.35-37.
- [48] **HAFFNER S.M., TUTTLE K.R. et RAINWATER D.L., 1991** – *Decrease of lipoprotein (a) with improved glycemic control in IDDM subjects.*
 Diabetes Care; 14:302-307.
- [49] **HALLER H., 1997** – *Postprandial glucose and vascular disease.*
 Diabetic Medicine. 14: S50-S56.
- [50] **HALLIWELL B. et GUTTERIDGE J.M., 1999** – *Free radicals in biology and medicine.*
 3rd ed. New York: Oxford University Press.
- [51] **HARPER C.R. et JACOBSON T.A., 1999** – *New perspectives on the management of low levels of high density lipoprotein cholesterol.*
 Arch Intern Med; 159:1049–1057.
- [52] **HAVEL R.J., 1984** – *The formation of LDL : mechanisms and regulation.*
 J Lipid Res; 25: 1570-1576.

- [53] **HEDRICK C.C., THORPE S.R., FU M.-X. et al., 2000** – *Glycation impairs high-density lipoprotein function.*
Diabetologia, 43: 312-320.
- [54] **HOWARD B.V., 1987** – *Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus.*
J. Lipid Res; 28: 613-628.
- [55] **HOWARD B.V., ABBOTT W.G., BELTZ W.F. et al., 1987** – *Integrated study of low density lipoprotein metabolism and very low density lipoprotein metabolism in non insulin dependent diabetes.*
Metabolism; 36: 870-877.
- [56] **INOUE M., MIO T. et SUMINO K., 1999** – *Link between glycation and lipoxidation in red blood cells in diabetes.*
Clinica chimica acta 285 : 35-44.
- [57] **KAHRI J., GROOP P.-H. et VIBERTI G.C., 1993** – *Regulation of apolipoprotein AI containing lipoproteins in IDDM.*
Diabetes 42:1281–1288.
- [58] **KAJI H., KURASAKI M., ITO K. et al., 1985** – *Increased lipoperoxide value and glutathione peroxidase activity in blood plasma of type I diabetic women.*
Klin Wochenschr; 63:76576-76578.
- [59] **KEDZIORA-KORNATOWSKA K. Z., LUCIACK M., BLASZCZYK J. et PAWLAK W., 1998** – *Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy.*
Nephrol Dial Transplant; 13: 2829-2832.
- [60] **KING H., AUBERT R.E. et HERMAN W.H., 1998** – *Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections.* Diabetes Care 21:1414–1431.
- [61] **KNIPPING G., 1986** – *Isolation and properties of porcine lecithin : cholesterol acyltransferase.*
Eur. J. Biochem. 54 : 289-294.
- [62] **KUSHI L.H., 1999** – *Vitamin E and heart disease: a case study.*
American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 69, N° 6 : 1322S-1329S
- [63] **LAGROST L., 1994** – *Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: review of in vitro and in vivo studies.*
Biochim. Biophys. Acta; 215: 209-236

- [64] **LAGROST L., DESRUMAUX C., MASSON D. et al., 1998** – *Structure and function of plasma phospholipid transfer protein*
Curr. Opin. lipidol; 9: 203-209.
- [65] **LAVILLE M., AUBOEUF D., KHALFALLAH Y. et al., 1996** – *Acute Regulation by Insulin of Phosphatidylinositol-3-kinase, Rad, Glut 4, and Lipoprotein Lipase mRNA Levels in Human Muscle.*
J Clin Invest, Vol. 98; 1: 43-49.
- [66] **LEONHARDT W., HANEFELD M., MULLER G. et al., 1996** – *Impact of concentrations of glycated hemoglobin, α -tocopherol, copper, and manganese on oxidation of low-density lipoproteins in patients with type I diabetes, type II diabetes and control subjects.*
Clinica Chimica Acta, 254 : 173-186.
- [67] **LEWIS G.F., UFFELMAN K.D., SZETO L.W. et al., 1995** – *Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans.*
J Clin Invest. 95:158–166.
- [68] **LIANG HQ, RYE KA, BARTER PJ., 1996** – *Remodelling of reconstituted high density lipoproteins by lecithin:cholesterol acyltransferase.*
J Lipid Res.;37:1962–1970.
- [69] **LOPES-VIRELLA M.F., KLEIN R.L. et VIRELLA G., 1996** – *Modification of lipoproteins in diabetes.*
Diabetes / Meta Rev, 12:69-90.
- [70] **LUSA S, JAUHAINEN M, METSO J, et al., 1996** – *The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion.*
Biochem J.;313:275–282.
- [71] **MARRA G., COTRONEO P., PITOCOCO D., et al., 2002** – *Early Increase of Oxidative Stress and Reduced Antioxidant Defenses in Patients With Uncomplicated Type I Diabetes A case for gender difference.*
Diabetes Care 25:370-375.
- [72] **MATKOVICS B., VARGA S.Z.I., SZABO L. et WITAS H., 1982** – *The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes.*
Horm Metab Res;14:77-79.

- [73] **MAXWELL S.R., THOMASON H., SANDLER D. et al., 1997** – *Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus.*
Eur J Clin Invest, 27 : 484-490.
- [74] **MAY J. M., 1998** – *Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte.*
Frontiers in Bioscience 3, d1-10.
- [75] **MAZZONE T., FOSTER D. et CHAIT A., 1984** – *In vivo stimulation of low density lipoprotein degradation by insulin.*
Diabetes; 33: 333-338.
- [76] **Mc GOWN E.L. RUSNAK M.G., LEWIS C.M. et TILLOTSON J.A., 1982** – *Tissue ascorbic acid analysis using ferrozine compared with dinitrophenylhydrazine method.*
Anal biochem 119 :59-61.
- [77] **McGARRY J.D., 1994** – *Disordered metabolism in diabetes: have we underemphasized the fat component?*
Journal of Cellular Biochemistry. 55S : 29-38.
- [78] **MERTENS A. et HOLVOET P., 2001** – *Oxidized LDL and HDL : antagonists in atherothrombosis.*
The FASEB Journal;15:2073-2084
- [79] **MOULIN P., 2001** – *Dyslipidémies secondaires.*
Encycl. Méd. Chir., Endocrinologie-nutrition, 10-368-F-10.
- [80] **NATHAN D.M., MEIGS J. et SINGER DE., 1997** – *The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus : how sweet it is ... Or is it?*
Lancet; 350 : S14-S19.
- [81] **PACKARD C.J. et SHEPHERD J., 1983** – *Low density lipoprotein receptor pathway in men: its role in regulating plasma LDL levels.*
Atheroscler Rev; 11:29-63.
- [82] **PARK S. et CHOI S.B., 2002** - *Effects of α -tocopherol supplementation and continuous subcutaneous insulin infusion on oxidative stress in Korean patients with type 2 diabetes.*
American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 75, No. 4, 728-733.

- [83] **PEREZ A., CAIXAS A., CARRERAS G. et al., 1997** – *Lipoprotein compositional abnormalities in type I diabetes: Effect of improved glycaemic control.*
Diabetes Res. Clin. Pract. 36 : 83-90.
- [84] **PRECHL J, SZALECZKY E, PUSZTAI P et al., 1997** – *Effect of clinical duration of diabetes mellitus on various antioxidants in blood.*
Med Sci Monit; 3:167-170.
- [85] **QUIG D.W. et ZILVERSMIT DB., 1990** – *Plasma lipid transfer activities.*
Ann Rev Nutr; 10: 169- 193.
- [86] **QUINN M. T., PARTHASARATHY S., FONG L. G., et STEINBERG D., 1987** – *Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis.*
Proc Natl Acad Sci USA 84, 2995-8.
- [87] **RITTER M.C., BAGDADE J.D., 1994** – *Contribution of glycaemic control, endogenous lipoproteins and cholesteryl ester transfer protein to accelerated cholesteryl ester transfer in IDDM.*
European Journal of Clinical Investigation 24 : 607-614.
- [88] **ROSENSTOCK J., VEGA G. L. et RASKIN P., 1988** – *effect of intensive diabetes treatment on low-density lipoprotein apolipoprotein B kinetics in type I diabetes.*
Diabetes 37 : 393-397.
- [89] **ROUSSET H., VITAL DURAND D. et DUPOND J.-L., 1999** – *Diagnostics difficiles en Médecine Interne.*
2^e ed Maloine. 473-474.
- [90] **RYE KA, CLAY MA, BARTER PJ., 1999** – *Remodeling of high density lipoproteins by plasma factors.*
Atherosclerosis.;145:227–238.
- [91] **SANTINI S.A., MARRA G., GIARDINA B., et al., 1997** – *Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM.*
Diabetes, 46 : 11 ; 1853-1858.

- [92] SCHERNTHANER G., KOSTNER G.M., DIEPLINGER H. *et al.*, 1983 – *Apolipoproteins (A-I, A-II, B), Lp(a) lipoprotein and lecithin: cholesterol acyltransferase activity in diabetes mellitus.*
Atherosclerosis. 49 : 277- 293.
- [93] SEKKAL F. et BOUDIBA A., 1998 – *Le diabète. Aspects épidémiologiques et aspects évolutifs.*
La revue Médico-Pharmaceutique N°4 : pp.19-24.
- [94] SEMENKOVICH C.F. et HEINECKE J.W., 1997–*The Mystery of Diabetes and Atherosclerosis: Time for a New Plot.*
Diabetes, Vol. 46 (3) : 327-334.
- [95] SINCLAIR A.J., GIRLING A.J., GRAY L., LEGUEN C., BARNETT A.H. 1991 – *Disturbed handling of ascorbic acid in diabetic patients with and without microangiopathy during high dose ascorbate supplementation.* Diabetologia; 34:171–5.
- [96] SORENSON R.C., BISGAIER C.L., AVIRAM M. *et al.*, 1999 – *Human serum paraoxonase/arylesterase 's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity.*
Arterioscler Thromb Vasc Biol ; 19: 2214–2225.
- [97] SPARKS J.D. et SPARKS C.E., 1990 – *Insulin modulation of hepatic synthesis and secretion of apolipoprotein B by rat hepatocytes.*
J Biol Chem. 265:8854–8862.
- [98] SPINAS G. A. et LEHMANN R., 2001 – *Diabète sucré : diagnostic, classification et pathogenèse.*
Forum Med Suisse ; 20 : 519-525.
- [99] STAHL W. et SIES H., 1997 – *Antioxidant defense : vitamins E and C and carotenoids.*
Diabetes, Vol. 46, Suppl. 2: S14- S18.
- [100] STANDL E., BALLETSCHOFER B., DAHL B. *et al.*, 1996 – *Predictors of 10-year macrovascular and overall mortality in patients with NIDDM: the Munich General Practitioner Project.*
Diabetologia 39:1540–1545.

- [101] **STEINER G., 1999** – *Risk factors for macrovascular disease in type-2 diabetes. Classic lipid abnormalities.*
Diabetes Care. Vol. 22, Suppl. 3 : C6-C9.
- [102] **STERN M.P., 1995** – *Diabetes and cardiovascular disease. The "common soil" hypothesis.*
Diabetes 44:369–374.
- [103] **STRATTON I.M., ADLER A.I., NEIL A.W., et al., 2000** – *Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study.*
BMJ ; 321: 405-412.
- [104] **SVIRIDOV D., HOANG A., SAWYER W.H. et FIDGE N.H., 2000** – *Identification of a sequence of apolipoprotein A-I associated with the activation of lecithin:cholesterol acyltransferase.*
J Biol Chem ; 275: 19707–19712.
- [105] **SYVÄNNE M. et TASKINEN M.R., 1997** – *Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin-dependent diabetes mellitus.*
Lancet ; 350 : S120-23.
- [106] **SZALECZKY E., PRECHL J., FEHÉR J., SOMOGYI A., 1999** – *Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus – a rational approach.*
Postgrad. Med. J.;75:13-17.
- [107] **SZALECZKY E., PRECHL J., PUSZTAI P. et al., 1997** – *Antioxidant status of patients with well controlled type I diabetes.*
Med Sci Monit;3:163-166.
- [108] **TAGHIBIGLOU C., CARPENTIER A., VAN IDERSTINE S.C. et al. 2000** – *Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model.*
J Biol Chem. 275:8416–8425.
- [109] **TASKINEN et NIKKILA, 1979** – *Lipoprotein lipase activity of adipose tissue and skeletal muscle in insulin deficient human diabetes. Relation to high-density and very low-density lipoproteins and response to treatment.*
Diabetologia ; 17: 351-356.

- [110] **TASKINEN M.-R., 1990** – *Hyperlipidaemia in diabetes.*
Baillière's Clin. Endocrinol. Metab. ; 4 :743-775.
- [111] **TASKINEN M.-R., 1992** – *Quantitative and qualitative lipoprotein abnormalities in diabetes mellitus.*
Diabetes. Vol. 41, Suppl. 2 : 12-17.
- [112] **VALABHJI J., McCOLL A.J., RICHMOND W. et al., 2001** – *Total Antioxidant Status and Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes.*
Diabetes Care ; 24:1608-1613.
- [113] **VERGES B., BRUN J.M., VAILLANT G. et al., 1992** – *Influence of obesity and hypertriglyceridemia on low HDL₂ cholesterol levels and their relationship with prevalence of atherosclerosis in type 2 diabetes.*
Diabetes Metab. ; 18:289-297.
- [114] **VERGES B.L., 1999** – *Dyslipidaemia in diabetes mellitus. Review of the main lipoprotein abnormalities and their consequences on the development of atherogenesis.*
Diabetes & Metabolism, 25, suppl. 3 : 32-40.
- [115] **VIJAYALINGAM S., PARTHIBAN A., SHANMUGASUNDARAM K.R. et MOHAN V., 1996** – *Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus.*
Diabet. Med., 13 : 715-719.
- [116] **VOLLENWEIDER P. et SCHERRER U., 2001** – *Résistance à l'insuline : Nouvelles perspectives.*
Forum Med. Suisse, 18 : 475- 479.
- [117] **VON ECKARDSTEIN A., NOFER J.-R. et ASSMANN G., 2001** – *High Density Lipoproteins and Arteriosclerosis. Role of Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport.*
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 21:13.
- [118] **WEST I., 2000** – *Radicals and oxidative stress in diabetes.*
Diabet Med 17:171–180.
- [119] **WILL J.C. et BYERS T., 1996** – *Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C?*
Nutr Rev 54: 193–202.

- [120] WINOCOUR P.H., DURRINGTON P.N., ISHOLA M., ANDERSON D.C., 1986 – *Lipoprotein abnormalities in insulin-dependent diabetes mellitus.*
Lancet 2:1176-1178.
- [121] WITZUM J.L., MAHONEY F.M., BRONKS M.J. *et al.*, 1982 – *Non enzymatic glycosylation of low density lipoprotein alters its biologic activity.*
Diabetes. 31:283-291.
- [122] YOSHIDA K., HIROKAWA J., TAGAMI S., *et al.*, 1995 – *Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux.*
Diabetologia; 88:201-10.
- [123] ZIEGLER O., GUERCI B., CANDILOROS H., DROUIN P., 1995 –
Lipoprotein (A) and diabetes mellitus.
Diabète & Métabolisme (Paris), 21 : 127-138.
- [124] ZIMMET P., 1999 – *Diabetes epidemiology as a tool to trigger diabetes research and card.*
Diabetologia ; 42 : 499-518.

Annexe 2 : Formulaire (hommes)

Fiche N° : Témoin / DID / DIN

Nom Prénom : Sexe : Masculin

Date de naissance :

Durée du diabète (ans) :

Taille (cm):	Poids (kg) :	IMC (kg/m ²):	T.A. (cm Hg)

- Hypercholestérolémie : ... oui non
- Insuff. rénale chronique : oui non
- Obésité : oui non
- Syndrome néphrotique : ... oui non
- Hypothyroïdie : oui non
- Coronaropathie : oui non
- Tabagisme : oui non
- Alcoolisme : oui non
- Atteinte hépatique : .. oui non
- Hyperlipoprotéinémies iatrogènes : Antihypertenseurs : oui non
- Suivez vous un régime alimentaire ? non , oui quel type de régime
- Avez vous une maladie autre que celles mentionnées ? non oui
quelle est cette maladie ?
- Prenez vous d'autres médicaments ? non oui lesquels

Je soussigné consens à participer à cette étude en remplissant ce formulaire et en étant disponible pour les 5 prélèvements sanguins.

Signature :

Annexe 3 : Protocoles

Glucose (kit Prochima[®])

Le glucose sérique est déterminé par la méthode **enzymatique et colorimétrique** usuelle en présence de la glucose oxydase (GOD). Le glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de peroxydase et de phénol, oxyde un chromogène (le 4-amino-antipyrine) incolore en couleur rouge à structure quinonéimine. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de glucose.

Créatinine par la méthode de Jaffé (kit Biocon[®])

Le dosage de la créatinine sérique sans déprotéinisation est un dosage **cinétique colorimétrique photométrique**. La créatinine forme en solution alcaline un complexe coloré avec l'acide picrique. L'absorbance de ce complexe est proportionnelle à la concentration de la créatinine présente dans l'échantillon.

Urée par la méthode de Berthelot (kit Biocon[®])

Le dosage de l'urée sérique est un dosage **enzymatique et colorimétrique**. L'urée est transformée par l'uréase en carbonate d'ammonium, formant une coloration verte. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'urée dans l'échantillon.

Triglycérides (kit GPO-PAP Biocon[®])

Le dosage des triglycérides est un dosage **enzymatique et colorimétrique**. Les triglycérides sont hydrolysés par des lipases. Le complexe coloré représenté par la quinonéimine est formé à partir du peroxyde d'hydrogène, de l'amino-4-antipyrine et du parachlorophénol grâce à l'action catalytique de la peroxydase.

Cholestérol total (kit CHOD-PAP Biocon[®])

Le dosage du cholestérol total est un dosage **enzymatique et colorimétrique**. Les esters de cholestérol sont hydrolysés par l'enzyme cholestérol-estérase en cholestérol et acides gras. Ce cholestérol est oxydé grâce à l'enzyme cholestérol-oxydase en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence du amino-4-phénazone et du phénol forme la quinonéimine grâce à l'action catalytique de la peroxydase.

Phospholipides (kit PAP 150 bioMérieux®)

Les phospholipides sériques sont déterminés par méthode **enzymatique et colorimétrique**. Les phospholipides (lécithine, lysolécithine et sphingomyéline) sont hydrolysés par la phospholipase D. La choline libérée est oxydée par la choline oxydase en bêtaïne et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, grâce à l'action catalytique de la peroxydase, oxyde le phénol et l' amino-4-antipyrine en quinonéimine (réaction de Trinder).

Détermination des acides gras libres ou AGNE (kit ACS-ACOD Wako®)

Le dosage des acides gras non estérifiés ou libres est un dosage **enzymatique colorimétrique**. Les AGNE sont liés sous forme d'acylation à la coenzyme A (CoA) en présence d'acyl-CoA-synthétase (ACS). L'acyl-CoA ainsi produit est oxydé par addition d'acyl-CoA-oxydase (ACOD) avec génération de peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de peroxydase (POD) permet la condensation oxydative du 3-méthyl-N-éthyl-N-(β -hydroxyéthyl)-anilide (MEHA) avec la 4-aminoantipyrine pour former un produit de couleur pourpre. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration des AGNE dans l'échantillon.

Apolipoprotéine AI (Apo AI) (kit Human®)

Le dosage sérique de l'Apo AI est effectué par l'**immuno-essai turbidimétrique**. Les antigènes apo AI du sérum causent une agglutination immunologique avec les anticorps anti-apo AI dans le réactif. L'étendue de l'agglutination est proportionnelle à la concentration d'apo AI dans l'échantillon et peut être mesurée par turbidimétrie.

Apolipoprotéine B (Apo B) (kit Human®)

Le dosage sérique de l'Apo B est effectué par l'**immuno-essai turbidimétrique**. Les antigènes Apo B du sérum causent une agglutination immunologique avec les anticorps anti-Apo B dans le réactif. L'étendue de l'agglutination est proportionnelle à la concentration d'Apo B dans l'échantillon et peut être mesurée par turbidimétrie.

Lipoprotéine (a) (Lp(a) (kit Human®)

Le dosage sérique de la Lp(a) est effectué par **test turbidimétrique**. La Lp(a) du sérum causent une agglutination avec les anticorps anti-Lp(a) qui couvrent les particules de latex. L'étendue de l'agglutination est proportionnelle à la concentration de la Lp(a) dans l'échantillon et peut être mesurée par turbidimétrie.

Détermination de l'activité de la LCAT

L'activité de la LCAT est déterminée par conversion du cholestérol non estérifié (^3H) en cholestérol estérifié (^3H) selon la méthode de **GLOMSET et WRIGHT (1964)** modifiée par **KNIPPING (1986)**. Pour chaque détermination, 88 nM de cholestérol libre de liposomes, 200 nCi ^3H -cholestérol et 40 mg d'albumine sont mélangés et le tampon d'incubation est ajouté afin d'obtenir un volume final de 1 ml. Ce mélange est préincubé pendant une heure à 37°C avant d'ajouter 100 μl de sérum (source d'enzyme) et 10 μl de mercaptoéthanol (Merck). La réaction est stoppée par addition de 20 volumes de chloroforme:méthanol (2:1, vol:vol). Après 2 h, le mélange est filtré et le précipité est extrait 3 fois avec le mélange chloroforme:méthanol (2:1, vol:vol) et déshydraté 3 fois avec 3 ml d'éthanol absolu (Prolabo, Paris, France). La phase lipidique est évaporée jusqu'à dessiccation et redissoute dans 200 μl de CHCl_3 . 50 μl sont appliqués sur des plaques Kieselgel H60 (Merck). Les lipides sont séparés avec un mélange éther de pétrole: diéthyl éther: acide acétique (60:30:1, vol/vol/vol) et visualisés après exposition aux vapeurs d'iode. Après évaporation de l'iode, les zones contenant du cholestérol non estérifié et des cholestéryl esters sont grattées et mises dans des fioles de contenant un liquide de scintillation (Ready soly HP/b, Beckman).

Le comptage de la radioactivité est déterminé grâce au compteur de scintillation Kontron (Strasbourg, France). L'activité d'estérification du cholestérol est exprimée en $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

Dosage de l'acide ascorbique

Le sérum est dilué au 1/2 (v/v) avec une solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% et centrifugé pendant 15 min à 3000 g.

300 μ l de surnageant sont ajoutés à 750 μ l de la solution de ferrozine (32 mM, PM=492). Les échantillons sont maintenus à température ambiante pendant 15 secondes et la lecture est effectuée à $\lambda=562$ nm.

Le blanc consiste à mettre 300 μ l de TCA 10% avec 750 μ l de ferrozine.

Courbe d'étalonnage :

Solution mère	0,1 mg/ml	0,075 mg/ml	0,05 mg/ml	0,025 mg/ml	0
SM μ l	300 μ l	225 μ l	150 μ l	75 μ l	0
TCA (10%)	0	75 μ l	150 μ l	225 μ l	300 μ l
ferrozine	750 μ l				

Attendre 15 secondes effectuer la lecture à une longueur d'onde $\lambda = 562$ nm contre le blanc

Dosage de la catalase

L'activité de la catalase (CAT EC 1.11.1.6) est mesurée par analyse spectrophotométrique du taux de décomposition de peroxyde d'hydrogène à 240 nm (AEBI, 1974). L'activité de l'enzyme a été exprimée en U/mg de protéine, où U est défini comme la constante de taux de premier ordre observée pour la dégradation de H₂O₂

Séparation des différentes fractions de lipoprotéines

La séparation des différentes fractions de lipoprotéines est réalisée par précipitation selon BURSTEIN *et al.*, (1970 ; 1989).

- Les agents précipitants diffèrent selon la densité de chaque classe de lipoprotéines.
- Les lipoprotéines de faible densité (VLDL et LDL) sont précipitées par du phosphotungstate (Prolabo, Paris, France) + MgCl₂ (Merck)
- Celles de haute densité (HDL₂ et HDL₃) par du sulfate de dextran (Wt 500 000) (Sigma Chemical Company, St Louis) + MgCl₂.

Remarque : Toutes les centrifugations sont effectuées à 4500 tr/min pendant 30 min à 20°C.

Séparation des LDL et VLDL

- 25 µl d'une solution de phosphotungstate (pH = 7,6) et 100 µl d'une solution de MgCl₂ 2 M sont ajoutés à 2 ml de sérum.
- Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le mélange est centrifugé et le surnageant est séparé du précipité qui contient les VLDL.

Remarque : Cette fraction de lipoprotéine peut apparaître sous forme d'un anneau à la surface du tube.

- Au surnageant sont ajoutés 100 µl de chacune des 2 solutions précédentes.
- Après incubation et centrifugation, le précipité obtenu contient les LDL.

Séparation des HDL₂ et HDL₃

- 80 µl de sulfate de dextran à 5 % et 200 µl de MgCl₂ 2 M sont ajoutés au surnageant.
- Après une nuit d'incubation, le précipité obtenu par centrifugation correspond à la fraction HDL₂.
- Le pH du surnageant voisin de 7,6 est ajusté à 5,4 par du HCl une précipitation immédiate a lieu.
- Après centrifugation, le précipité contenant les HDL₃ est séparé du surnageant qui correspond aux protéines plasmatiques solubles.

Purification des lipoprotéines

Pour minimiser la contamination par les protéines plasmatiques, les 4 précipités sont purifiés.

Les précipités I et II contenant les VLDL et les LDL + HDL₁ sont solubilisés dans une solution de solubilisation (citrate trisodique, NaCl 0,01 M) ; puis leur sont ajoutés 750 µl de tampon tris salin (NaCl 0,15 M, Tris 0,05 M, EDTA Na₂ 0,1 %, pH 7,6). Ils sont ensuite précipités avec 30 µl de sulfate de dextran 0,05 % et 37 µl de MgCl₂ 0,05 M.

Après incubation et centrifugation, les précipités sont dissous dans 49 µl d'une solution d'oxalate de potassium 0,5 M (Prolabo, Paris, France). On centrifuge à nouveau pour obtenir des surnageants qui correspondent aux fractions VLDL et LDL + HDL₁ purifiées.

Le précipité III qui contient les HDL₂ est dissout dans la solution de solubilisation. On ajoute 940 µl de tampon tris salin. Ils sont reprécipité par addition de 49 µl de MgCl₂ 2 M. Après centrifugation, le précipité est solubilisé dans 15 µl d'oxalate de potassium 0,5 M et le surnageant contenant les HDL₂ est obtenu par une deuxième centrifugation.

Le précipité IV qui contient les HDL₃ est solubilisé dans la solution de solubilisation. On ajoute 49 µl d'oxalate de potassium 1 M, puis le pH est ajusté à 9,5 par du NaOH 0,1 N. Le surnageant obtenu après centrifugation correspond à la fraction HDL₃.

Remarque : Les centrifugations sont effectuées à la vitesse de 4 000 tours / min pendant 30 min à 20°C. Elles sont toutes précédées d'une incubation de 30 min à température ambiante.

Annexe 4

Concentrations sériques en cholestérol total, HDL-cholestérol, LDL-cholestérol, triglycérides et en AGNE chez les hommes diabétiques comparés aux témoins.

Paramètres	Témoins N=20	DIN N=6	DID N=6
Cholestérol total (mmol.l ⁻¹)	5,3 ± 0,4	4,7 ± 0,5	3,4 ± 0,7 [§]
LDL-Cholestérol (mmol.l ⁻¹)	2,9 ± 0,2	2,6 ± 0,5	1,6 ± 0,1 [§]
HDL-Cholestérol (mmol.l ⁻¹)	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,6 ± 0,3
Triglycérides (mmol.l ⁻¹)	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,5
AGNE (mEq.l ⁻¹)	0,98 ± 0,18	0,53 ± 0,24	0,80 ± 0,46

* P<0,05 : DIN vs témoins ; § P<0,05 : DID vs témoins ; # P<0,05 DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant DID : diabète insulino-dépendant

Concentrations sériques en cholestérol total, HDL-cholestérol, LDL-cholestérol, triglycérides et en AGNE chez les femmes diabétiques comparées aux témoins.

Paramètres	Témoins N=20	DIN N=6	DID N=6
Cholestérol total (mmol.l ⁻¹)	5,0 ± 0,4	3,4 ± 0,4 [*]	4,7 ± 0,4
LDL-Cholestérol (mmol.l ⁻¹)	3,1 ± 0,1	2,3 ± 0,4 [*]	2,3 ± 0,5 [§]
HDL-Cholestérol (mmol.l ⁻¹)	1,3 ± 0,5	1,3 ± 0,6	2,2 ± 0,3
Triglycérides (mmol.l ⁻¹)	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,3	1,1 ± 0,2
AGNE (mEq.l ⁻¹)	1,01 ± 0,20	0,55 ± 0,36	0,82 ± 0,21

* P<0,05 : DIN vs témoins ; § P<0,05 : DID vs témoins ; # P<0,05 DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant DID : diabète insulino-dépendant

Annexe 5

Teneurs sériques en apo A-I, apo B₁₀₀ et en Lp(a) chez les populations diabétiques et les témoins de sexe masculin.

Paramètres	Témoins N=20	DIN N=6	DID N=6
Apo A-I (g.l ⁻¹)	1,17 ± 0,10	1,60 ± 0,09*	1,46 ± 0,06§
Apo B ₁₀₀ (g.l ⁻¹)	0,92 ± 0,13	0,98 ± 0,10	0,65 ± 0,06§
Lp(a) (mg.dl ⁻¹)	1,62 ± 0,21	1,46 ± 0,15	1,40 ± 0,19

* P<0,05 : DIN vs témoins ; § P<0,05 : DID vs témoins ; # P<0,05 DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant **DID** : diabète insulino-dépendant

Teneurs sériques en apo A-I, apo B₁₀₀ et en Lp(a) chez les populations diabétiques et les témoins de sexe féminin.

Paramètres	Témoins N=20	DIN N=6	DID N=6
Apo A-I (g.l ⁻¹)	1,30 ± 0,25	1,96 ± 0,28*	2,20 ± 0,21§#
Apo B ₁₀₀ (g.l ⁻¹)	0,91 ± 0,10	0,70 ± 0,08*	0,64 ± 0,10§
Lp(a) (mg.dl ⁻¹)	1,92 ± 0,33	1,70 ± 0,22	1,53 ± 0,31

* P<0,05 : DIN vs témoins ; § P<0,05 : DID vs témoins ; # P<0,05 DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant **DID** : diabète insulino-dépendant

Annexe 6

Teneurs sériques en phospholipides des HDL et activité de la lécithine cholestérol acyltransférase chez les populations diabétiques et les témoins de sexe masculin.

Paramètres	Témoins N=20	DIN N=6	DID N=6
HDL ₃ (mmol.l ⁻¹ sérum)	1,20 ± 0,10	1,59 ± 0,16*	1,40 ± 0,11
Activité LCAT (nmol.ml ⁻¹ .h ⁻¹)	67,23 ± 5,73	62,40 ± 4,25	87,22 ± 6,25§#

* P<0,05 : DIN vs témoins ; § P<0,05 : DID vs témoins ; # P<0,05 DIN vs DID.

DIN : diabète insulino­nécessitant **DID** : diabète insulino­dépendant

Teneurs sériques en phospholipides des HDL et activité de la lécithine cholestérol acyltransférase chez les populations diabétiques et les témoins de sexe féminin.

Paramètres	Témoins N=20	DIN N=6	DID N=6
HDL ₃ (mmol.l ⁻¹ sérum)	1,47 ± 0,24	1,12 ± 0,13	1,75 ± 0,15#
Activité LCAT (nmol.ml ⁻¹ .h ⁻¹)	62,15 ± 8,76	68,33 ± 4,66	82,56 ± 5,89§#

* P<0,05 : DIN vs témoins ; § P<0,05 : DID vs témoins ; # P<0,05 DIN vs DID.

DIN : diabète insulino­nécessitant **DID** : diabète insulino­dépendant

Annexe 7

Teneurs sériques en ascorbate et activité enzymatique de la catalase chez les populations diabétiques et les témoins de sexe masculin.

Paramètres	Témoins N=20	DIN N=6	DID N=6
Ascorbate (mg.l ⁻¹)	60,52 ± 12,22	81,0 ± 23,4	108,6 ± 25,4§
Activité CAT (KU/g Hb)	1286,4 ± 84,6	1090,2 ± 112,2	960,5 ± 51,8§

* $P < 0,05$, DIN vs témoins ; § $P < 0,05$, DID vs témoins ; # $P < 0,05$, DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant

DID : diabète insulindépendant

Teneurs sériques en ascorbate et activité enzymatique de la catalase (CAT) chez populations diabétiques et les témoins de sexe féminin.

Paramètres	Témoins N=20	DIN N=6	DID N=6
Ascorbate (mg.l ⁻¹)	74,6 ± 23,4	100,0 ± 36,1*	111,0 ± 25,4§
Activité CAT (KU/g Hb)	1179,6 ± 86,4	1262,1 ± 95,9	920,7 ± 40,3§#

* $P < 0,05$, DIN vs témoins ; § $P < 0,05$, DID vs témoins ; # $P < 0,05$, DIN vs DID.

DIN : diabète insulino-nécessitant

DID : diabète insulindépendant.