



HAL
open science

La paraoxonase sérique humaine : dosage et localisation dans les lipoprotéines

Laurence Davit-Delanoue

► **To cite this version:**

Laurence Davit-Delanoue. La paraoxonase sérique humaine : dosage et localisation dans les lipoprotéines. Sciences pharmaceutiques. 1999. dumas-01629296

HAL Id: dumas-01629296

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01629296>

Submitted on 6 Nov 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 1999

Numéro d'ordre

7007

LA PARAOXONASE SERIQUE HUMAINE :
DOSAGE ET LOCALISATION DANS LES LIPOPROTEINES

MEMOIRE

DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret n°88-996 du 19 octobre 1988,
tient lieu de

THESE

présentée à Grenoble
et soutenue publiquement le 25 mars 1999
pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Laurence DAVIT-DELANOUE

[Données à caractère personnel]

JURY

Président : Madame le Professeur **A.M. ROUSSEL**

Membres : Monsieur le Professeur **S. HALIMI**

Madame le Docteur **M. J. STASIA**

Monsieur le Maître de Conférence **F. LAPORTE**



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Année 1999 Numéro d'ordre

**LA PARAOXONASE SERIQUE HUMAINE :
DOSAGE ET LOCALISATION DANS LES LIPOPROTEINES**

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE
Conformément aux dispositions du décret n°88-996 du 19 octobre 1988,
tient lieu de

THESE

présentée à Grenoble
et soutenue publiquement le 25 mars 1999
pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Laurence DAVIT-DELANOUE

[Données à caractère personnel]

JURY

Président : Madame le Professeur **A.M. ROUSSEL**

Membres : Monsieur le Professeur **S. HALIMI**

Madame le Docteur **M. J. STASIA**

Monsieur le Maître de Conférence **F. LAPORTE**

*A mes parents, que je remercie pour leur soutien leur patience apportés
tout au long de mes études.*

*A mon mari, Franck,
A mes enfants, Arthur et Victor,*

*A toute ma famille,
A mes amis d'ici et d'ailleurs.*

A Madame le Professeur A.M. ROUSSEL

Qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

A Monsieur le Professeur S. HALIMI

Qui a témoigné de l'intérêt de ce travail en acceptant de siéger dans ce jury.

Qu'il soit assuré de ma gratitude et de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur M.J. STASIA

Qui a accepté d'examiner ce travail et d'être membre du jury.

En témoignage de mes profonds remerciements.

A Monsieur le Maître de Conférence F. LAPORTE

Qui a été l'instigateur de ce mémoire.

Je lui suis reconnaissante de m'avoir dirigée dans ce travail et de m'avoir fait bénéficier de ses compétences. J'ai pu apprécier son enthousiasme, sa disponibilité et sa gentillesse. Je l'en remercie.

Je remercie également

Madame E. L. AVEYNIER.

Je lui suis très reconnaissante de m'avoir accordée une collaboration amicale et chaleureuse, une constante disponibilité et de précieux conseils. Je la remercie pour son écoute attentive et son soutien permanent.

Madame le Docteur M.M FOULON

pour ces précieux conseils.

Monsieur le Professeur E. CHAMBAZ

de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Le **personnel du Laboratoire de Biochimie A** et tout particulièrement l'unité fonctionnelle lipides. Je tiens à leur exprimer ici toute mon amitié.

INTRODUCTION

La paraoxonase est connue depuis longtemps en toxicologie comme enzyme détoxifiante des composants organophosphorés.

Plus récemment, le rôle de la paraoxonase humaine dans le métabolisme des lipides et plus particulièrement des phospholipides, a été rapporté par Mackness et coll. au premier congrès de Dubrovnik, en 1989. La paraoxonase, présente dans les lipoprotéines de haute densité (HDL), évite l'accumulation des hydroperoxydes de phospholipides au sein des lipoprotéines de faible densité (LDL) (Mackness et coll. 1991a). En effet, les phospholipides oxydés au sein des LDL pourraient être transférés sur les HDL, et subir l'attaque de la paraoxonase pour les dégrader en composés inactifs (Watson et coll. 1995). Un rôle protecteur contre la dégradation oxydative des lipoprotéines a donc été attribuée à cette enzyme.

Il existe de nombreux arguments démontrant que les lipoprotéines oxydées jouent un rôle important dans la pathogénie de l'athérosclérose. Il est maintenant admis que l'oxydation des lipoprotéines LDL est impliquée dans les processus de formation de la plaque athéromateuse (Steinberg et coll. 1989).

Aussi, en protégeant les lipoprotéines de l'oxydation, la paraoxonase pourrait être un facteur potentiellement déterminant dans la résistance au développement de l'athérosclérose.

Des équipes ont mis en évidence une baisse de l'activité de la paraoxonase chez des patients où le risque de développer une plaque d'athérome est important. L'influence des polymorphismes de l'enzyme sur les maladies coronariennes a également été particulièrement étudiée.

Si l'on considère le rôle protecteur potentiel de l'enzyme dans l'athérosclérose, l'activité sérique de la paraoxonase pourrait devenir un marqueur biochimique supplémentaire pour évaluer le risque athéromateux.

Notre travail a consisté dans un premier temps à optimiser les conditions opératoires du dosage de cette enzyme. Le substrat physiologique de l'enzyme étant inconnu, nous avons étudié les activités enzymatiques en utilisant deux substrats : le paraoxon et le phénylacétate.

Enfin, nous avons tenté d'identifier dans quelles sous-fractions HDL l'activité de la paraoxonase était localisée.

RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

I- La paraoxonase sérique humaine

A- Paraoxonase en toxicologie

L'intérêt initialement porté à la paraoxonase (PON) fut dans le domaine de la toxicologie. En effet, l'enzyme joue un rôle important dans la détoxification de composants organophosphorés (OPS), lesquels sont largement utilisés comme insecticides ou gaz neurotoxiques. Chez les mammifères, la PON hydrolyse les oxons qui échappent à la détoxification hépatique, avant même qu'ils puissent exercer leurs effets toxiques (Brealey et coll. 1980). Un exemple typique est celui du paraoxon (figure n°1). Ce composant organophosphoré est un puissant inhibiteur des cholinestérases et conduit donc à l'accumulation du neurotransmetteur acétylcholine aux jonctions synaptiques avec comme conséquence une forte stimulation des neurones. Le paraoxon est généré par désulfuration oxydative du parathion, insecticide relativement peu toxique et largement utilisé en agriculture. Le paraoxon formé, fortement neurotoxique, sera détruit par la PON. Les insectes, qui n'ont pas de PON, sont donc la cible de ces poisons organophosphorés.

Pour cette raison, la PON est considérée comme une enzyme hautement détoxifiante, importante par son action sur les insecticides et les gaz neurotoxiques tels que le sarin, le soman et le tabun, dont le mécanisme biochimique d'action est similaire à celui du paraoxon.

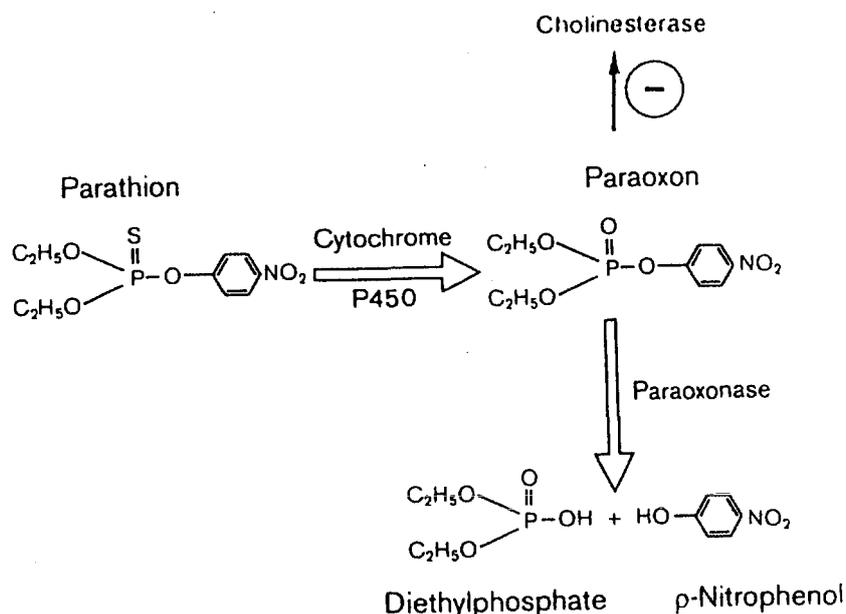


Figure 1. Hydrolyse enzymatique du paraoxon.

B- Définition, Classification

La paraoxonase (PON), aussi nommée aryldialkylphosphatase (E.C.3.1.8.1, mais autrefois E.C.3.1.1.2) est une estérase calcium dépendante. Selon la méthode de classification des estérases d'Aldridge (1953), la paraoxonase est une estérase A. Cette méthode est basée sur les interactions avec les composants organophosphorés (OPS) anticholinestérasiques mondialement utilisés comme insecticides.

	Estérases A hydrolysent les carbamates et les esters carboxylés aromatiques	Estérases B
Exemples	Paraoxonases Diisopropylfluorophosphates DFPases	Carboxylestérases Cholinestérases
Action sur les OPS	Hydrolysent les OPS : détoxification	Sont inhibés par les OPS

Tableau 1. Classification des estérases

La dépendance de la PON vis à vis du calcium la distingue des autres estérases A, lesquelles nécessitent du cobalt, du manganèse ou du magnésium pour leur activité.

La paraoxonase est ainsi nommée puisque le paraoxon est le substrat communément utilisé pour mesurer son activité. Cependant la même enzyme (estérase A, estérase aromatique, arylestérase, aryldialkylphosphatase, PON, E.C.3.1.8.1) est aussi capable d'hydrolyser d'autres substrats tels que les arylesters des acides carboxyliques (phénylacétate). La spécificité de la paraoxonase pour les substrats tissulaires et sériques endogènes n'étant pas déterminée, ce sont des substrats synthétiques qui sont utilisés pour suivre l'activité enzymatique. Il est de convention commune d'employer le terme «d'activité de la paraoxonase » si le substrat est le paraoxon et «d'activité de l'arylestérase » si le phénylacétate est le substrat (Kuo et La Du BN. 1998).

C- Propriétés de la paraoxonase

1. Structure

Des études d'hybridation *in situ* ont montré que le gène de la PON1 humaine est situé sur le bras long du chromosome 7 en position q21-q22 (Humbert et coll. 1993). L'ADN de la PON 1 code pour une protéine de 355 acides aminés. Furlong et coll. (1991) ont montré que la protéine mature, conserve sa séquence signal hydrophobe à l'exception du résidu méthionine N-terminal (Hasset et coll. 1991). Une conséquence de cette délétion est que, selon les auteurs, deux systèmes de numération des acides aminés de l'enzyme circulante, différant d'une unité, peuvent être utilisés selon que le résidu méthionine est ou non compté. Dans un souci de clarté, nous avons dans cette thèse uniquement utilisé le système numérique qui inclut la méthionine initiale. Il en résulte un désaccord entre le texte et les références quand les auteurs utilisant l'autre système sont cités.

La paraoxonase sérique humaine est une glycoprotéine monomérique de 43-45 kDa. Elle contient au moins trois chaînes carbohydrates qui représentent 15,8% de son poids (Gan et coll. 1991). La présence de trois résidus cystéines est d'intérêt particulier puisque ce fait a servi de support à l'hypothèse que la PON soit une cystéine estérase. Elle utiliserait une cystéine comme composant nucléophile dans son centre catalytique, plutôt que le résidu serine habituellement rencontré avec les estérases. Deux équipes (Furlong et coll. 1991 ; Kelso et coll. 1994) ont trouvé, par électrophorèse en gel de polyacrylamide de SDS, deux bandes correspondant à la paraoxonase. Ces isoformes (même activité enzymatique) correspondent à deux états d'oxydation, lesquels diffèrent par la présence ou l'absence de pont disulfure intramoléculaire entre la cystéine 42 et la cystéine 284 (Kelso et coll. 1994). Ces résultats divergent de ceux de Sorenson et coll. (1995) pour qui la PON active hautement purifiée contient une seule liaison disulfure intramoléculaire entre Cys₄₂ et Cys₃₅₃ avec une seule cystéine libre en position 284.

L'activité de la paraoxonase est inhibée par les agents bloquant les groupements sulfhydryls libres. Cette inhibition est réversible et peut être levée par addition de β -mercaptoéthanol laissant suggérer que le site cystéine libre fait partie du site actif. Cependant la

mutagénèse dirigée contre la Cys₂₈₄ libre, indique que cette cystéine n'est pas requise pour l'activité enzymatique (Sorenson et coll. 1995). L'inhibition de la PON induite par les agents bloquants des groupements sulfhydryls résulteraient d'un encombrement stérique et non du blocage du site actif. Leurs résultats suggèrent donc que la cystéine soit structurellement requise (pour l'attachement des substrats) mais probablement pas impliquée directement dans l'hydrolyse du substrat. La structure du site actif n'étant pas déterminée, nous ne savons pas si la PON a une triade catalytique d'acides aminés similaire à celle communément rencontrée avec les autres hydrolases.

2. Cinétique et importance du calcium

Des études détaillées de l'hydrolyse du paraoxon par la PON1 purifiée humaine à pH 10,5 indiquent une cinétique d'ordre un. Le paranitrophénol serait rejeté en premier suivi du diéthylphosphate (Vitarius et Sultatos. 1994).

Les mêmes auteurs ont montré que l'ion calcique joue deux rôles dans le mécanisme catalytique (Vitarius et Sultatos. 1995). D'une part, le calcium est nécessaire pour maintenir un site actif : soit en participant directement dans la réaction catalytique, soit en maintenant sa conformation. D'autre part, le calcium facilite l'élimination du diéthyl phosphate du site actif, probablement en polarisant la double liaison P=O du paraoxon, rendant le phosphore susceptible à l'attaque nucléophile.

Le calcium occupe donc une place majeure pour la stabilité de la PON et pour son activité enzymatique. La PON est sans doute une enzyme extra-cellulaire dont la stabilité thermique et la résistance à la dégradation protéolytique dépendent de sa liaison au calcium. Kuo et La Du BN (1998) ont montré que la PON a deux sites de liaison au calcium. Le site de haute affinité ($K_{d1}=3,6 \cdot 10^{-7}M$) est essentiel pour maintenir l'activité hydrolytique tandis que le site de faible affinité ($K_{d2}=6,6 \cdot 10^{-6}M$) est requis pour l'activité catalytique. Pour le site de haute affinité, la suppression du calcium (par des chelateurs tels que l'EDTA) entraîne une inactivation irréversible de l'enzyme alors que l'attachement enzyme-calcium est réversible pour le site de faible affinité.

3. Localisation

Chez les mammifères, la paraoxonase est largement distribuée parmi les tissus tels que le foie, le rein, les intestins et aussi le sérum où elle est associée avec les HDL. L'activité la plus élevée est retrouvée dans le foie et le sang (Aldridge 1953).

Les autres êtres vivants, c'est-à-dire les oiseaux, les poissons, les insectes ont une activité faible ou nulle.

4. Variations physiologiques

L'activité de la paraoxonase est présente chez les nouveaux nés et les prématurés à des taux égaux de moitié à ceux retrouvés chez l'adulte (Ecobichon et coll. 1973). Les taux de l'adulte sont atteints approximativement un an après la naissance et restent stables toute la vie (Ecobichon et coll. 1973 ; Mueller et coll. 1983 ; Playfer et coll. 1976). Aucune différence d'activité entre les sexes n'a été rapportée bien que la paraoxonase soit associée avec les HDL et que les concentrations de HDL circulantes soient plus élevées chez les femmes que chez les hommes.

5. Synthèse et sécrétion

La paraoxonase est connue pour être synthétisée et sécrétée par le foie. Cependant, aucun fait ne peut confirmer ces affirmations. Les ARNm codant pour la PON ont été recherchés dans le cerveau, le placenta, le pancréas et le poumon humain (recherche par Gen Bank). Ces derniers ont 70 % d'homologie avec la PON alors que ceux identifiés sur foie fœtal, rate et foie d'adulte ont 100 % d'homologie. Par conséquent, tous ces tissus pourraient être une source de la PON sérique. Des analyses par Northern blot de différents tissus humain et de lapin indiquent que l'ARNm de la PON est présent seulement dans le foie (Hasset et coll. 1991). Cependant, utilisant une réaction de RT-PCR (PCR avec reverse transcriptase) plus sensible, Primo Parma et coll. (1996) ont montré que l'ARNm est présent chez la souris au niveau du foie, du poumon, du cœur, du cerveau, de l'intestin grêle et du rein. Les données ci-dessus indiquent donc que les mécanismes de synthèse et de régulation de la PON ne sont pas encore élucidés.

D- Association de la paraoxonase avec les lipoprotéines de haute densité HDL

L'activité PON1 a été découverte en premier dans des immunoprécipitations HDL après électrophorèse de sérum humain par Uriel en 1961. En 1985, Mackness et coll. ont montré que la PON restait dans la fraction des HDL après ultracentrifugation de sérum humain. La chromatographie d'immunoaffinité a révélé que la PON (identifiée alors comme apolipoprotéine K-45) est présente dans une sous-classe d'HDL contenant trois protéines majeures : la PON, l'apolipoprotéine AI (mais pas l'apolipoprotéine AII) et l'apolipoprotéine J ou clustérine (Blatter-Garin et coll. 1993 ; Kelso et coll. 1994). L'association avec l'apolipoprotéine AI (apo AI) avait déjà été suggérée face à l'extrême difficulté à séparer l'apo AI de la PON. De plus l'absence de l'enzyme dans les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et dans les lipoprotéines de faible densité (LDL) suggère une interaction spécifique de l'enzyme avec l'apolipoprotéine majeure des HDL, l'apo AI. La PON pourrait en fait être étroitement liée à l'apo AI par son domaine hydrophobique N-terminal (Mackness et coll. 1998a).

E- Génétique et modification de l'activité de la paraoxonase sérique humaine

1. Polymorphismes

Dès 1973, Geldmacher-von Mallinckrodt et coll. ont suggéré que l'activité de la PON était liée à un polymorphisme génétique. Cette découverte a été rapidement confirmée par Playfer et coll. (1976). Ce polymorphisme touche une substitution de l'acide aminé en position 192. L'allèle A qui code pour la glutamine est associé à une faible activité vis à vis du paraoxon et l'allèle B qui code pour l'arginine à une forte activité. Cependant l'activité de la paraoxonase montre une large variation avec les différents substrats. Ainsi, bien que l'alloenzyme B soit plus réactive vis à vis de certains substrats tels que le paraoxon, d'autres substrats comme le phénylacétate ne montrent pas de discrimination entre les alloenzymes (Tableau n°2).

Activité de l'alloenzyme B supérieure avec:	Paraoxon
	Méthylparaoxon
	Chlorthion oxon
	EPN oxon
	Armin
Activité des alloenzymes similaire avec :	Phénylacétate
	Chlorpyrifos oxon
	2-Naphtylacétate
Activité de l'alloenzyme A inférieure avec:	Diazoxon
	Sarin
	Soman
	Phospholipides hydroperoxydes ?

Tableau 2. Polymorphisme et activité de la PON en fonction du substrat (Mackness et coll. 1998a)

Il faut noter que les deux phénotypes peuvent aussi être mis en évidence par leur réponse respective au chlorure de sodium (NaCl) (Eckerson et coll. 1983). L'hydrolyse du paraoxon par l'isoenzyme de haute activité est stimulée par 1 M de NaCl alors que celle par l'isoenzyme de faible activité ne l'est pas. L'hydrolyse du phénylacétate est quand à elle, la même pour les deux isoenzymes. Le ratio *hydrolyse du paraoxon stimulé par NaCl / hydrolyse du phénylacétate* est donc utilisé communément pour assigner un phénotype.

Rappelons également qu'il existe quelques divergences dans la nomenclature du polymorphisme génétique. Adkins et coll. (1993) utilisent A pour désigner le génotype de faible activité (Glu en 192) et B pour celui de forte activité (Arg en 192) alors que Humbert et coll. (1993) emploient 192 Q (faible activité) et R 192 (forte activité).

Le second polymorphisme décrit du gène de la PON 1 humaine affecte l'acide aminé 55 avec une substitution de la leucine (L-allèle) en méthionine (M-allèle). Ce polymorphisme ne semblait pas affecter l'activité de l'enzyme (Humbert et coll. 1993). Cependant, Mackness et coll. (1997a) ont montré que le polymorphisme 55 module l'activité de la paraoxonase. Le génotype LL a une forte activité, le génotype MM une activité faible et le génotype LM une activité intermédiaire. Ce polymorphisme 55 indépendant du polymorphisme 192, serait responsable pour 16 % de la modification d'activité de la PON.

Ainsi les individus homozygotes pour les polymorphismes AA / MM ont une activité vis à vis du paraoxon plus faible et les homozygotes BB / LL une activité plus forte (figure n°2).

2. Répartition des génotypes

2.1-Modes de distribution

La distribution des génotypes n'est pas la même dans les différentes populations à travers le monde.

Dans les populations européennes, la distribution d'activité de la PON s'effectue de façon bimodale avec approximativement une fréquence comparable des allèles de faible activité (A) et forte activité (B). Ces résultats sont en accord avec le modèle d'un seul locus autosomique avec deux allèles.

Par contre, dans les populations africaines, orientales et canadiennes, les distributions d'activité de la paraoxonase sont unimodales avec une valeur médiane supérieure à celle des populations européennes (Geldmacher von Mallinckrodt M. et Diepgen TL. 1987). Une perte du phénotype de faible activité (A) apparaît être responsable de cette distribution unimodale avec une diminution marquée de la fréquence du génotype de faible activité (AA) dans ces populations (Mackness et coll. 1996).

2.2-Fréquence du génotype 192 dans les différentes populations

La fréquence du génotype de la paraoxonase pour le polymorphisme 192 est approximativement dans la population européenne, de 50 % d'homozygotes AA à faible activité, 40 % d'hétérozygotes AB et 10 % d'homozygotes BB à forte activité (Humbert et coll. 1993). En comparaison, dans la population japonaise, le nombre d'homozygotes BB est quatre fois plus élevé et le taux d'homozygotes AA est diminué pour plus de moitié (Odawara et coll. 1997). Une distribution inhabituelle a été retrouvée dans la population inuit du Canada avec 40 % de BB, 42 % de AB et seulement 9 % de AA (Mackness et coll. 1996) (figure n°3).

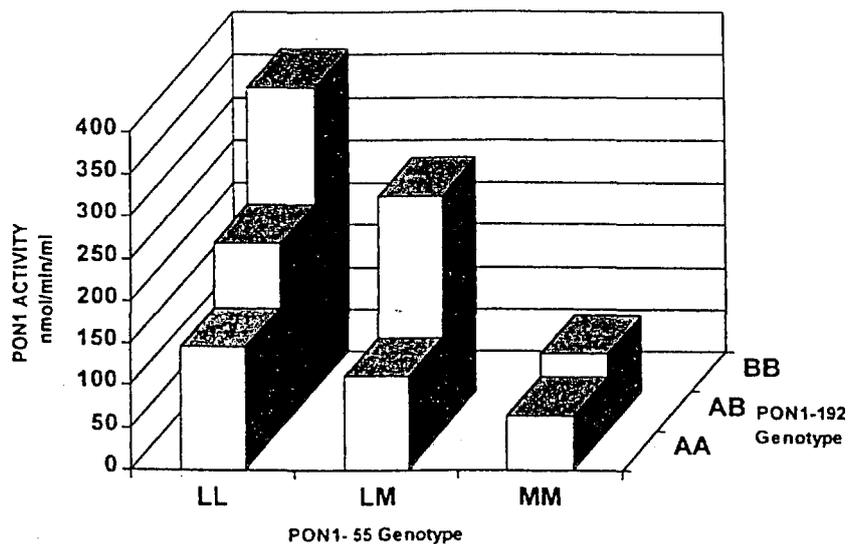


Figure 2. Effets des polymorphismes 55 et 192 de la PON sur l'hydrolyse du paraoxon (Mackness et coll. 1998a)

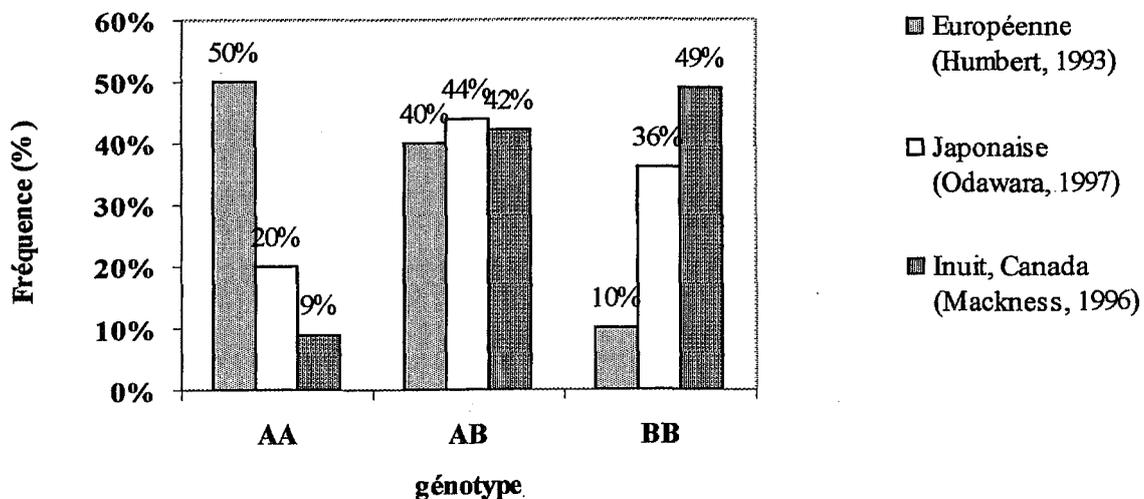


Figure 3. Fréquence du génotype 192 dans les différentes populations.

2.3-Fréquence du génotype 55 dans les différentes populations

De même, selon l'origine des populations, une différence significative existe quant à la distribution de l'allèle pour le polymorphisme 55. Dans la population européenne, les hétérozygotes LM sont fortement majoritaires (Mackness et coll. 1998d). En comparaison, dans la population de Singapour, Sanghera et coll. (1998) notent d'une part, une très nette prédominance d'homozygotes LL dans la population chinoise (93 %), et d'autre part, dans la population indienne, un taux bien inférieur mais toujours majoritaire de LL (65 %) (figure n°4).

2.4-Distribution des génotypes 192 et 55 associés

Par ailleurs, des études montrent qu'il existe un fort déséquilibre de liaison entre les polymorphismes des codons 192 et 55. Comme le montre la figure n°5, l'allèle M est rarement associé à l'allèle B. Les analyses statistiques confirment ce déséquilibre de liaison entre les polymorphismes qui conduit à l'augmentation de la leucine en position 55 (allèle L) et de l'arginine en position 192 (allèle B) (Mackness et coll. 1998d). Des résultats identiques sont rapportés dans une population européenne avec diabète insulino-dépendant (Blatter-Garin et coll. 1997). De même, les résultats de Sanghera et coll. (1998) confirment l'augmentation de l'haplotype BL dans deux populations génétiquement distinctes chinoise (de 56,9 % attendu à 59,1 %) et indienne (de 28,5 % à 35,8 %). Ils rapportent cette distribution non aléatoire à un lien étroit entre l'allèle B du polymorphisme 192 et l'allèle L du polymorphisme 55.

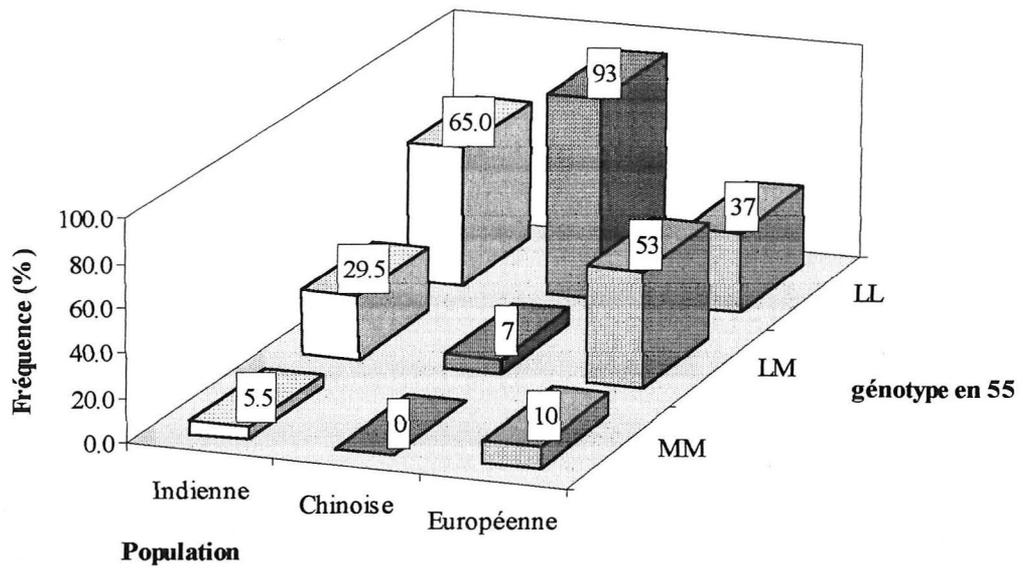


Figure 4. Fréquence du génotype 55 dans les différentes populations (d'après Sanghera et coll 1998 et Mackness et coll. 1998d).

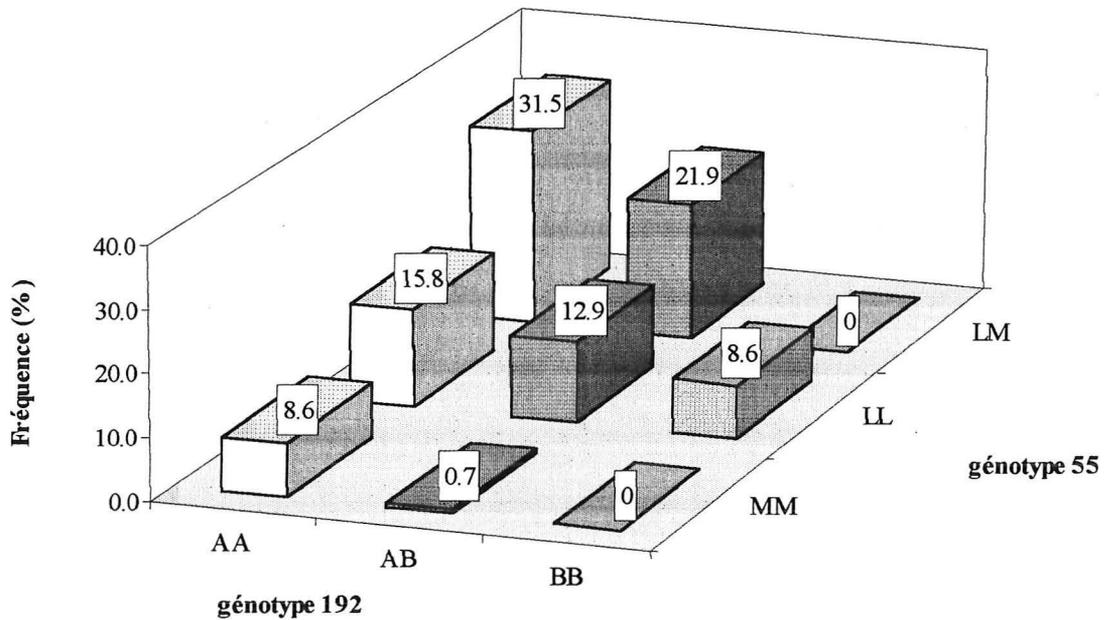


Figure 5. Distribution des génotypes 192 et 55 associés dans la population européenne (d'après Mackness et coll. 1998d).

3. Influence des polymorphismes sur la concentration et l'activité spécifique

Le polymorphisme génétique pourrait aussi affecter la concentration de la PON1. Blatter-Garin et coll. (1994) ont montré, chez des sujets apparemment sains, que les homozygotes BB avaient une concentration en PON plus élevée que les homozygotes AA, tandis que les hétérozygotes avaient une concentration intermédiaire. Plus tard, l'équipe a rapporté cette observation au polymorphisme en position 55 (allèle L) et au fort déséquilibre de liaison entre les allèles L et B (Blatter-Garin et coll. 1997). L'étude, sur des patients diabétiques non insulino-dépendant, montre d'une part, que pour un allèle 55 donné, le polymorphisme 192 n'a pas d'effet sur la concentration en PON et d'autre part, que pour un allèle 192 donné, les porteurs de l'allèle L ont des concentrations sériques de PON significativement supérieures à celles retrouvées chez les sujets MM. Cependant, ces résultats sont en opposition avec ceux de Mackness et coll. (1997a) qui rapportent qu'aucun des polymorphismes n'influence significativement la concentration de la PON.

L'étude de Mackness et coll. (1998d) montre que le polymorphisme 192, le polymorphisme 55 et la concentration en PON sont responsables respectivement pour 46, 16 et 13 % de la modification de l'hydrolyse du paraoxon.

4. Autres éléments génétiques

La famille du gène de la PON comporte au moins trois membres, incluant PON 1, PON 2, et PON 3, lesquels sont situés sur le bras long du chromosome 7 q 21.3-22.1 (Boright et coll. 1998). L'ensemble montre un fort degré d'homologie avec le gène de la PON 1 ce qui pourrait suggérer que les gènes produits ont des fonctions communes. Cependant de nombreux autres facteurs indiquent que les produits des gènes de la PON 1 et de la PON 2 (qui ne sont pas encore identifiés) ont des rôles dans la physiologie humaine différents : par exemple, l'expression tissulaire des produits du gène de la PON 2 est plus ubiquitaire que celle de la PON 1 ; d'autre part, dans la même population génétiquement isolée, une variation génétique du gène de la PON 2 est associée à des modifications des concentrations plasmatiques du cholestérol total et de l'apo AI (Boright et coll. 1998), alors que la variation génétique de la PON 1 est associée à des modifications des concentrations du cholestérol des LDL (CH-LDL) et de l'apolipoprotéine B (Hegele et coll. 1995).

F- Modification de l'activité de la paraoxonase en dehors de l'athérosclérose

1. Influence de l'environnement et du régime alimentaire

Actuellement peu de données existent sur la modification de l'activité de la PON par des facteurs environnementaux ou diététiques.

Cependant, des différences existent dans la population. Par exemple, Blatter-Garin et coll. (1994) rapportent que les concentrations de la protéine et l'activité de la PON contre le substrat hydrophile (phénylacétate), (mais pas contre le substrat plus hydrophobe, le paraoxon) sont significativement différentes entre deux populations caucasiennes saines. Les sérums des patients ont été recueillis soit après un jeûne de 12 heures (Manchester), soit sans jeûne (Genève) : les personnes vivant à Genève semblent avoir une concentration de PON et une activité spécifique inférieure à celle de Manchester. Il est alors possible que le régime alimentaire ou d'autres facteurs environnementaux puissent influencer l'activité de la paraoxonase, peut-être en modifiant l'environnement lipidique dont dépend l'activité de l'enzyme. De plus l'étude de Shih et coll. (1996) sur des souris, rapporte que la production de PON est déterminée par des facteurs génétiques et diététiques (cf p 31).

Nishio et Watanabe (1997) ont montré que les extraits de fumée de cigarettes sont capables d'inhiber l'activité de la PON par une modification des groupements thiols libres de l'enzyme. Cependant cette étude ayant été réalisée sur plasma avec EDTA, la conservation de l'activité PON ne peut être réellement évaluée.

2. Baisse d'activité dans la phase aiguë de la réponse inflammatoire

Van Lenten et coll. (1995) ont montré sur un modèle de lapin que dans certaines conditions telles que la phase aiguë de la réponse inflammatoire, la capacité antioxydante normale des HDL est altérée : les HDL sont converties de particules anti-inflammatoires en pro-inflammatoires. A l'intérieur des HDL, la protéine sérique amyloïde A et la céruloplasmine, protéines de l'inflammation, augmentent, alors que l'apo AI et la PON diminuent. La capacité des HDL à inhiber les effets biologiques des LDL oxydées est donc diminuée et les lipoprotéines oxydées peuvent jouer leur rôle pour combattre l'infection bactérienne durant la phase aiguë de la réponse inflammatoire.

Feigold et coll. (1998) ont confirmé ces résultats en montrant que l'activité de la PON ainsi que les taux d'ARNm de la PON diminuaient durant la phase aiguë de la réponse inflammatoire. Cette diminution de la PON pourrait être un facteur reliant la phase aiguë de la réponse inflammatoire avec l'augmentation de l'athérogénèse.

3. Pathologies diverses

L'équipe de Mackness a trouvé des activités enzymatiques très faibles voir indétectables chez des sujets avec des concentrations basses d'HDL [Fish-Eye disease (Mackness et coll. 1987) ; Tangier (Mackness et coll. 1989)]. Plus tard, James et coll. (1998) ont montré, que les activités enzymatiques et les concentrations en protéine étaient réduites, mais toujours présentes en quantités appréciables, chez les patients génétiquement atteints de déficits en HDL (Tangier, A-I-Pisa, A-I-Helsinki, A-I-Milano). L'analyse des activités spécifiques révèlent qu'elles sont similaires entre patients et contrôles, indiquant que la réduction d'activité est due à une perte de la protéine PON plus qu'à une inactivation de l'enzyme. Ces modulations d'activité sont retrouvées avec les 2 substrats testés le phénylacétate et le paraoxon. Malgré l'absence d'HDL détectables chez les sujets Tangier ou A-I Pisa, il n'y a pas d'association de la paraoxonase avec les VLDL ou LDL.

Une activité paraoxonase sérique plus élevée a été retrouvée chez des enfants avec sténose du pylore. Cette augmentation persiste jusqu'à une semaine après l'opération quand la nutrition entérale a été reprise (Szafran et coll. 1979).

Omura (1980) rapporte une baisse significative de l'activité PON chez 232 japonais ayant des maladies chroniques diverses. Paragh (1998) a confirmé cette baisse de l'activité chez des insuffisants rénaux chroniques. L'équipe a de plus montré que cette diminution observée était plus importante chez ces insuffisants rénaux chroniques que chez des patients atteints d'hyperlipidémie primaire. Cette diminution de l'activité n'est ni à relier à la distribution des phénotypes, ni aux taux inférieurs d'apo A1 et d'HDL.

Maury et coll. (1984) a aussi montré que l'amyloïdose systémique était associée à une activité PON inférieure.

II- Pourquoi doser la paraoxonase ?

Bien que le substrat physiologique de la paraoxonase soit inconnu, un rôle protecteur contre la dégradation oxydative des lipoprotéines a été attribué à cette enzyme. Le dosage de la paraoxonase pourrait donc avoir toute son importance si l'on considère l'enzyme comme un facteur potentiellement déterminant de l'athérosclérose.

Après quelques rappels sur le processus athérogène, nous verrons quelle pourrait être la place de la PON et des composants associés aux HDL dans ce processus. Enfin, nous présenterons les résultats des travaux sur les relations entre paraoxonase et maladies cardiovasculaires.

A- Rappel sur le processus athérogène

Il existe de nombreux arguments démontrant que les lipoprotéines oxydées jouent un rôle important dans la pathogénie de l'athérosclérose. Il est maintenant admis que l'oxydation des lipoprotéines LDL est impliquée dans les processus de formation de la plaque athéromateuse (Steinberg et coll. 1989).

1. Importance des LDL oxydées

Le premier événement dans le développement des stries graisseuses est le transport des LDL à l'intérieur des vaisseaux artériels. Les cellules des vaisseaux artériels peuvent produire des espèces oxydantes - via différents mécanismes (cyclooxygénase, lipoxygénase, cytochrome P450, respiration mitochondriale, fer libre) - initiant l'oxydation des LDL.

Les LDL oxydées sont capables d'induire la sécrétion de substances chimiotactiques pour les monocytes circulants et d'inhiber la mobilité des macrophages (Berliner et coll. 1995). Au sein des LDL, la modification de l'apo B par les produits terminaux de l'oxydation lipidique ou par oxydation directe des aminoacides constitutifs, empêche leur reconnaissance par le récepteur apo B / E spécifique des LDL natives et permet leur captation par des récepteurs « éboueurs » plus communément appelés « scavenger » situés en particulier sur les macrophages. Ces récepteurs n'étant pas régulés par la quantité de cholestérol intracellulaire, cette captation entraîne une accumulation de cholestérol estérifié dans les macrophages se transformant en

cellules spumeuses qui sont à l'origine de la formation de la plaque d'athérome. De plus, les LDL oxydées ont un effet cytotoxique sur les cellules endothéliales (Murugesan et Fox 1996). Elles diminuent la coagulabilité plasmatique et sont capables d'induire l'agrégation plaquettaire spontanée (Kanasawa et coll. 1990).

Les HDL oxydées, moins étudiées que les LDL, sont aussi impliquées dans le risque athérogène. En effet, deux étapes clés du transport inverse du cholestérol sont affectées par la présence de lipides oxydés dans les HDL. Les capacités de HDL oxydées à effluer le cholestérol cellulaire sont réduites (Morel 1994) et l'activité de la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) est inhibée par les produits d'oxydation lipidique de nature encore mal connue (Bielicki et coll. 1996 ; Subbaiah et Liu 1996).

Par ailleurs, l'oxydation des HDL modifie la structure de l'apo AI par des phénomènes d'agrégation intermoléculaire ce qui augmente la clairance plasmatique des HDL, diminuant ainsi leur concentration circulante (Senault et coll. 1990).

1.1-Mécanismes de la lipopéroxydation

La peroxydation lipidique résulte de l'attaque des acides gras polyinsaturés par les radicaux libres dérivés de l'oxygène. Les phospholipides des lipoprotéines plasmatiques comme ceux des membranes cellulaires peuvent, en particulier, être la cible de telles attaques, provoquant une altération de leurs propriétés biologiques.

Toutes les formes réactives de l'oxygène (O_2° ; H_2O_2 ; OH°) représentent un danger potentiel pour l'intégrité des acides gras polyinsaturés (AGPI) qui sont extrêmement vulnérables à la peroxydation du fait de l'existence de double liaisons. Ils vont subir l'action des radicaux libres oxygénés qui vont arracher un électron au niveau du groupement allylique entraînant la formation d'un radical lipidique et la délocalisation des doubles liaisons pour former un diène conjugué. L'action de l'oxygène sur ces radicaux lipidiques aboutit à la formation d'un radical peroxyde (ROO°). C'est la phase d'initiation de la peroxydation (figure n°6).

Lors de la phase de propagation, ce radical peroxyde attaque un autre AGPI pour se transformer en hydroperoxyde ($ROOH$).

Enfin, la phase terminale, dite de dégradation, se caractérise par le clivage des hydroperoxydes en molécules d'aldéhydes (malondialdéhyde (MDA) entre autre).

Les aldéhydes générés durant la modification oxydative des LDL réagissent avec le groupement aminé lysine de l'apo B des LDL. C'est cette liaison qui altère l'apo B et entraîne sa reconnaissance par les récepteurs scavenger (ou récepteurs des LDL acétylés) des macrophages.

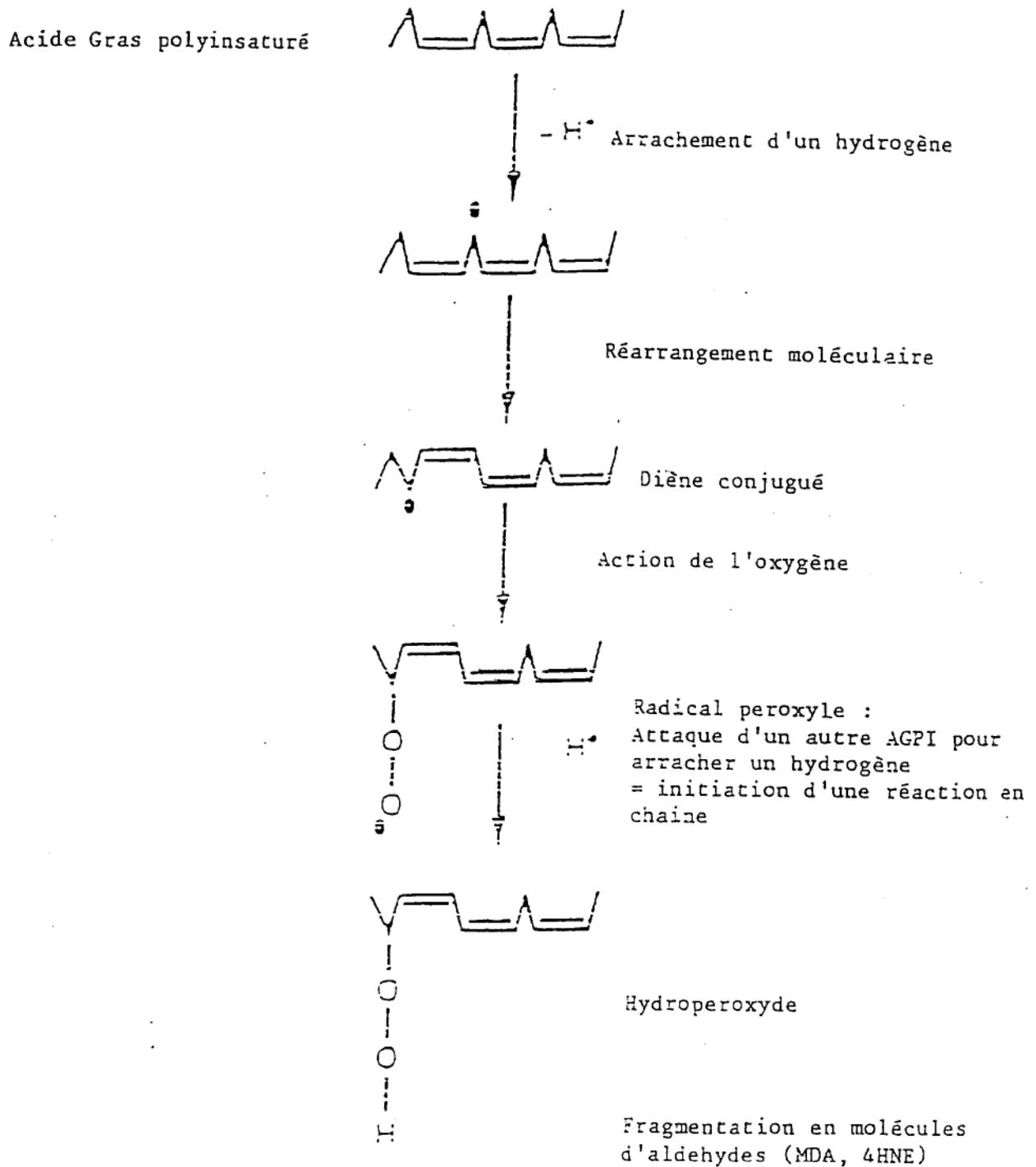


Figure 6. Premières étapes de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés (Mackness et coll. 1995a).

Le processus d'oxydation des LDL inclut les phases d'initiation (formation de diènes conjugués), de propagation (formation de peroxydes), et de décomposition (formation d'aldehydes).

2. Rôle protecteur des HDL

Des études épidémiologiques ont montré une relation inverse forte entre les concentrations sériques en HDL et l'incidence d'athérosclérose coronarienne ou cérébrale. Cependant le mécanisme par lequel les HDL protègent contre l'athérosclérose, que ce soit directement ou indirectement, n'est pas clair. Une proposition est le transfert grâce aux HDL, des excès de cholestérol des tissus périphériques vers le foie en vue de son excrétion, les dépôts non régulés des esters de cholestérol dans les macrophages semblant jouer un rôle dans le développement de la plaque d'athérosclérose. Toutefois, des études expérimentales suggèrent d'autres possibilités. En effet, l'oxydation des LDL, évaluée par les produits d'oxydation des lipides (péroxydes lipidiques), est fortement diminuée en présence d'HDL. Les HDL empêchent donc l'accumulation des hydroperoxydes de phospholipides dans les LDL (Mackness et coll. 1991a et 1993). De plus, la séquestration et la dégradation des LDL par les macrophages, ainsi que de la cytotoxicité associée aux LDL oxydées (notamment la migration des monocytes) sont considérablement réduites par le prétraitement des lipoprotéines par de la PON purifiée (Navab et coll. 1996 ; Watson et coll. 1995).

Ainsi, si l'inhibition des effets biologiques des LDL oxydées par les HDL apparaît bien établie, le(s) mécanisme(s) impliqué(s) reste(nt) encore à définir. Les composants lipidiques et protéiques des HDL peuvent avoir un potentiel antioxydant mais des composants associés doivent aussi être impliqués : ceci inclut des enzymes telles que la paraoxonase, la PAF-AH (Platelet Activating Factor Acétylhydrolase), la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT).

B- Paraoxonase et particules d'HDL

La PON circule dans le sang associée aux HDL. Les HDL sont des lipoprotéines très hétérogènes, tant dans leurs rôles patho-physiologiques, métaboliques que d'un point de vue physico-chimique. Il est donc intéressant de déterminer avec quelle(s) particule(s) la PON est associée, d'essayer de comprendre le métabolisme et le rôle physiopathologique de chacune d'entre elles, et d'établir leur rôle dans l'athérosclérose.

1. PON et apolipoprotéine J (clustérine)

Blatter-Garin et coll. (1993) ont montré que la paraoxonase est présente dans les HDL contenant de l'apo AI et de l'apolipoprotéine J (apo J).

L'apolipoprotéine J ou clustérine est exprimée dans une grande variété de tissus et est impliquée dans divers processus biologiques incluant le transport des lipides, la maturation du sperme, l'inhibition du complément, l'apoptose, le remodelage tissulaire, la neurodégénération, et la protection des membranes contre des composants oxydés.

C'est une glycoprotéine hétérodimérique de 70 kDa associée à une population d'HDL particulière, dont la mobilité électrophorétique se situe en α_2 (Stuart et coll. 1992).

La distribution des particules d'HDL contenant l'apo J (Apo J-HDL) est bimodale tant en terme de masse moléculaire que de densité hydratée. En effet, Stuart et coll. (1992) ont montré que la masse moléculaire est de 70-90 kDa pour moitié et de 200 kDa ou plus, pour l'autre moitié. De Silva et coll. (1990) ont quant à eux, localisé par ultracentrifugation en gradient de densité, ces particules Apo J-HDL, dans les fractions HDL₃ (d = 1,125 - 1,210 g / ml) et VHDL (d = 1,21 - 1,25 g/ml) principalement, mais aussi dans la fraction HDL₂ (d = 1,063 - 1,125 g/ml).

Kelso et coll. (1994) ont montré par chromatographie d'immunoaffinité, une association spécifique entre la PON et l'apo J dans des particules d'HDL de masse relativement faible (90-140 kDa). Cependant toute la paraoxonase plasmatique ne circule pas associée à l'apo J.

Si l'on considère ensemble, les rôles de la clustérine et de la PON, les sous-classes d'HDL contenant l'apo J et la PON pourraient être des éléments importants dans le remodelage et la réparation des lipoprotéines et des phospholipides membranaires (Mackness et coll. 1995a).

Navab et coll. (1997) ont clairement démontré l'importance du ratio apo J / activité PON. Une alimentation riche en graisse, chez des souris B6 sensibles à l'apparition des stries graisseuses, ou chez des souris déficientes en apo E ou en récepteurs apo B / E des LDL entraîne une augmentation considérable de ce ratio. Dans tous les cas, la diminution de PON est accompagnée d'une augmentation de l'apo J. Que ce ratio soit physiopathologiquement significatif est fortement suggéré par les résultats obtenus par la même équipe chez 14 patients normolipidiques atteints d'une maladie cardio-vasculaire. Ils rapportent en effet un ratio apo J / activité PON très augmenté (3 contre 0,75 dans la population contrôle), alors que le ratio cholestérol total / cholestérol-HDL est similaire dans les deux groupes. Ce ratio pourrait donc

être un meilleur facteur de prédiction de l'athérosclérose que les facteurs de risque habituellement mesurés.

L'apo J semble capable de lier une variété de produits d'oxydation des lipides générés par les cellules et / ou associés avec les LDL. Le fait que l'augmentation du ratio apo J / PON soit liée à une augmentation de prévalence de maladies cardio-vasculaires laisse suggérer qu'une stœchiométrie précise entre les deux lipoprotéines, soit dans les mêmes types de particules d'HDL, soit dans différentes sous-classes, est nécessaire pour une action coopérative efficace (Laplaud et coll. 1998).

2. PON et autres constituants de la particule d'HDL

2.1-PAF-AH :

Un autre composant enzymatique potentiellement important des HDL est la PAF-AH (EC.3.1.1.47).

C'est une serine hydrolase qui reconnaît le facteur d'activation des plaquettes (PAF) et une famille de phospholipides structurellement reliée. La PAF-AH est présente dans le plasma mais aussi dans différents tissus et cellules incluant les monocytes, les macrophages, les plaquettes, les érythrocytes, la rate et le foie (Tselepis et coll. 1995). Dans le plasma, la PAF-AH est associée principalement aux LDL (2/3) et HDL (1/3).

La PAF-AH pourrait être une « seconde ligne de défense » (Watson et coll. 1995) qui hydrolyserait les peroxydes lipidiques biologiquement actifs qui ont échappés à l'action de la PON (voir mécanisme d'action de la PON sur les LDL).

Dans deux études « in vitro », l'addition de la PAF-AH empêche la formation de LDL modérément oxydées (Stafforini et coll. 1992 ; Watson et coll. 1995). De plus Shih et coll. (1998) ont montré que l'activité de la PAF-AH n'est pas diminuée chez des souris déficientes en PON alors que leurs HDL sont inefficaces dans la destruction des lipides oxydés biologiquement actifs. Ceci indique donc que la PAF-AH présente sur les HDL n'est pas capable de détruire seule les LDL modérément oxydées (MM-LDL) et / ou qu'une balance entre les espèces oxydées

et les enzymes capables de les détruire existent. De là, en l'absence de PON1 et en l'absence d'une augmentation compensatrice de la PAF-AH, les HDL sont incapables de détruire les MM-LDL.

Reste à savoir si pour agir en tandem, les deux enzymes doivent ou non être les composants des mêmes particules d'HDL.

2.2-Lécithine cholestérol acyltransférase : LCAT

Un troisième composant enzymatique, la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT) pourrait aussi jouer un rôle dans le potentiel antioxydant des HDL.

La LCAT participe au transport inverse du cholestérol en estérifiant le cholestérol libre récupéré des tissus périphériques par les lipoprotéines HDL. L'estérification du cholestérol au sein des HDL crée un gradient de concentration de cholestérol libre des cellules vers les HDL et empêche le retour de ce cholestérol dans les cellules. Les esters de cholestérols ainsi formés sont récupérés par le foie.

Cette action conventionnelle de la LCAT, c'est à dire la production d'esters de cholestérol et simultanément de lysophospholipides, pourrait être considérée comme potentiellement pro-athérogène. Cependant, Nagata et coll. (1996) ont récemment montré que la LCAT des HDL peut utiliser les hydroperoxydes des phospholipides comme substrat d'estérification du cholestérol permettant ainsi leur épuration par le foie.

Ces trois composants enzymatiques des HDL, c'est-à-dire la PON, la PAF-AH et la LCAT, pourraient agir en concert et / ou en compétition, afin d'éliminer les produits de l'oxydation lipidique.

C- PON : Protection contre l'oxydation des lipoprotéines

1. Protection des LDL

L'effet protecteur de la PON sur l'oxydation des LDL a été démontrée différemment par plusieurs auteurs.

D'une part, la PON inhibe les effets biologiques des LDL oxydées. En effet, le traitement des LDL par de la PON purifiée avant leur incubation sous certaines conditions d'oxydation, diminue la cytotoxicité associée aux LDL oxydées (notamment la migration et l'adhésion des monocytes) (Watson et coll. 1995a-b ; Banka 1996).

D'autre part, l'oxydation des LDL, évaluée par les produits d'oxydation des lipides (péroxydes), est inhibée en présence d'HDL ou de PON purifiée. En effet, la PON diminue la formation de malondialdéhyde et de peroxydes lipidiques (Mackness et coll. 1991a ; Mackness et coll. 1993 a et b ; Aviram et coll. 1998a) sans affecter la formation précoce des conjugués diènes (Mackness et coll. 1995a). Cet effet de la PON est saturable et dépend de la concentration en PON (Mackness et coll. 1995a).

De plus, le temps de résistance à l'oxydation des LDL est augmenté en présence de PON (Aviram et coll. 1998a). Inversement, quand les HDL associées à un inhibiteur de la PON sont ajoutées au LDL en présence de cuivre, le temps requis pour initier l'oxydation est diminué et la formation de conjugués diènes est augmentée, en comparaison à l'incubation en présence de cuivre de LDL avec des HDL (Aviram et coll. 1998a).

2. Protection des HDL

La paraoxonase étant associée aux HDL, son rôle majeur est peut être de protéger les HDL plus que les LDL des effets du stress oxydant.

Aviram et coll. (1998a) ont montré que la PON protège non seulement les LDL, mais aussi les HDL, contre les dommages oxydatifs.

En effet, l'oxydation des HDL induite par le cuivre, est substantiellement inhibée dans les HDL enrichies de PON puisque le temps requis pour initier l'oxydation des HDL est augmenté de 66 %. De plus, une diminution significative de la production de malondialdéhyde, et de peroxydes (39 % et 42 % respectivement) est observée dans ces HDL enrichies de PON.

Cette diminution des hydroperoxydes est corrélée à l'activité de la PON (de phénotype A) et à un moindre degré à l'activité de l'arylestérase. Comme pour les LDL, l'effet de la PON est dépendant de sa concentration (Aviram et coll. 1998a).

Cette équipe a pour la première fois utilisé des inhibiteurs spécifiques de la PON (PD 11612 ; PD 65950 ; PD 92770 ; PD 113487). Ces molécules inhibent l'activité de la paraoxonase de 56 à 75 %, mais très peu l'activité de l'arylestérase (moins de 15 %). En présence de ces inhibiteurs, la formation des conjugués diènes, de MDA et d'hydroperoxydes lipidiques, est fortement augmentée.

La PON pourrait donc jouer un rôle protecteur dans le développement de l'athérosclérose. En inhibant l'oxydation des HDL, la PON préserve les fonctions antiathérogènes de cette lipoprotéine, dans le transport reverse du cholestérol et dans la protection contre l'oxydation des LDL (Aviram et coll. 1998a).

3. Mécanismes d'action de la PON

Deux mécanismes d'action de la PON ont récemment été suggérés.

3.1-Activité estérase

La paraoxonase agit sur le paraoxon ou le phénylacétate en hydrolysant la fonction ester P - O du paraoxon, ou celle C - O du phénylacétate.

Le même type de liaison existe au sein des hydroperoxydes de phospholipides et d'esters de cholestérol.

Watson et coll. ont représenté un modèle hypothétique pour la formation de ces phospholipides oxydés et les mécanismes par lesquels les HDL pourraient les détruire (Watson et coll. 1995a et b) (figure n°7).

Les phospholipides présents à la surface des lipoprotéines peuvent subir des attaques radicalaires. L'oxydation des lipoprotéines, *in vivo*, peut être induite par l'anion superoxyde produit par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les phagocytes ou par d'autres radicaux libres oxygénés tels que les hydroxyles produits lors de la réaction d' O_2° avec les métaux de transition (Cu^{2+} , Fe^{2+}). De plus, des enzymes cellulaires, telles que la cyclooxygénase et la lipoxygénase, peuvent convertir les acides gras polyinsaturés des phospholipides et des esters de cholestérol en hydroperoxydes.

Ces phospholipides (PL) oxydés au sein des LDL pourraient être transférés sur les HDL et subir l'attaque de la PON et de la PAF-AH pour les dégrader en composés biologiquement inactifs. Ces hydroperoxydes phospholipidiques sont des substrats potentiels pour la PON, qui hydrolyse les bi-hydroperoxydes présentant 3 doubles liaisons conjuguées.

En cas de déficits en PON ou d'excès d'hydroperoxydes de PL, les phospholipides oxydés peuvent subir une fragmentation par β -scission de l'acide gras en position *sn-2* du PL. Cette fragmentation conduit, d'une part à la formation d'un chaîne hydrocarbonée polyinsaturée libre comportant une fonction aldéhydique, et d'autre part, à un phospholipide présentant en position *sn-2* un acide gras à courte chaîne ayant une fonction aldéhydique terminale. Ce dernier est le substrat de la PAF-AH.

Cette capacité de la PON à hydrolyser les hydroperoxydes au sein des lipoprotéines suggère que la PON agisse sur les lipides oxydés déjà formés.

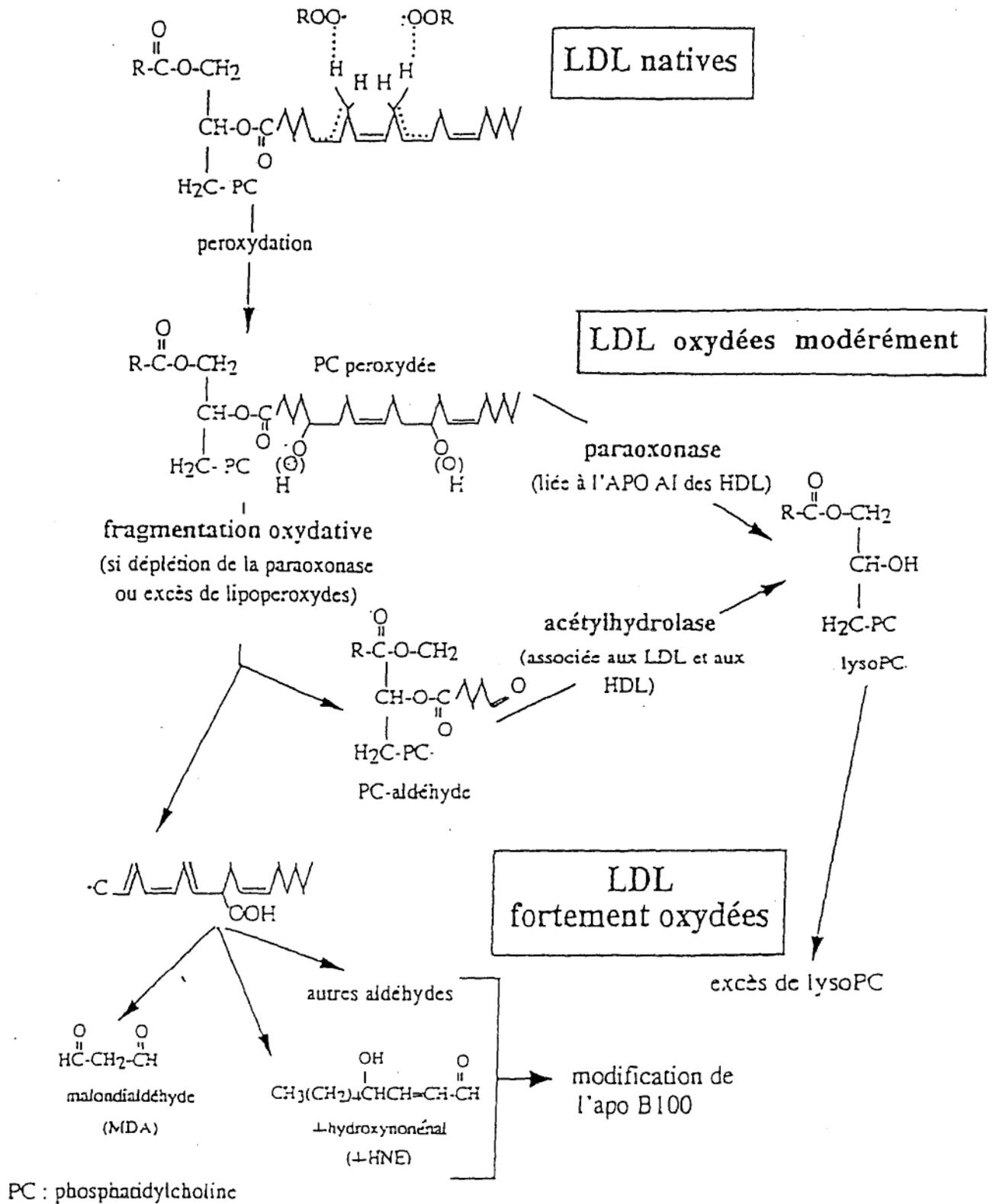


Figure 7. Modèle hypothétique des mécanismes par lesquels les HDL détruiraient les lipides biologiquement actifs à l'intérieur des LDL modérément oxydées (d'après Watson et coll. 1995a).

3.2-Activité peroxydase-like

Plus récemment, Aviram et coll. (1998a) ont attribué une activité peroxydase-like à la PON

D'une part, l'équipe a montré que la PON hydrolyse les hydroperoxydes de linoléate de cholestérol (CLOOH) pour former leur hydroxyde correspondant (CLOH). Parallèlement, aucun hydroperoxyde d'acide gras n'est formé, indiquant donc l'absence d'activité estérase.

D'autre part, la PON hydrolyse également le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Aviram et coll. 1998a). H_2O_2 est une espèce réactive oxygénée majeure, produite par les cellules des vaisseaux artériels durant l'athérogénèse, et qui est convertie sous le stress oxydant en une espèce oxygénée plus réactive conduisant à l'oxydation des LDL. En éliminant le peroxyde d'hydrogène, la PON peut donc empêcher l'initiation de l'oxydation des lipides au sein des lipoprotéines, et plus particulièrement au sein des HDL auxquelles elle est associée.

La PON associée aux HDL pourrait alors jouer un rôle important dans l'élimination des oxydants potentiels impliqués dans l'athérosclérose.

D- Site actif de la paraoxonase requis pour protéger contre l'oxydation

Les résultats d'Aviram et coll (1998b) laissent suggérer que le site actif de la PON requis pour protéger contre l'oxydation des LDL est différent de celui nécessaire à l'activité arylestérase – paraoxonase. En effet, l'inactivation de l'activité arylestérase par addition d'EDTA, ou retrait des ions calciques, ne diminue pas la capacité de la PON à réduire les produits de la peroxydation lipidique.

Rappelons que la paraoxonase possède trois cystéines : deux d'entre elles forment un pont disulfure intramoléculaire alors que la troisième, la Cys₂₈₄, est libre. Sorenson et coll. (1995) ont montré que cette cystéine n'était pas requise pour l'activité arylestérase puisqu'une mutagenèse dirigée contre cet acide aminé, n'élimine pas l'activité enzymatique. L'inhibition de l'activité de l'arylestérase induite par les agents bloquants les sites cystéines résulterait d'un encombrement stérique et non du blocage du site actif. C'est probablement la raison pour

laquelle un petit agent bloquant les groupements sulfhydryls tel que l'iodoacétate, inhibe beaucoup moins l'activité enzymatique que le *p*-hydroxymercuribenzoate, agent bloquant de taille plus conséquente.

Cependant la capacité de la PON à protéger contre l'oxydation est inhibée aussi bien par mutagenèse induite contre la cystéine 284 que par les agents bloquants les groupements sulfhydryls cités ci-dessus. Ces récents résultats d'Aviram et coll. (1998b) indiquent donc l'importance de ce site cystéine de la PON.

E- Paraoxonase et athérosclérose

Face à cette association de la PON avec les particules d'HDL, plusieurs équipes se sont intéressés au rôle possible de l'enzyme dans l'effet "protecteur" qu'exercent ces lipoprotéines contre les maladies cardio-vasculaires. Aussi ont-ils recherché les variations d'activité de la paraoxonase dans les maladies cardio-vasculaires et les pathologies où le risque potentiel de développer un athérome est important. L'influence des polymorphismes de l'enzyme a également été étudiée.

1. Activité de la paraoxonase et athérosclérose

1.1-Diminution de l'activité dans des pathologies associées à l'athérosclérose

McElveen et coll. (1986) ont montré une diminution de l'activité de la PON chez les patients après infarctus du myocarde en comparaison avec des sujets sains. Cette activité plus basse pourrait être une conséquence de la maladie cardiaque ischémique plus qu'un facteur prédisposant. Une étude ultérieure n'a pas trouvé de variation d'activité de la PON dans les jours suivant la phase aiguë de l'infarctus, suggérant qu'aucune diminution n'a eu lieu avant l'événement (Seccheiro et coll. 1989). Une étude hongroise suggère que les enfants de patients qui ont eu un infarctus jeune, ont une activité plus faible que ceux des contrôles (Szabo et coll. 1987) bien que les analyses statistiques de cette étude soient critiquables (Nisselbaum coll. 1987).

L'activité de la paraoxonase sérique est également diminuée chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale (Mackness et coll. 1991b), chez les diabétiques insulino-dépendants (Mackness et coll. 1991b) et non insulino-dépendants (Sakai et coll. 1998), maladies où le risque de formation de plaque d'athérome est élevé. Les résultats d'Ikeda et coll. (1998) suggèrent également que la diminution d'activité de la PON chez les patients diabétiques non insulino-dépendants soit impliquée dans les complications vasculaires des diabétiques. La diminution de l'activité de la PON ne pouvant être expliquée par une baisse des HDL, il semble que la PON soit impliquée dans le développement de l'athérosclérose. Il est improbable que les activités faibles de paraoxonase dans ces maladies soient causées génétiquement, car (1)- l'hypercholestérolémie familiale est une maladie monogénique impliquant une mutation du récepteur apo B / E des LDL et (2)- le diabète induit chez les rats avec la streptozotocine entraîne une diminution progressive de l'activité sérique de la PON (Mackness et coll. 1998a).

Les faibles activités de la PON rencontrées chez les diabétiques insulino et non insulino-dépendants, ne semblent pas être dues à des différences dans le polymorphisme génétique, ni à une diminution de la concentration de la protéine. (Abbott et coll. 1995 ; Mackness et coll. 1997a). Cette faible activité pourrait bien être due à des changements dans l'environnement lipidique des HDL modulant l'activité.

1.2-Résultats d'expériences animales montrant une association athérosclérose-activité PON

L'influence de la PON 1 sur l'athérosclérose a été étudiée chez des souris naturellement différentes par leur susceptibilité à l'athérosclérose : d'une part les souris (B6) sensibles où une alimentation riche en graisse conduit à l'apparition de stries graisseuses, et d'autre part les souris (C3H) résistantes à de telles lésions (Shih et coll. 1996). Avec une alimentation peu grasse, les HDL de ces deux espèces inhibent les effets biologiques des LDL oxydées. Par contre, avec une alimentation riche en graisse et cholestérol, les HDL des souris sensibles perdent leur capacité à inhiber les effets biologiques des LDL oxydées. La perte de cette activité protectrice est associée à une réduction de l'activité de la PON - arylestérase d'une part, et des taux d'ARNm d'autre part. Ceci indique donc que la production de la PON 1 est déterminée par des facteurs génétiques et diététiques. Shih et coll. ont de plus montré que les taux d'ARNm sont inversement corrélés avec l'étendue du développement des stries graisseuses.

La même équipe a montré chez des souris transgéniques avec une hypercholestérolémie extrême due à des déficiences en apo E ou en récepteur apo B / E des LDL, une diminution des taux de PON. Cette diminution correspond à celle retrouvée chez les souris sensibles après un régime très riche en graisse (soit une baisse supérieure à 50 %)(Navab et coll. 1997). De plus, l'injection de LDL fortement oxydées à des souris sensibles à l'athérosclérose, diminue l'activité de la PON de 59 % par effet sur la synthèse hépatique d'ARNm (Navab et coll. 1997).

Dans le but d'étudier le rôle in vivo de la PON 1, Shih et coll. (1998) ont créé des souris sans PON 1 par criblage génétique. Les HDL isolées des souris déficientes en PON 1 sont incapables d'inhiber les effets biologiques des LDL oxydées. De plus, les HDL et les LDL de ces souris sont plus sensibles à l'oxydation que les lipoprotéines des types sauvages. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus chez l'homme, par cultures tissulaires ou études épidémiologiques, suggérant que la PON 1 a la capacité de détruire certains lipides pro-inflammatoires contribuant à l'athérosclérose.

Enfin, Mackness et coll. (1998b) ont travaillé sur des sérums de poulets, d'autruches, de pigeons et de dindes complètement dépourvus de protéine (détection en ELISA et Western blot) et / ou d'activité paraoxonase - arylestérase. Leurs HDL sont alors incapables d'empêcher l'accumulation d'hydroperoxydes phospholipidiques à l'intérieur des LDL.

Les résultats de ces études sont en accord avec la notion que la PON1 joue un rôle central comme enzyme antiathérogène / anti-inflammatoire.

1.3-PON et lésions athérosclérotiques : résultats d'analyses biologiques

Utilisant des techniques d'immuno-localisation, Mackness et coll. (1997d) ont montré que la PON, l'apo AI, et la clustérine (Apo J) s'accumulent dans les vaisseaux artériels avec la progression de l'athérosclérose, probablement en réponse à l'augmentation du stress oxydatif associé au développement de l'athérosclérose. Si dans les artères normales, la PON est localisée au niveau extra-cellulaire et intra-cellulaire, avec la progression de l'athérosclérose, seules des traces extra-cellulaires de la PON sont visibles. Face à ces découvertes, deux hypothèses sont envisageables : une internalisation de la PON dans les cellules endothéliales ou une synthèse de l'enzyme par ces cellules.

Dans une autre publication, la même équipe (Mackness et coll. 1997c) a montré que la PON est présente et reste associée avec les particules d'HDL contenant l'apo AI dans les fluides interstitiels humains. Présente et active dans les vaisseaux artériels, elle est donc en position idéale pour protéger les LDL des modifications oxydatives et pour jouer son rôle préventif dans le développement de l'athérosclérose. A noter cependant que le ratio de l'activité (ou de la concentration) de la PON entre le liquide interstitiel et le sérum, est seulement de 15 %.

2. Activité de la PON et taux de lipides

L'activité et la concentration de la PON sont reliées aux concentrations en CH-HDL et en apo AI dans les populations européennes saines (Abbott et coll. 1995 ; Blatter-Garin et coll. 1994), au CT (cholestérol total) et au CH-HDL dans la population japonaise saine (Sakai et coll. 1998).

Pourtant Mackness et coll. (1998d) rapportent qu'aucun de ces paramètres n'influence l'activité de l'enzyme chez des sujets sains. Par contre chez des patients diabétiques, la même étude montre que les TG (triglycéride) et le CT sont responsables de 7,6 % et 10,6 % respectivement de la modification d'activité de la PON.

Abbott et coll. (1995) rapportent chez des patients diabétiques une association de l'activité enzymatique avec l'apo B et le CH-LDL indiquant probablement une perturbation dans l'interaction entre PON et HDL.

Saha et coll. (1991) ont quant à eux trouvé une corrélation entre l'activité de la PON et les concentrations en TG et apo B chez des indiens et chinois résidents à Singapour.

Ces résultats contrastés pourraient être dûs à des différences intrinsèques dans la distribution de la PON 1 entre les populations européennes et non européennes étudiées.

3. Polymorphisme et athérosclérose

3.1-Polymorphisme 192

Plusieurs études ont évalué la relation entre la PON et les lipides sanguins ou les maladies cardio-vasculaires en prenant en compte le premier polymorphisme découvert (192).

a-Polymorphisme 192 et taux de lipides sanguins (tableau n°3)

Etudiant une population nord américaine saine isolée génétiquement par des croyances religieuses, Hegele et coll. (1995) ont montré que le génotype BB de la PON1 est significativement associé avec des concentrations plus élevées de CH-LDL, TG et apo B. De plus, les homozygotes AA ont des ratios CT / CH-HDL, CH-LDL / CH-HDL et apo B / apo AI significativement plus bas, indiquant qu'ils ont un profil lipidique moins athérogène que les homozygotes AB ou BB. Ils rapportent également que le polymorphisme 192 de la PON1 compte pour 1 % de la variabilité du CT.

Deux autres études (Saha et coll. 1991 ; Ombres et coll. 1998) rapportent des résultats semblables (diminution des TG et de l'apo B avec l'allèle A).

Cependant, dans la majorité des études (5 / 9), aucune association entre le profil lipidique et le polymorphisme 192 n'est montrée. Etrangement, une seule équipe, Ruiz et coll. (1995) rapporte un profil lipidique moins athérogène de l'allèle B chez des patients diabétiques (augmentation du CH-HDL et de la concentration en apo A1).

b-Polymorphisme 192 et maladies cardio-vasculaires (tableau n°4)

Dans la même étude sur 434 diabétiques non insulino-dépendants avec ou sans maladie cardio-vasculaire associée, Ruiz et coll. (1995) ont cependant montré que l'allèle B et les génotypes AB et BB sont associés avec une augmentation du risque de maladies cardio-vasculaires.

Référence	Population / type de patients	Profil lipidique	Polymorphisme 192 : allèle A/B	Concl.
Hegele, 1995	Européenne, 793 Hutterites (US) Sains isolés génétiquement	↓LDL-CH, TG, Apo B ↓CH-LDL/CH-HDL ↓ Apo B / Apo AI	A	A : moins athérogène
Saha, 1991	Chinoise	↓ TG ↓ Apo B	A	A : moins athérogène
Ruiz, 1995	Européenne, NIDDM (434 dont 137 CHD)	↑CH-HDL ↑ Apo-AI	B	B: Protecteur?
Antikainen, 1996	Européenne, ± CHD	Pas de différences des taux de lipides avec le génotype 192		
Hermann, 1996	Européenne, ± CHD	Pas de différences des taux de lipides avec le génotype 192		
Odawara, 1997	Japonaise, NIDDM ± CHD	Pas de différences des taux de lipides avec le génotype 192		
Sanghera, 1997	Indiens, ± CHD Chinois, ± CHD	Pas de différences des taux de lipides avec le génotype 192		
Zama, 1997	Japonaise, NIDDM ± CHD	Pas de différences des taux de lipides avec le génotype 192		
Ombres, 1998	Européenne, ± CHD	↓ TG ↓ Apo B	A	A : moins athérogène

Tableau 3. Polymorphisme et profil lipidique.

CHD : maladie cardio-vasculaire (coronary heart disease)

NIDDM : diabète non insulino-dépendant (non-insulin dependent diabetes mellitus)

Référence	Population / maladie associée ?	Fréquence allèle B		Corrélation	critères CHD	nbre patients (CHD/ctl)
		CHD+	CHD-			
Ruiz, 1995	Européenne / NIDDM	0.35	0.26	+		(434) 263 / 171
Serrato, 1995	Européenne	0.44	0.31	+	angiographie	570 (223/247)
Hermann, 1996	Européenne	0.31	0.30	-	IM	1343 (642 / 701)
Antikainen 1996	Européenne	0.26	0.26	-	pontage > 4 ans	(549) 380 / 169
Suehiro, 1996	Japonaise	0.60	0.62	-		(386) 134 / 252
Sanghera, 1997	Singapour				pontage > 4 ans Angiographie : sténose > 50 %	122/165 246/244
	*Indienne	0.43	0.33	+		
	*Chinoise	0.59	0.53	-		
Odawara, 1997	Japonaise / NIDDM	0.69	0.58	+	IM ou 75 % sténose	164 (42 / 122)
Zama, 1997	Japonaise	0.74	0.59	+	angiographie	75 / 115
Ombres, 1998	Européenne / ± problèmes vasculaires mais sténose < 50 %	0.31	0.30	-	sténose > 50 %	(472) 310 / 162
Pati, 1998	Indienne (New Delhi)	0,45	0,17	+		(200) 120 / 80
Ko, 1998	Chinoise (Taiwan)	0,65	0,64	-	angiographie	218 / 218

Tableau 4. Relation entre le polymorphisme génétique 192 de la PON et la présence de maladie cardio-vasculaire.

Le tableau montre les relations établies par plusieurs équipes (11) entre le polymorphisme génétique 192 de la PON1 et la présence de CHD. 5 études (3 en Europe, 1 au Japon et 1 en Inde) ne montrent pas de relation entre ce polymorphisme et le CHD, alors que 5 autres (2 en Europe, 2 au Japon et 1 en Inde) rapportent un résultat positif. Une autre étude trouve une relation positive dans la population indienne de Singapour mais pas dans la population chinoise de Singapour.

CHD : maladie cardio-vasculaire (coronary heart disease), IM : infarctus du myocarde,
NIDDM : diabète non insulino-dépendant (non-insulin dependent diabetes mellitus)

La même année Serrato et coll. (1995) montrent des résultats semblables dans une population caucasienne nord américaine saine (247) ou avec une pathologie cardio-vasculaire (223). Des observations comparables sont obtenues dans d'autres groupes ethniques, c'est à dire des indiens de Singapour (mais pas les chinois)(Sanghera et coll. 1997), de New Delhi (Pati et coll. 1998), des japonais sans diabète (Zama et coll. 1997) ou avec diabète insulino-dépendant (Odawarra et coll. 1997). C'est toujours l'allèle B, à forte activité contre le paraoxon, qui est associé positivement avec le risque de maladie cardio-vasculaire.

Cependant 5 autres études (3 en Europe, 1 au Japon et 1 en Inde) ne montrent pas de relation entre le polymorphisme 192 et le risque de maladies cardio-vasculaires.

Ces résultats sont à l'opposé de ceux attendus avant qu'il ne soit réalisé que l'allèle A était associé avec l'activité PON 1 la plus élevée envers certains substrats. Les génotypes AB et BB de la PON1 pourraient avoir une différence d'activité plus marquée comparés au génotype AA, en respect avec le substrat naturel impliqué dans le développement de la plaque d'athérome.

c-Influence sur la protection contre la peroxydation lipidique des LDL

Pour tenter de répondre aux questions posées par ces études, deux équipes ont étudié la capacité des HDL contenant les différents isoenzymes de la PON1 définies par le polymorphisme 192, à diminuer l'oxydation des LDL induite par le cuivre (l'oxydation étant déterminée par l'accumulation des peroxydes lipidiques). Après 6 heures d'incubation des LDL avec les HDL, les auteurs montrent que les HDL contenant la PON de génotype AA (PON-AA) sont significativement plus efficaces que les HDL contenant la PON de génotype AB ($p < 0.01$) ou BB ($p < 0.005$) à diminuer ces peroxydes lipidiques (Mackness et coll. 1997b ; Aviram et coll. 1998b).

De plus, durant l'oxydation des LDL, l'activité arylestérase du génotype AA est mieux conservée que celle du génotype BB (diminution de 28 % contre 55 % respectivement) (Aviram et coll. 1998b). Cette diminution sélective est peut être due à la sensibilité supérieure de la PON de génotype BB à certains peroxydes produits durant l'oxydation des LDL. Ainsi, l'activité arylestérase de la PON de génotype AA n'est pas affectée par la présence de peroxyde d'hydrogène alors que celle de la PON de génotype BB l'est (Aviram et coll. 1998b).

Les deux alloenzymes diffèrent aussi par leur capacité à inhiber l'initiation ou la propagation de l'oxydation des LDL. L'accumulation d'hydroperoxyde est nettement diminuée quand la PON-AA est ajoutée dès le début de l'oxydation. Par contre, la PON BB est beaucoup plus efficace quand elle est ajoutée une heure après le début de l'oxydation. Ces résultats suggèrent que les allèles A et B agissent sur différents substrats générés durant l'oxydation des LDL et aient des sensibilités différentes sur les hydroperoxydes formés durant l'oxydation des LDL. Ces différences pourraient contribuer aux divergences dans les rôles anti-athérosclérotiques possibles des alloenzymes de la PON.

3.2-Influence du polymorphisme 55

L'influence physiopathologique possible du second polymorphisme, lequel implique la substitution Méthionine → Leucine en position 55, a été étudiée plus récemment.

a-Polymorphisme 55 et taux de lipides sanguins

Deux auteurs rapportent des résultats divergents quant à la relation polymorphisme 55 - taux de lipides sanguins. Blatter-Garin et coll. (1997) ont trouvé une diminution de l'apo A1 associée avec le génotype MM, alors que pour l'équipe de Mackness le polymorphisme 55 n'influence pas les concentrations des lipoprotéines (Mackness et coll. 1998d).

b-Polymorphisme 55 et maladies cardio-vasculaires

De même, les études existantes quant à l'association polymorphisme du codon 55 - risque de maladie cardio-vasculaire diffèrent : l'association positive de l'haplotype BL avec les maladies cardio-vasculaires, mise en évidence par l'équipe de Sanghera et coll. (1998), apparaît être due à l'allèle B sans contribution du polymorphisme du codon 55 ; Zama et coll. (1997) ne montrent pas non plus d'association de l'allèle L avec les maladies coronariennes (fréquence de 91 % pour les contrôles contre 93 %). Par contre, d'après Blatter-Garin et coll. (1997), le génotype LL double le risque de maladies cardio-vasculaires. Il est possible que cette association soit en fait due à l'allèle B puisque cette équipe avait précédemment reporté sur une étude

réalisée sur les mêmes patients diabétiques une relation positive entre le risque de CHD et le génotype BB (Ruiz et coll. 1995).

Cependant une autre équipe a montré en étudiant parallèlement les 2 génotypes, que le variant Méthionine → Leucine 55 est un facteur de risque génétique pour la rétinopathie diabétique. La fréquence de l'allèle L et du génotype LL est significativement plus élevée chez les diabétiques avec rétinopathie et ceux sans rétinopathie (73 % contre 57 % et 50 % contre 27 % respectivement) (Kao et coll. 1998).

c-Influence sur la protection contre la peroxydation lipidique des LDL

Mackness et coll. (1998c) ont étudié l'effet de ce polymorphisme 55 sur la protection contre la peroxydation lipidique des LDL et montré que le génotype MM était le plus efficace.

III- Méthodologies et Objectifs

A- Méthodologies

La détermination des activités paraoxonase et arylestérase est basée sur la mesure de la vitesse d'apparition d'un produit de la réaction par spectrophotométrie d'absorption utilisant respectivement le visible et la lumière ultraviolette. C'est une méthode rapide et précise basée sur la relation de Beer Lambert qui relie l'absorption à la concentration des composés pour une longueur d'onde donnée.

Loi de Beer Lambert :

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Où A est l'absorbance ou la densité optique (DO)

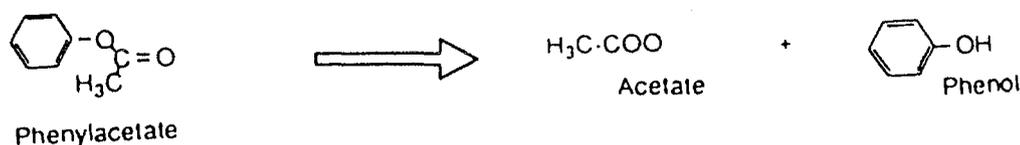
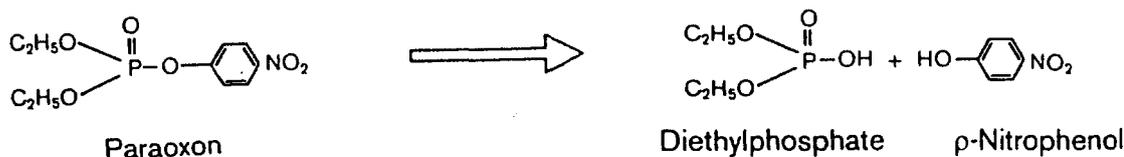
ϵ est le coefficient d'extinction

c est la concentration

l est le trajet optique.

Ainsi l'activité de la paraoxonase est dosée par mesure du paranitrophénol libéré à partir du paraoxon (équation n°1). Le paranitrophénol développe une coloration jaune en milieu alcalin. La cinétique de la réaction peut donc être suivie dans le visible (405 nm) au spectrophotomètre.

L'activité arylestérase est quant à elle déterminée par mesure du phénol libéré à partir du phénylacétate (équation n°2). La cinétique de la réaction est suivie dans l'ultra-violet à 270 nm au spectrophotomètre.



Principalement trois équipes se sont intéressées à l'activité enzymatique de la paraoxonase et de l'arylesterase. Cependant les conditions opératoires de détermination des activités enzymatiques sont différentes pour chaque équipe (tableaux 5 et 6).

Equipe / Publication	Furlong et coll. (1988)	Watson et coll.		Mackness et coll.	
		(1995)	Eckerson, 1983	McElveen, 1983	Mackness, 1993 c
Tampon	Tris HCl 132 mM	Tris HCl 50 nM	Glycine NaOH : 50 mM	Tris HCl 20 mM	Tris HCl 100 mM
pH	8,5	7,4 et 8	10,5	7,6	8
CaCl ₂	1,32 mM	?	1 mM	10 mM	2 mM
NaCl	+ / - 2,63 M		+ / - 1 M		
Température	37°C	37°C	25 °C	37°C	25°C
Paraoxon	200 µl à 6 mM soit 1,2 mM	?	1 mM	5,5 mM	5,5 mM
Sérum	40 µl diminué à 10 µl en 1989	?	5 µl	?	?
Volume total	1 ml	?	?	?	1 ml
Remarques	Sol stock de substrat 120 mM 1988 : dans l'acétone 1989 : dans le méthanol à diluer 1/20 dans Tris HCl 50 mM		Sol stock de substrat 0,5 M dans le méthanol		
Lecture	405 nm	412 nm		405 nm	405 nm

Tableau 5. Méthodes de dosage de l'activité paraoxonase.

	Furlong et coll. (1988)	Watson et coll. (1995) Kuo et al. (1998)	Mackness et coll. Ruiz et coll. 1995
	Tampon	Tris HCl : 10 mM	Tris HCl : 20 mM – 25 mM
pH	8	8	7,8
CaCl	1 mM	1 mM	20 mM
Température	37°C	?	?
Phénylacétate	1 mM à 3,6 mM	1 mM	4 mM
Sérum	20 µl dilué au 1/50 dans l'eau	?	2 µl
Volume total	?		
Lecture à 270 nm en continu			

Tableau 6. Méthodes de dosage de l'activité arylestérase

B- Objectifs

Notre premier objectif a donc été de fixer les conditions opératoires du dosage des activités paraoxonase et arylestérase.

Dans un second temps, nous avons voulu identifier dans quelles fractions de lipoprotéines et plus particulièrement dans quelles sous-fractions d'HDL se retrouvait l'activité PON / arylestérase.

MATERIELS
ET
METHODES

I- Echantillonnage

Nous avons travaillé sur des échantillons de sang, prélevés sur tube sec (sans anticoagulant).

Le sérum obtenu après centrifugation (10 minutes à 3 000 g à 4°C) est fractionné en parties de 100 µl, et conservé à + 4°C et à -20°C en vue des essais de conservation.

II- Méthodes

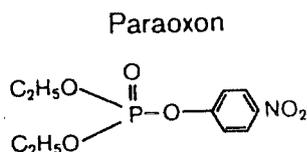
A- Réalisation du dosage de l'enzyme

Le dosage de la paraoxonase se fait par mesure spectrophotométrique en continu sur UVIKON 922 avec bain thermostaté.

Deux substrats, le paraoxon et le phénylacétate ont été utilisés.

1. Substrat : paraoxon

Le paraoxon (diethyl-*p*-nitrophenyl phosphate – C₁₀ H₁₄ NO₆) (Sigma ; Réf. D9286), est conservé à + 4°C. Une solution stock de concentration 0,545 M dans le méthanol est préparée extemporanément ou congelée à -20°C.



1.1-Préparation de la solution stock (dérivée de la méthode d'ECKERSON 1983)

Le paraoxon (PM 275,2) se présente sous forme liquide pur à 90 %, dans un flacon de 1 g contenant 0,6 ml.

On a donc 900 mg de paraoxon dans le flacon, soit une solution avec une concentration de :

$$c = (900 / 275,2) / 0,6 = 5,45 \text{ M}$$

La solution est diluée au 1/10 dans du méthanol et conservée congelée à -20°C .

1.2-Préparation du tampon

Le tampon ne doit pas contenir de phosphate puisque l'hydrolyse du paraoxon par l'enzyme conduit à la formation de diéthylphosphate (équation 1) . Nous utilisons du **tampon Tris HCl** {Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane} ($\text{pK}_a = 8,3$ à 20°C , voisin de notre pH d'étude) contenant du **calcium**.

Différentes concentrations en Tris et en calcium ont été testées.

Le tampon se conserve 1 mois à $+4^{\circ}\text{C}$.

Tampon Tris HCl (100 mM) avec Ca Cl₂ 2 mM

Tris HCl : PM : 1,211 g

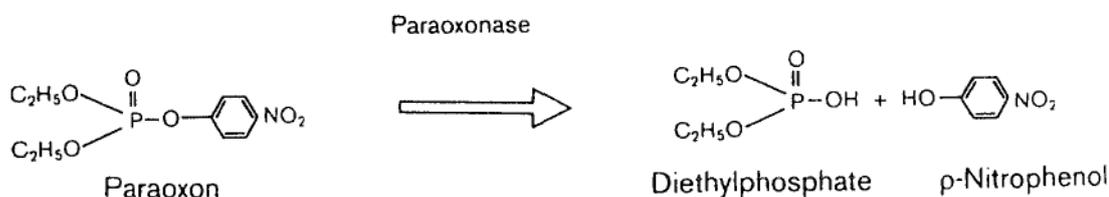
121,14

H₂O 90 ml, puis ajuster au pH désiré avec HCl

CaCl₂ : PM : 110,99 22,2 mg

H₂O qsp 100 ml

1.3-Equation d'hydrolyse du paraoxon (1)



1.4-Procédure opératoire

Le choix des conditions opératoires (volumes, pH, température, concentration en CaCl_2) sera fixé en fonction des résultats expérimentaux.

Les réactifs sont utilisés après avoir été pré-incubés à température ambiante.

En cuves plastiques de 1 ml, nous mettons :

Tampon Tris HCl : x μl Homogénéisation à l'aide d'un agitateur en plastique

Substrat : Paraoxon : x μl

Sérum : x μl Homogénéisation à l'aide d'un agitateur en plastique

Lecture en continu à 405 nm contre un blanc réactif avec paraoxon pendant 15 min.

(intervalle de lecture : 1 min.)

Activité : U/l de sérum avec 1 Unité = 1 μmol de paraoxon hydrolysé par minute

La réaction est déclenchée par addition de sérum. La libération de *p*-nitrophénol par hydrolyse enzymatique du paraoxon est suivie à 405 nm.

Un blanc réactif est inclus systématiquement pour corriger l'absorbance du paraoxon par hydrolyse non enzymatique.

L'activité est donnée par mesure de la pente (variation de densité optique – ΔDO - par minute) ou calculée en tenant compte du coefficient d'extinction moléculaire au pH correspondant soit $18050 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à pH 8,5 (Furlong et coll. 1988), $16700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à pH 8 et $14000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à pH 7,2 (Eckerson et coll. 1983). Les unités sont alors exprimées en micromoles de paranitrophénol formé par minute et l'activité correspond à une unité par litre de sérum.

1.5-Calcul de l'activité :

L'activité enzymatique (UI / ml de sérum) est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Activité} = [(\Delta \text{DO} / \text{min. (blanc-dosage)} / \epsilon * l) * (1 / \text{dil.}) * 10^6]$$

où ΔDO est la variation d'absorbance,

ϵ est le coefficient d'extinction moléculaire en $\text{l. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,

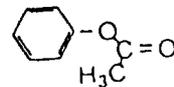
l est le trajet optique en cm

dil. est la dilution de l'échantillon dans le milieu réactionnel.

Nous effectuons par échantillon, cinq dosages dont la moyenne donne le résultat final.

2. Substrat : phénylacétate

Le phénylacétate ($\text{C}_8 \text{H}_8 \text{O}_2$) (Sigma ; Réf. P 2396), a été congelé à -20°C en aliquotes de solution stock de concentrations 1 M dans le méthanol.



Phénylacétate

2.1-Préparation de la solution stock

Le phénylacétate (PM 136,2) se présente sous forme liquide ($d=1,08$).

On a donc une solution à la concentration :

$$c = 1080 / 136,2 = 7,93 \text{ M}$$

La dilution se fait dans du méthanol. Pour obtenir une concentration 1 M, nous mettons 1,26 ml dans 10 ml de méthanol

Les solutions diluées (ou solution stock) sont conservées en parties aliquotes congelées à -20°C .

Nous avons travaillé dans du tampon Tris Acétate (50 mM, pH 7,8) contenant du calcium (CaCl_2 20 mM).

2.2-Préparation du tampon

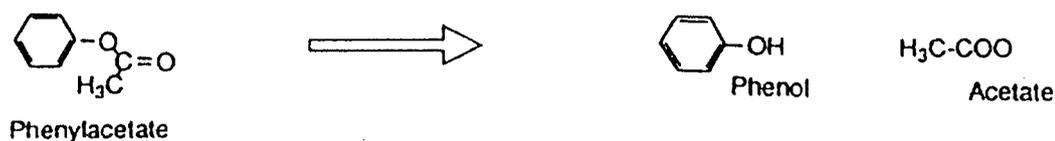
Nous avons choisi comme tampon le Tris Acétate puisque l'hydrolyse du phénylacétate par l'enzyme conduit à l'acide acétique (équation 2).

Le tampon se conserve 1 mois à + 4°C.

Tampon Tris acétate (50 mM) contenant du CaCl_2 20 mM

Tris Acétate: PM : 121,14	0,6057 g
H_2O	90 ml, puis ajuster le pH à 7,8 avec de l'acide acétique
CaCl_2 : PM : 110,99	221,9 mg
H_2O	qsp 100 ml

2.3-Equation d'hydrolyse du phénylacétate (2)



2.4-Procédure opératoire

Le choix des conditions opératoires (volumes, pH, température) sera fixé en fonction des résultats expérimentaux.

Les réactifs sont utilisés après avoir été pré-incubés à température ambiante.

En cuves quartz de 1 ml, nous mettons :

Tampon Tris Acétate : x μ l Homogénéisation à l'aide d'un agitateur en plastique

Substrat : Phénylacétate: x μ l

Sérum : x μ l Homogénéisation à l'aide d'un agitateur en plastique

Lecture en continu à 270 nm contre un blanc réactif avec phénylacétate pendant 10 minutes.

(intervalle de lecture de 1 min.)

Activité : U/l de sérum avec 1 Unité = 1 μ mol de phénylacétate hydrolysé par minute

La réaction est déclenchée par l'addition du sérum. L'hydrolyse enzymatique du phénylacétate est suivie à 270 nm par mesure spectrophotométrique sur UVIKON 922 (cuves en quartz).

Un blanc réactif est inclus systématiquement pour corriger l'hydrolyse spontanée du phénylacétate.

L'activité est donnée par mesure de la pente (variation de DO par minute) ou calculée comme indiqué précédemment, le coefficient d'extinction moléculaire étant de $1310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Furlong et coll. 1988). La méthode de calcul de l'activité arylestérase est identique à celle utilisée pour l'activité paraoxonase (cf p 47).

Nous effectuons par échantillon, cinq dosages dont la moyenne donne le résultat final.

B- Fractionnement des lipoprotéines

Des ultracentrifugations de flottation successives à différentes densités sont appliquées (cf figure n°8) afin de purifier chaque famille de lipoprotéines :

LDL (d = 1,063 g / ml)

HDL₂ (d = 1,063 - 1,125 g / ml)

HDL₃ (d = 1,125 - 1,250 g / ml).

Le sérum ou la fraction considérée est ajustée à la densité finale par ajout de KBr solide selon l'équation :

$$X_g = V_i * (d_f - d_i) / [1 - (0,312 * d_f)]$$

Où X_g est le poids de KBr sec en grammes,

V_i est le volume initial de sérum en ml,

d_i est la densité initiale (soit 1,006 g / ml pour le sérum),

d_f , la densité finale,

et 0,312, le facteur de correction dû à la masse volumique de KBr.

La première UC (**UC1**) permet l'élimination des **LDL par flottation à 1,063 g / ml** : le sérum est ajusté à la densité de 1,063 g / ml par addition de KBr solide puis placé dans des tubes polycarbonates (volume d'1 ml). Les tubes sont mis à centrifuger à 100 000 tours / min., et à 10°C pendant 2 heures.

Les 250 µl de surnageant contenant les LDL sont éliminés et le sous-nageant (SN), contenant HDL et protéines, est récupéré.

La deuxième UC (**UC2**) s'effectue sur le SN des LDL dont la densité est ajustée à **1,125 g / ml pour flottation des HDL₂**. Les tubes sont mis à centrifuger à 100000 tours / min pendant 6 heures à 10°C.

Nous récupérons soit 9 fractions de 100 µl, soit une fraction d'HDL₂ de 200 µl ou 250 µl et le sous-nageant des HDL₂ contenant HDL₃-protéines.

Une troisième UC (**UC3**) est effectuée sur le sous-nageant des HDL₂ dont la densité est **1,210 g / ml pour isoler les HDL₃**. Les tubes sont mis à centrifuger à 100000 tours / min pendant 6 heures à 10°C.

Comme précédemment, nous récupérons soit 9 fractions de 100 µl, soit une fraction d'HDL₃ de 200 µl ou 250 µl et le sous-nageant des HDL₃ contenant les protéines.

Une autre UC à la densité de **1,210 g / ml (UC2')** est aussi pratiquée sur le sous-nageant des LDL pour séparer les HDL totaux des protéines. La densité du SN LDL est ajustée à la densité **1,21 g / ml** par addition de KBr solide.

Les tubes sont mis à centrifuger à 100000 tours / min pendant 6 heures à 10°C.

Nous récupérons soit 9 fractions de 100 µl, soit une fraction d'HDL_{Totaux} de 200 µl ou 250 µl et le sous-nageant des HDL_{Totaux} contenant les protéines.

Il faut noter qu'avant chaque étape d'ultracentrifugation, du KBr est ajouté pour obtenir la densité finale désirée. Dans les premières expériences, la densité initiale était la densité des SN : elle prenait en compte les protéines et était mesurée au densitomètre. Dans les dernières expériences, la densité initiale est la densité saline (estimée préalablement à chaque étape d'ultracentrifugation). Cette densité saline ne tient plus compte des protéines et est inférieure à la densité des SN.

Les densités salines après UC₁ et UC₂ sont respectivement :

SN LDL : 1,064 g / ml.

SN HDL₂ : 1,133 g / ml.

Dans nos rendus de résultats, les calculs prennent en compte les diverses dilutions mais pas les variations de volume dues à l'apport de KBr. Celles-ci sont en effet négligeables lorsque nous les rapportons à l'activité en U/l de sérum.

C- Electrophorèse des lipoprotéines

Les lipidogrammes ont été réalisés sur gel de polyacrylamide de gradient 2 – 20 %. C'est une méthode hautement résolutive permettant l'analyse des lipoprotéines qui sont séparées selon leur taille (d'après Gambert et coll. 1988). Les lipoprotéines sont précolorées par le Noir Cérol B. La migration s'effectue en tampon Tris glycine, à pH 8,3, pendant 16 heures et sous 220 Volts. A la fin de la migration, la distribution est estimée par densitomètre.

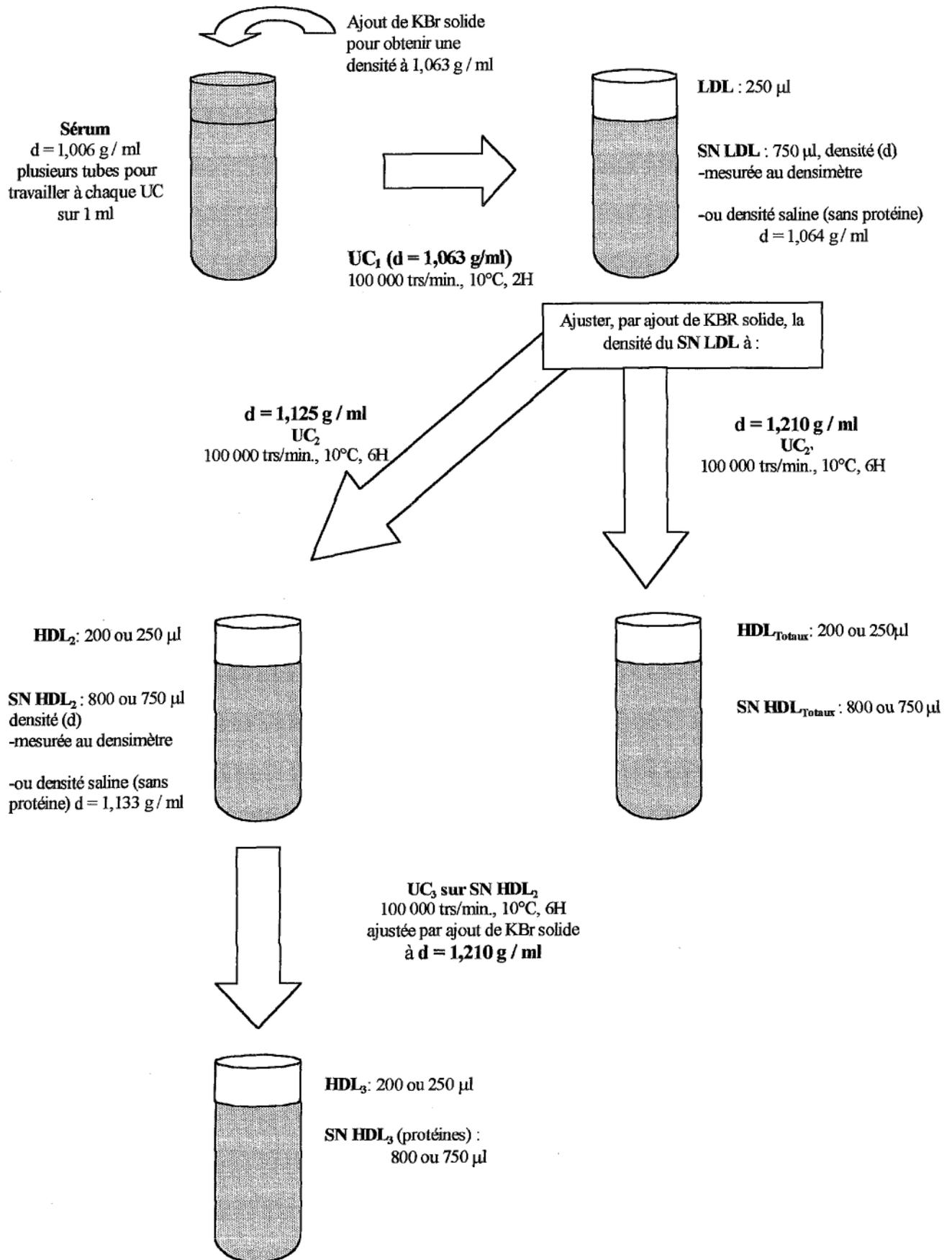


Figure 8. Méthode de séparation des lipoprotéines. Ultracentrifugations de flottation successives.

D- Génotypage : détermination du polymorphisme 192

Le génotypage de la PON est basé sur une amplification sélective des séquences d'acides nucléiques avec recherche d'un site de restriction.

Après extraction, l'acide désoxynucléique (ADN) est amplifiée en utilisant des amorces spécifiques qui encadrent le polymorphisme du codon 192. La taille du fragment amplifié est de 99 pb.

Ce fragment est alors mis en contact avec une enzyme de restriction ALWI.

En présence de l'allèle A, aucun site de restriction n'apparaît et le fragment d'ADN amplifié conserve sa taille de 99 pb.

Par contre dans le cas de l'allèle B, l'enzyme de restriction coupe le fragment d'ADN en deux : un fragment de 65 pb et un fragment de 34 pb.

Les fragments sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gel de polyacrylamide de gradient 15 % puis visualisés en fluorescence par le bromure d'éthidium.

E- Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type.

Pour évaluer l'influence d'un paramètre, nous avons testé nos échantillons en ne faisant varier que le paramètre en question. Nous avons donc pu utiliser le test de Student des séries appariées pour la comparaison de nos résultats sur la mise au point des conditions opératoires. Les différences présentant une probabilité (p) inférieure à 5 % sont considérées comme statistiquement significatives (DS) et celles présentant une probabilité (p) inférieure à 1 % comme hautement significatives (DHS).

RESULTATS

I- Détermination des conditions opératoires

Pour la mise au point du dosage, nous avons arbitrairement suivi les méthodes décrites par Mackness et coll. (1991) utilisant le paraoxon comme substrat et par Ruiz et coll. (1995) pour le phénylacétate.

Pour valider la réaction enzymatique les conditions de vitesse initiale doivent être respectées. La réaction peut être assimilée à une réaction d'ordre zéro où la quantité de produit apparu (ou substrat transformé) varie de façon linéaire avec le temps. La vitesse est donc constante, proportionnelle à la quantité d'enzyme si la concentration en substrat est saturante.

A- Substrat : Paraoxon

Lors de la détermination des conditions opératoires, nous avons travaillé à 30°C dans du tampon Tris HCl (100 mM, pH 8) contenant du calcium (2 mM) Mackness et coll. (1991).

1. Concentration en substrat.

La concentration saturante en substrat a été déterminée en déclenchant la réaction avec 10 µl de sérum. L'activité de la paraoxonase en fonction de la concentration en paraoxon dans la cuve est suivie pour des concentrations de paraoxon de 1 à 7,6 mM.

L'activité enzymatique est croissante jusqu'à une concentration en substrat de 4,4 mM. Au delà de 6,5 mM (soit 12 µl de notre solution stock), l'activité enzymatique décroît pour les quatre échantillons testés. Cette diminution est très nette pour les 2 sérums dont l'activité est élevée (figure n°9).

Nous avons donc retenu une concentration en paraoxon de 4,4 mM dans la cuve soit 8 µl de notre solution stock à 0,545 M.

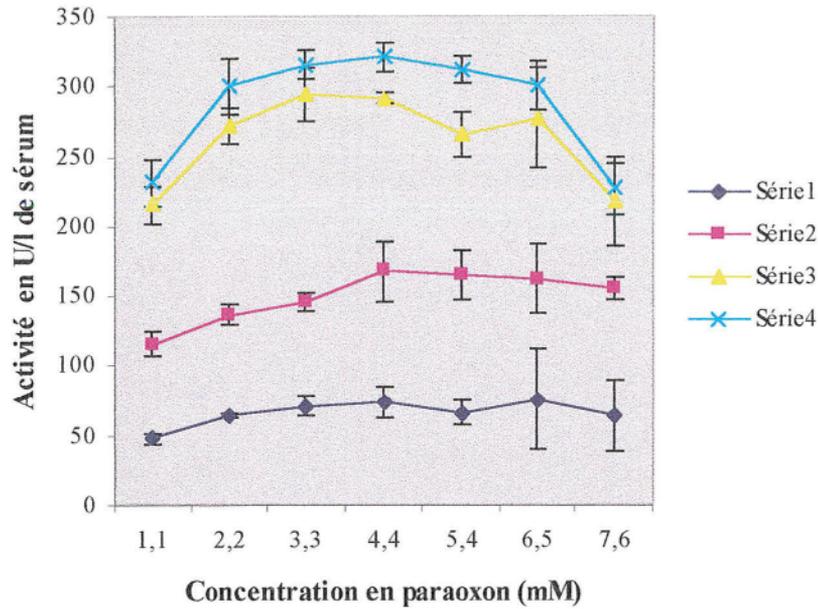


Figure 9. Activité de la paraoxonase sérique en fonction de la concentration en paraoxon.

Dosage de 4 échantillons à pH 8, 30°C, dans du tampon Tris HCL (100 mM), contenant du calcium (2 mM).
Résultats donnant la moyenne \pm écart type (n = 5).

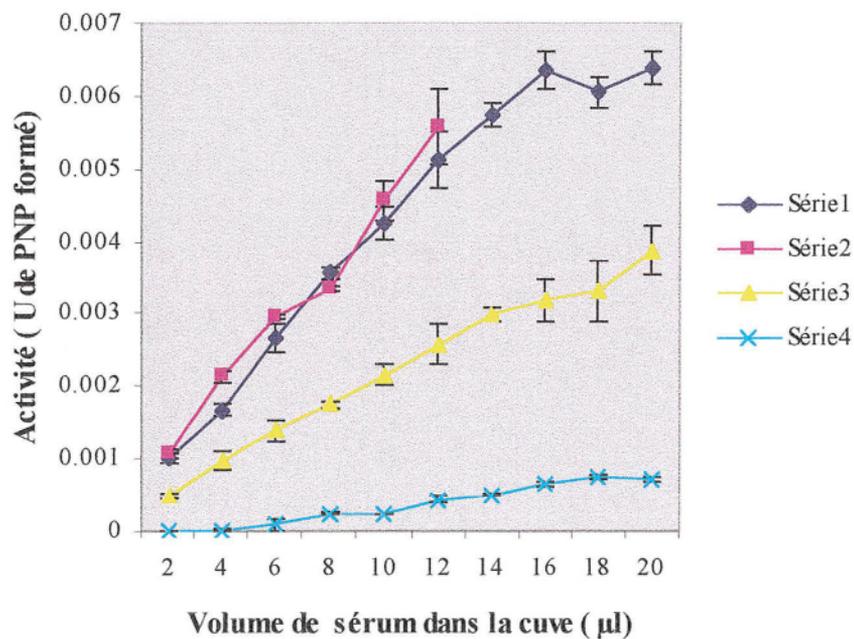


Figure 10. Linéarité. Activité de la paraoxonase sérique en fonction du volume de sérum.

Dosage de échantillons à pH 8, 30°C, dans du tampon Tris HCL (100 mM), contenant du calcium (2 mM).
Résultats donnant la moyenne \pm écart type (n = 5).

2. Linéarité

La figure n°10 montre l'activité de l'enzyme (exprimée en Unités : μmol de paranitrophénol PNP formé par min.) en fonction du volume de sérum (quantité de paraoxon de 8 μl soit 4,4 mM). Les moyennes des séries 2-3-4 sont réalisées à partir de 2 dosages, celle de la série 1 de 5 dosages.

Une relation linéaire existe entre l'activité et la concentration enzymatique jusqu'à une activité enzymatique de 0,006 UI de PNP formé. Au delà (entre 16 et 20 μl), il apparaît un plateau pour le sérum dont l'activité enzymatique mesurée est élevée : nous sommes alors en excès d'enzyme.

Nous avons donc choisi une prise d'essai de 10 μl , ce qui représente une dilution au 1 / 100 de notre échantillon dans le milieu réactionnel et nous donne une activité suffisante même pour les sérums à activité faible.

3. Etude de la linéarité de la réaction en fonction du temps d'incubation

Les concentrations en substrat et en sérum étant définies, la linéarité a été suivie pour différents temps d'incubation, et différents temps de lecture.

Nous avons trouvé la meilleure linéarité associée à la plus forte mesure d'activité pour des mesures effectuées entre 5 et 10 minutes.

De rares sérums montrent une cinétique non linéaire (en dents de scie) durant les premières minutes. McElveen et coll. (1986) ont rapporté 10 % de cinétique non linéaire, et si la cause en est inconnue, elle pourrait être le reflet d'une balance défavorable des estérases A et B dans ces échantillons. Normalement, la formation de *p*-nitrophénol due à l'hydrolyse par les B-estérases a lieu durant la première minute. Après ce temps les B-estérases sont inhibées et le *p*-nitrophénol relargué est uniquement du à l'activité de la paraoxonase (A-estérase). Dans les cas des sérums où la cinétique n'est pas linéaire, il se pourrait que la saturation des sites actifs des B-estérases par le paraoxon soit retardée.

Nous avons donc choisi de donner l'activité à partir des mesures lues entre 5 et 10 minutes.

4. Influence de la température

La figure 11 montre l'activité de 10 échantillons testés aux températures les plus utilisées : 30 et 37°C. Cette activité est supérieure à 37°C et augmente de 15 à 27 % selon les échantillons.

La différence sur la moyenne des 10 séries appariées est hautement significative (DHS : $p < 0,001$).

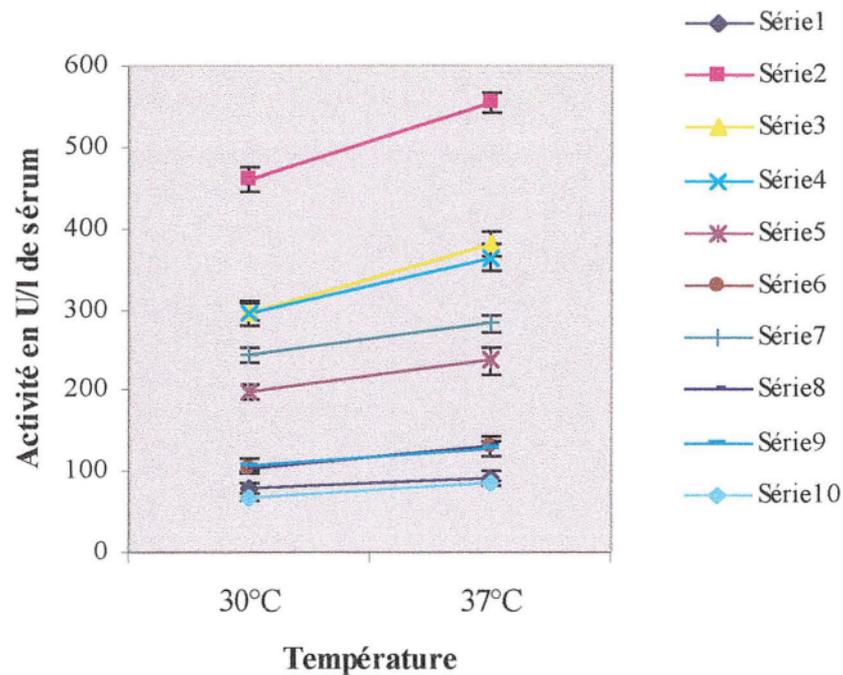


Figure 11. Activité de la paraoxonase sérique en fonction de la température.

Dosage de 10 échantillons à pH 8, dans du tampon Tris HCl (100 mM) contenant du calcium (2mM).
Résultats donnant la moyenne \pm écart type (n = 5).

Nous avons choisi de travailler à 30°C en cuve thermostatée (comme les conventions internationales en chimie clinique le préconisent).

5. Influence du calcium

Nous avons testé (à pH 8) l'effet du calcium sur l'activité en dosant la paraoxonase sur des échantillons prélevés sur EDTA et sur tube sec, puis traités en tampon Tris HCl avec ou sans apport de calcium (concentration en calcium dans le tampon de 0 à 10 mM) (figure n°12).

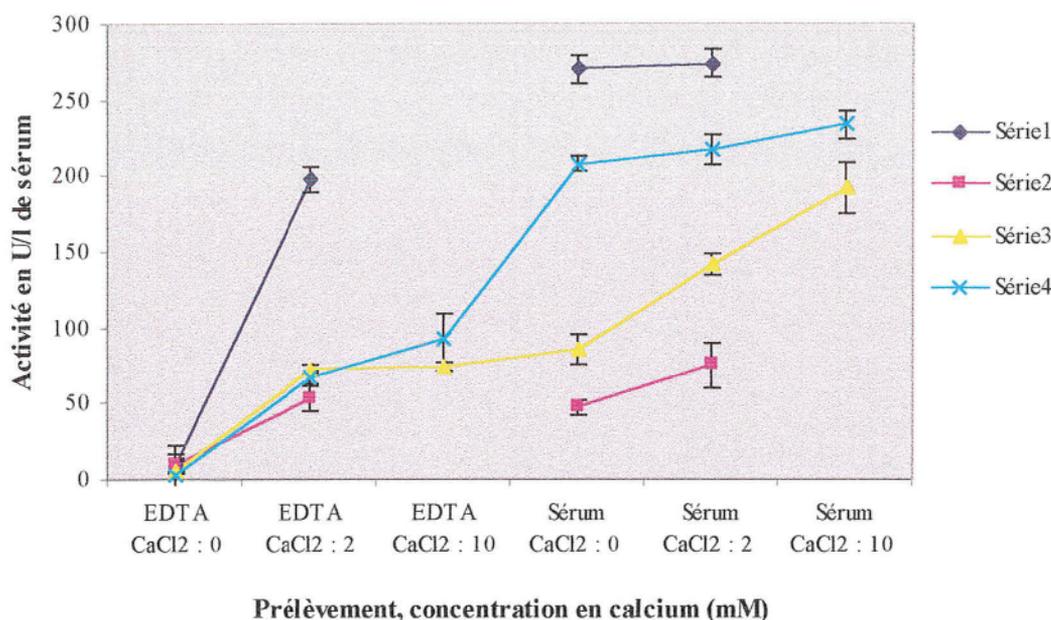


Figure 12. Influence du calcium. Activité de la paraoxonase sérique en fonction du prélèvement et de la teneur en calcium dans le tampon.

Dosage de 4 échantillons à pH 8, 30°C, dans du tampon Tris HCl (100 mM).
Résultats donnant la moyenne \pm écart type (n = 5).

Lorsque le prélèvement est effectué sur EDTA et sans apport de calcium dans le tampon, l'activité enzymatique est nulle. Cette activité apparaît pour des concentrations en calcium dans le milieu réactionnel de 2 mM, mais ne semble pas augmenter ensuite avec un apport supérieur de calcium (10 mM).

Sur tube sec, l'activité enzymatique est mesurable sans apport de calcium dans le milieu réactionnel et est, comparée à celle observée sur EDTA avec apport de calcium, soit égale (dans 50 % des cas), soit augmentée (50 % des cas).

L'enzyme est donc bien calcium dépendante et le prélèvement sur EDTA est à proscrire.

Sur sérum, l'activité augmente entre 0 et 10 mM de calcium principalement pour les échantillons où l'activité est faible (figure n°13).

Entre 2 et 10 mM, la différence est hautement significative : $p < 0,001$ (test de Student sur la moyenne de 19 séries appariées)(figure n°14).

Nous avons retenu une concentration en calcium de 2 mM. Ceci permet de ne pas tasser toutes les valeurs d'activité et donc de préserver des différences nettes entre les activités faibles et fortes.

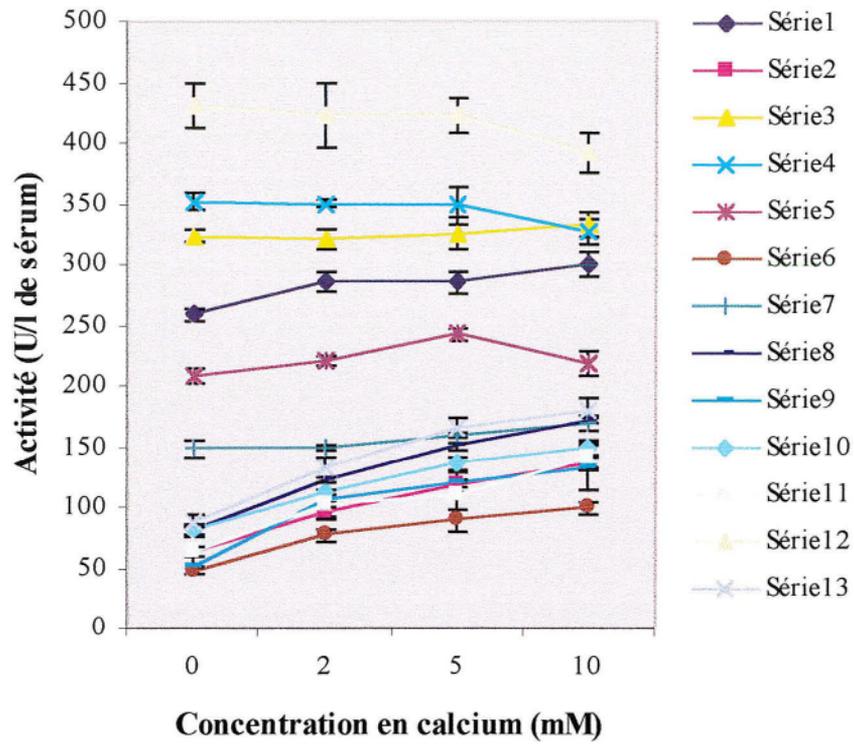


Figure 13. Activité de la paraoxonase sérique en fonction de la concentration en calcium dans le tampon.
 Dosage de 13 sérums à pH 8, à 30°C, dans du tampon Tris HCL (100 mM).
 Résultats donnant la moyenne \pm écart type (n = 5).

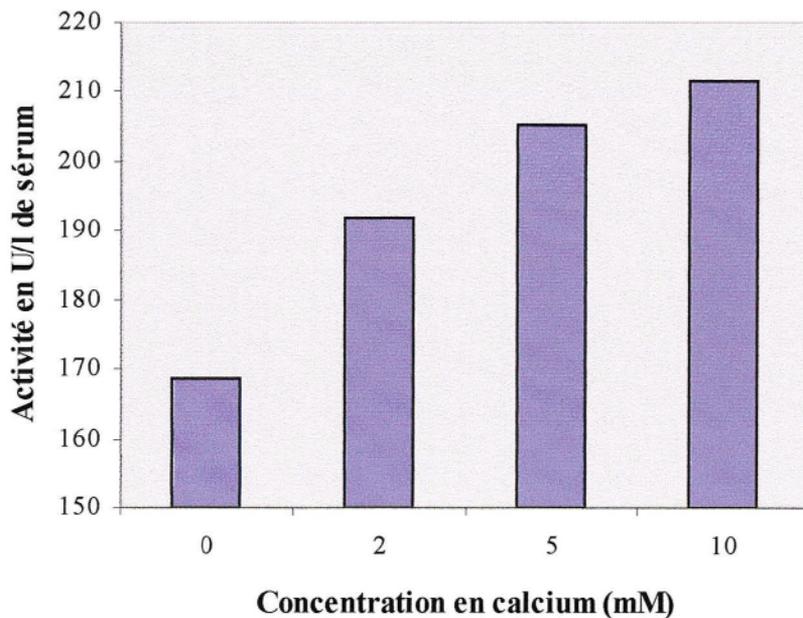


Figure 14. Activité de la paraoxonase sérique en fonction de la concentration en calcium dans le tampon.
 Moyenne des activités de 13 sérums dosés à pH 8, 30°C, dans du tampon Tris HCL (100 mM).

6. Influence du pH

L'activité de la paraoxonase, mesurée entre pH 7,2 et pH 9, augmente pour tous les sérums jusqu'à un pH de 8,6 (figure n°15). Une étude ciblée autour de cette valeur est donc nécessaire.

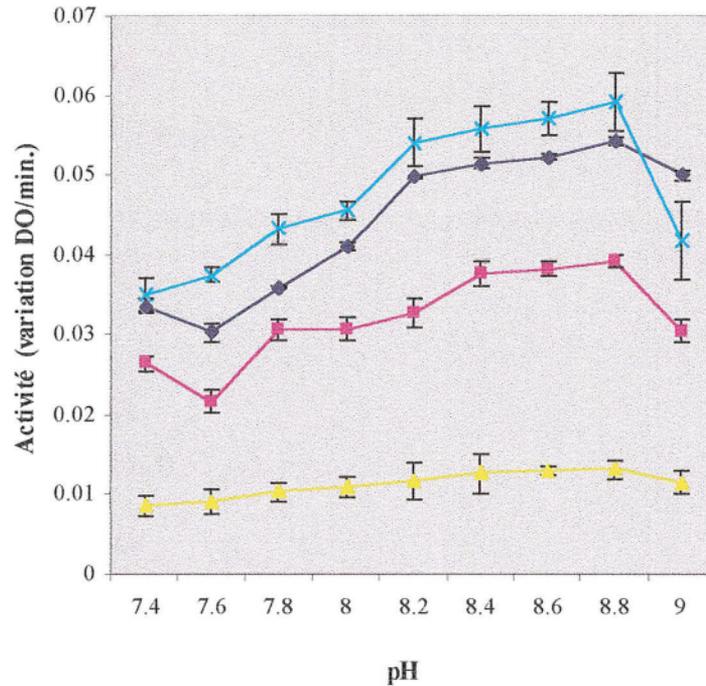


Figure 15. Activité de la paraoxonase sérique en fonction du pH.

Dosage de 4 sérums à 30°C, dans du tampon Tris HCL (100 mM), contenant du calcium (2mM).

Résultats donnant la moyenne \pm écart type (n = 5).

La figure n°16 montre les activités de 12 échantillons entre pH 8 et 9,2 rapportées à pH 8,6. Jusqu'à cette valeur de pH, l'activité augmente. Au delà, entre pH 8,6 et 9, le rapport d'activité se stabilise (variation de 10 %, dans 58 % des cas). Reste 16 % des cas où l'activité à pH 9 a augmenté dans une proportion de 10 à 40 % et d'avantage à pH plus alcalin. Par contre, dans 25 % des cas l'activité à pH 9 diminue de 10 à 30 %.

Furlong et coll. (1988) ont trouvé un pH optimal autour de 8,5. Ils ont montré que l'activité hydrolytique de la sérum albumine sur le paraoxon augmentait avec des valeurs de pH supérieures à 8,5 alors que cette activité était absente en dessous.

Nous avons donc retenu ce pH de 8,5 où il n'y a pas d'interférence avec l'albumine.

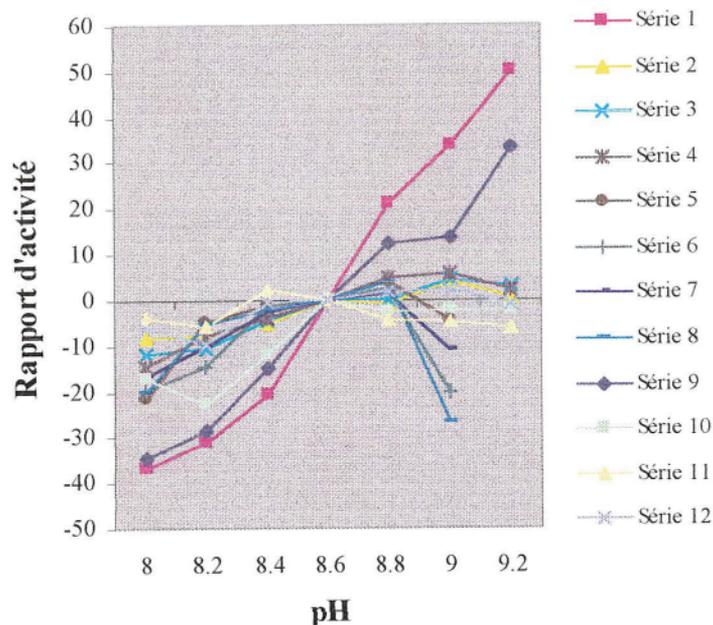


Figure 16. Pourcentage d'augmentation de l'activité de la paraoxonase sérique à différents pH, par rapport à pH 8,6.

Dosage de 12 sérums à 30°C, dans du tampon Tris HCL (100 mM), contenant du calcium (2mM).
Résultats donnant le rapport des moyennes (n = 5).

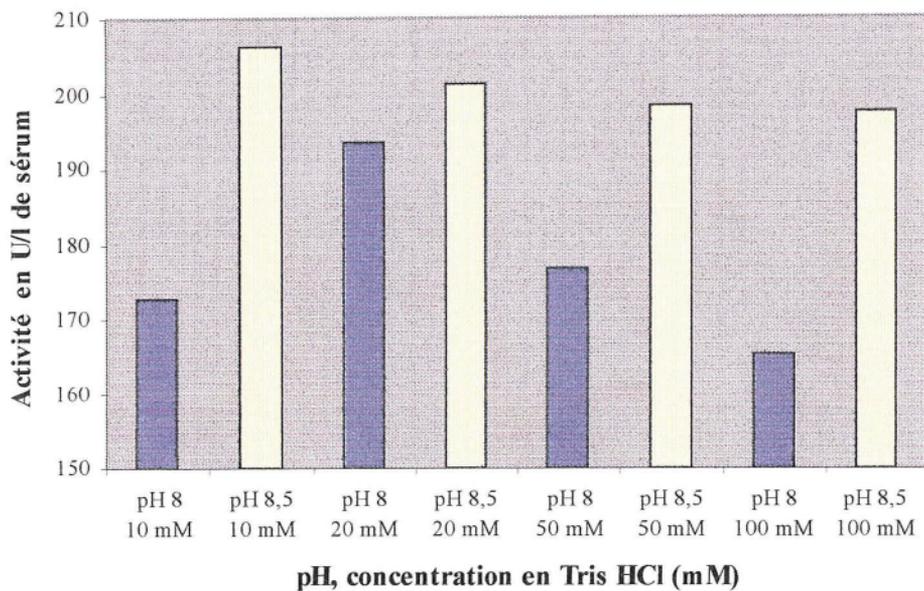


Figure 17. Influence de 2 paramètres : pH et concentration en Tris HCl sur l'activité de la paraoxonase sérique.

Moyenne des activités de 8 sérums dosés à pH 8 et 8,5, à 30°C, dans différentes concentrations de tampon Tris HCl, contenant du calcium (2mM).

7. Influence de la concentration en Tris HCl

Nous avons testé l'activité de la paraoxonase à pH 8 et 8,5 avec des concentrations en Tris HCl de 10 – 20 – 50 et 100 mM, pour des sérums à activité faible, moyenne et forte. (figure n°17)

A pH 8, l'activité est nettement supérieure à 20 mM (6 cas sur 8) et la différence entre 20 et 100 mM est hautement significative ($p < 0,001$ sur 8 séries appariées).

Par contre à pH 8,5, l'activité est similaire aux différentes concentrations en Tris HCl ($p = 0,41$ entre 20 et 100 mM en Tris HCl pour les 8 mêmes séries appariées).

Ces résultats confirment donc qu'à pH 8,5, les activités sont optimisées et ce quelque soit la concentration en Tris HCl.

Nous avons décidé de continuer à travailler en tampon Tris HCl 100 mM.

RESUME DE LA PROCEDURE OPERATOIRE

En cuves plastiques de 1 ml, nous mettons :

Bain thermostaté à 30°C	Cuve de référence	Cuves du dosage	
Tampon Tris HCl 100 mM, pH 8,5 ; CaCl ₂ : 2 mM	992 µl	982 µl	Réactifs à température ambiante
Paraoxon à 0,5 M	8 µl (soit 4,4 mM)	8 µl	Homogénéisation à l'aide d'un agitateur en plastique
Sérum		10 µl	Homogénéisation à l'aide d'un agitateur en plastique

Lecture en continu à 405 nm (intervalle de lecture de 1 min.) contre le blanc réactif avec

paraoxon (cuve de référence) pendant 10 minutes.

Activité : U/l de sérum ou variation de DO par minute

B- Substrat : phénylacétate

Lors de la détermination des conditions opératoires, nous avons travaillé à **30°C** dans du tampon **Tris Acétate (50 mM, pH 7,8)** contenant du **calcium (20 mM)** selon les indications de Ruiz et coll. (1995). De même, pour déterminer les quantités de substrat et de sérum, nous avons suivi son protocole opératoire soit 4 mM de phénylacétate et 2 μ l de sérum.

1. Concentration en substrat.

L'activité de la paraoxonase en fonction de la quantité de phénylacétate est suivie jusqu'à 30 mM où la vitesse maximale (V_{max}) est atteinte. La figure n°18 montre qu'au dessus de 10 mM, nous nous situons à 85 % de cette V_{max} .

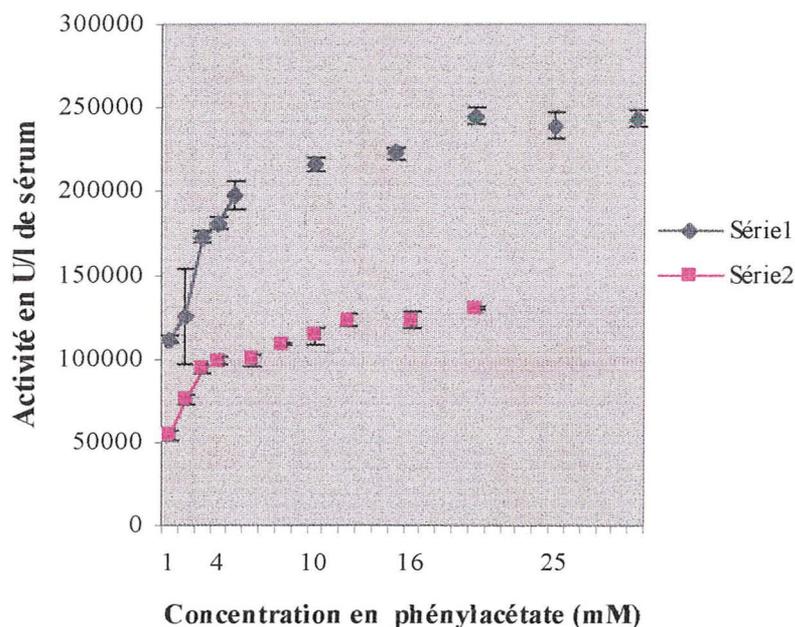


Figure 18. Activité de l'aryléstérase sérique en fonction de la concentration en phénylacétate.
Dosage de 2 sérums à pH 7,8, 30°C, dans du tampon Tris acétate (50 mM), contenant du calcium (20 mM).
Résultats donnant la moyenne \pm écart type (n = 5).

Lorentz et coll. (1979) ont montré qu'à cette concentration, le clivage non enzymatique du phénylacétate est assez élevé.

Pour augmenter la sensibilité de la méthode, nous avons retenu une concentration en phénylacétate dans la cuve de 4 mM, valeur pour laquelle nous atteignons 75 % de la V_{max} et où le volume de substrat n'est pas trop important (4 μ l d'une solution 1 M).

2. Linéarité

Une relation linéaire existe entre l'activité et la concentration enzymatique jusqu'à une absorbance de 2,5, limite de linéarité de notre spectrophotomètre. Pour des sérums à activité enzymatique forte, la lecture est rapidement impossible (dès 4 μ l) : la réaction s'effectue sur un temps trop court et l'absorbance lue est proche de 2,5. Il est donc nécessaire de diluer les sérums.

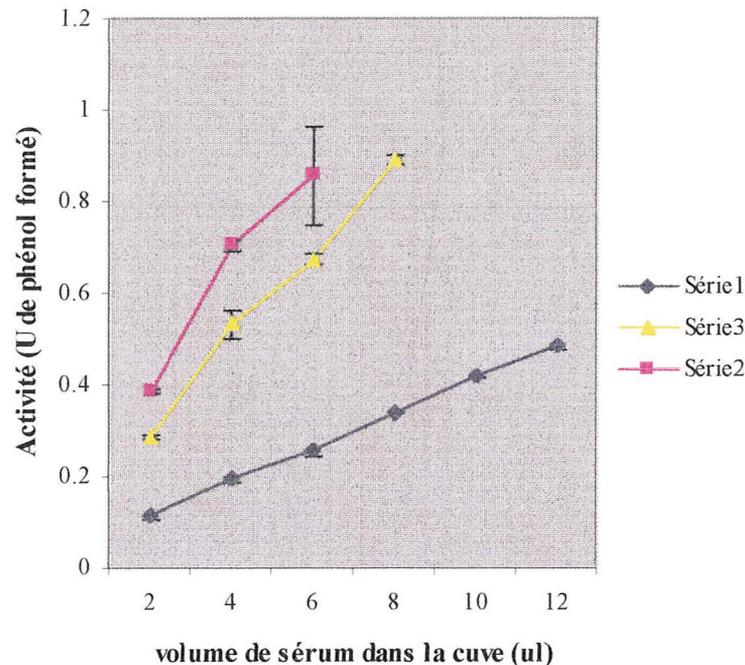


Figure 19. Linéarité . Activité de l'aryléstérase sérique en fonction du volume de sérum.
Dosage de 3 sérums à pH 7,8, 30°C, dans du tampon Tris acétate (50 mM), contenant du calcium (20 mM).
Résultats donnant la moyenne \pm écart type (n = 5).

Choix du milieu de dilution

Aucune différence significative n'est à noter quant aux résultats d'activités obtenus avec chacun des trois milieux testés (tampon Tris acétate, eau stérile, eau physiologique). Nous décidons de diluer le sérum en tampon Tris acétate.

Choix de la dilution

Pour éviter tout problème de lecture, nous décidons de travailler avec 5 μ l de sérum dilué au 1 / 10 dans du tampon, ce qui représente une dilution finale au 1 / 2000 de notre échantillon dans le milieu réactionnel.

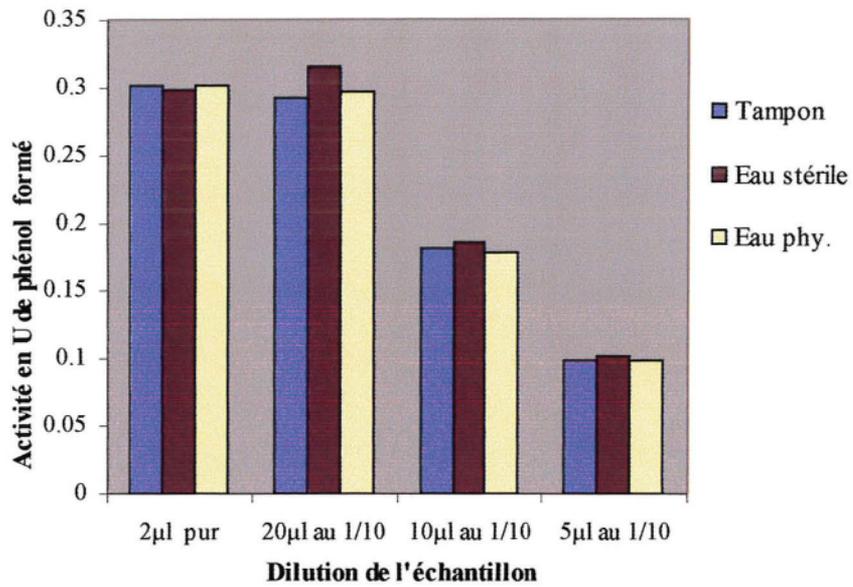


Figure 20. Comparaison des milieux de dilution de l'échantillon. Activité arylestérase en fonction de la dilution et du milieu de dilution.
Moyenne des activités de 3 sérums dosés à pH 7,8, 30°C, dans du tampon Tris acétate (50 mM), contenant du calcium (20 mM).

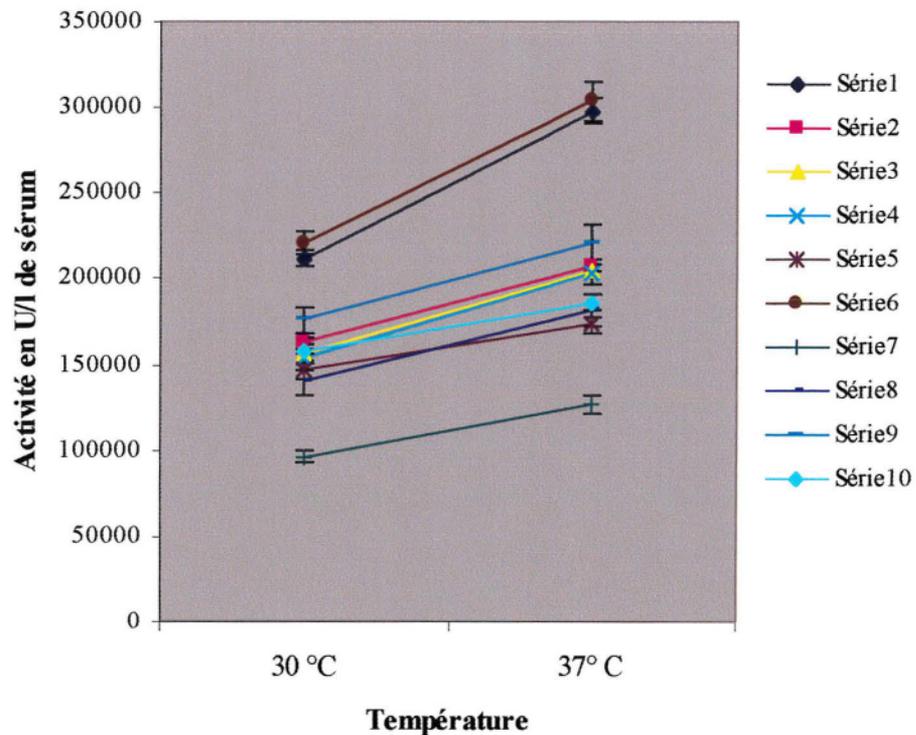


Figure 21. Activité de l'arylestérase sérique en fonction de la température.
Dosage de 10 échantillons à pH 7,8, 30°C, dans du tampon Tris acétate (50 mM), contenant du calcium (20 mM).
Résultats donnant la moyenne \pm écart type (n = 5).

3. Etude de la linéarité de la réaction en fonction du temps d'incubation

Les concentrations en substrat et en sérum étant définies, la linéarité a été suivie pour différents temps d'incubation, et différents temps de lecture.

Nous avons trouvé la meilleure linéarité et la plus forte activité quand les mesures sont effectuées entre 0 et 6 minutes.

4. Influence de la température

La figure n°21 montre l'activité de 10 échantillons testés aux températures les plus utilisées : 30 et 37°C. Cette activité est supérieure à 37°C et augmente de 16 à 29 % ce qui est hautement significatif ($p < 0,001$)

Nous avons choisi de travailler à 30°C en cuve thermostatée (comme des conventions internationales en chimie clinique le préconisent).

5. Influence du pH

L'activité de la paraoxonase mesurée entre pH 7,4 et pH 8,8, augmente jusqu'à pH 7,8 puis diminue nettement (figure n°22). Nous avons donc retenu ce pH optimal de 7,8.

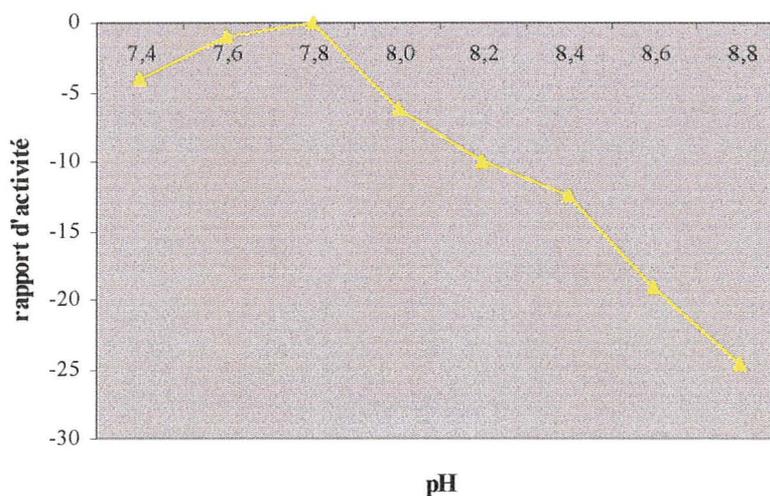


Figure 22. Courbe "caractéristique" de la variation de l'activité de l'arylestérase sérique en fonction du pH. Dosage à 30°C, dans du tampon Tris acétate (50 mM), contenant du calcium (20 mM).

6. Influence du calcium

La figure montre que l'EDTA inhibe complètement l'activité de la paraoxonase. Cette activité n'est d'ailleurs pas restaurée par l'addition de 20 mM de calcium dans le milieu réactionnel.

Sur sérum, l'activité croît avec l'addition de 10 mM de calcium mais reste quasiment stable par la suite.

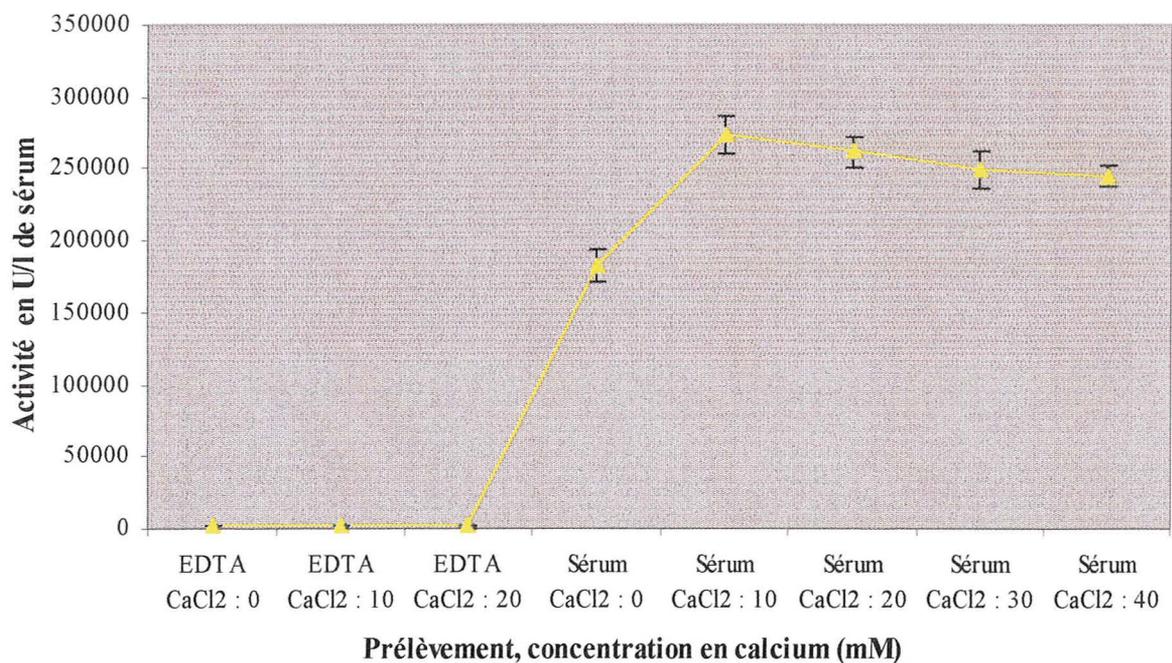


Figure 23. Courbe caractéristique de l'influence du calcium. Activité de l'arylestérase en fonction du prélèvement et de la teneur en calcium dans le tampon.

Dosage à pH 7,6, 30°C, dans du tampon Tris acétate (50 mM).

Résultats donnant la moyenne ± écart type (n = 5).

Nous continuerons donc à travailler dans du tampon Tris acétate contenant 20 mM de calcium.

RESUME DE LA PROCEDURE OPERATOIRE

En cuve quartz de 1ml, nous mettons :

Bain thermostaté à 30°C	Cuve de référence	Cuves du dosage	Réactifs à température ambiante,
Tampon Tris Acétate 50 mM, pH 7,8 ; CaCl ₂ : 20 mM	996 µl	991 µl	Tampon à 30°C
Phénylacétate (1M)	4 µl (soit 4,4 mM)	4 µl	Agitation
Sérum		5 µl dilué au 1/10	Agitation

Lecture en continu pendant 6 minutes (intervalle de lecture d'1 min.) à 270 nm contre un blanc réactif avec phénylacétate

Activité : U/l de sérum

II- Essais de conservation

Les essais de conservation, effectués avec les deux substrats, ont porté sur 10 échantillons conservés 15 jours à + 4°C (réfrigérateur) ou 3 mois à - 20°C. Les résultats montrent une bonne conservation de l'activité enzymatique arylestérase - paraoxonase, que ce soit pour les échantillons mis au réfrigérateur ou congelés (figure n°24 et 25).

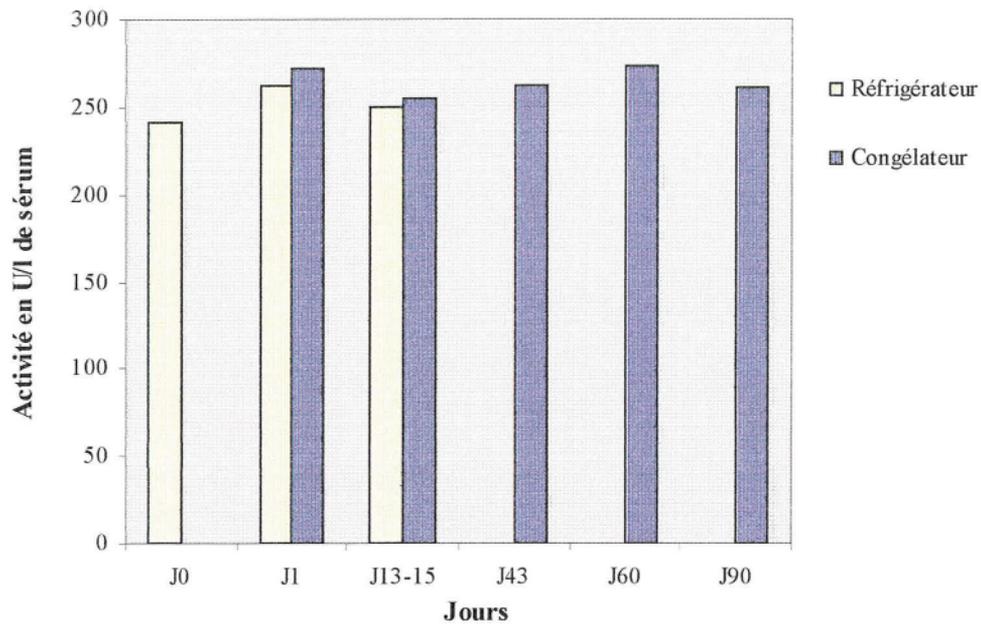


Figure 25. Conservation de l'activité de la paraoxonase sérique au réfrigérateur et congélateur.
Moyenne des activités de 10 sérums dosés à pH 8,5, 30°C, dans du tampon Tris HCl (100 mM), contenant du calcium (2 mM).

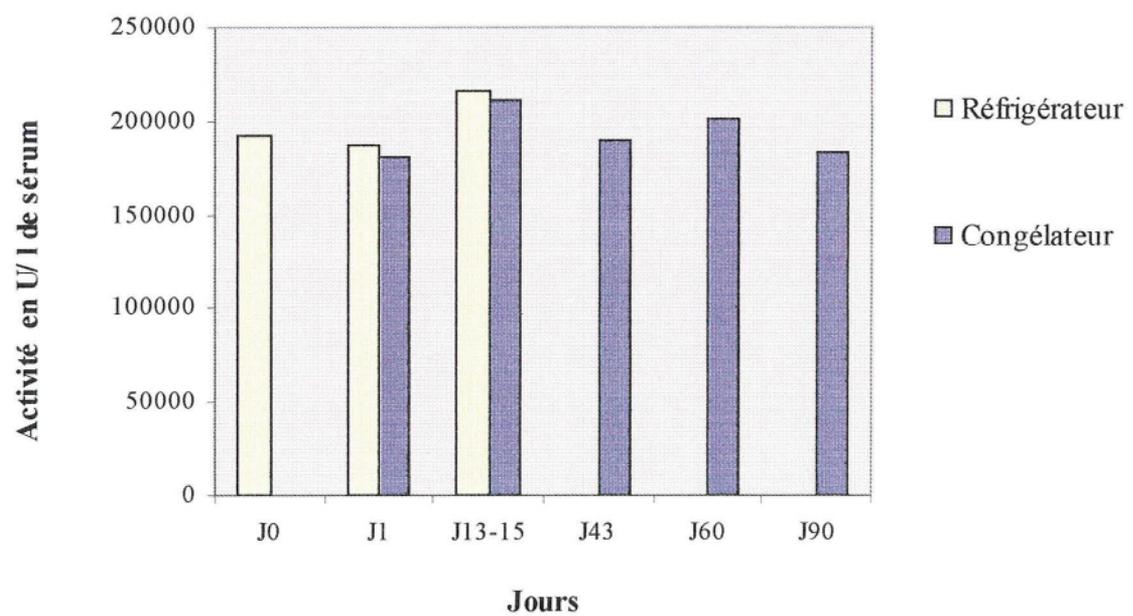


Figure 24. Conservation de l'activité de l'arylestérase sérique au réfrigérateur et au congélateur.
Moyenne des activités de 10 sérums dosés à pH 8,5, 30°C, dans du tampon Tris acétate (50 mM), contenant du calcium (20 mM).

III- Essais de répétabilité - Précision

Les essais de répétabilité sont basés sur 30 déterminations manuelles.

Sur les figures n°26 et 27 sont représentées pour chaque sérum dont le coefficient de variation (CV) est indiqué en légende, les valeurs obtenues pour chaque dosage, ainsi que leur moyenne ± 2 écart type de la moyenne.

Les coefficients de variation CV obtenus le même jour par un même technicien pour les dosages des sérums considérés sont inférieurs à 5 %. Les répétabilités des dosages des activités arylestérase et paraoxonase sont donc satisfaisantes.

IV- Déterminations de la constante de Mickaelis

Comme le montrent les figures n°28 et 30, la représentation de Lineweaver-Burk $\{1/V = f(1/S)\}$ a servi à la détermination de la constante de Mickaelis (K_m) de la paraoxonase et de l'arylestérase. Des concentrations faibles en substrats ont été utilisées (entre 0,1 et 1 mM pour le paraoxon et entre 0,1 et 2 mM pour le phénylacétate).

Nous avons déterminé ces constantes de Mickaelis pour différents échantillons provenant de sujets apparemment sains, de génotypes AA (4 sérums), AB (3 sérums), BB (2 sérums). Comme nous pouvons le voir sur les tableaux 7-8-9, les K_m sont de l'ordre du mM pour les deux substrats avec une affinité de l'enzyme légèrement supérieure pour le paraoxon ($K_m = 0,55$ mM pour le paraoxon contre 1,25 mM pour le phénylacétate pour le génotype AB). Les constantes de vitesses ne diffèrent pas réellement entre génotypes. On peut toutefois noter une tendance à une diminution du K_m (et donc une augmentation de l'affinité) en comparant les génotypes AA et BB, et ce pour les deux enzymes (pour le phénylacétate, $K_m = 1,5$ mM pour le génotype AA, et 0,85 mM pour le génotype BB).

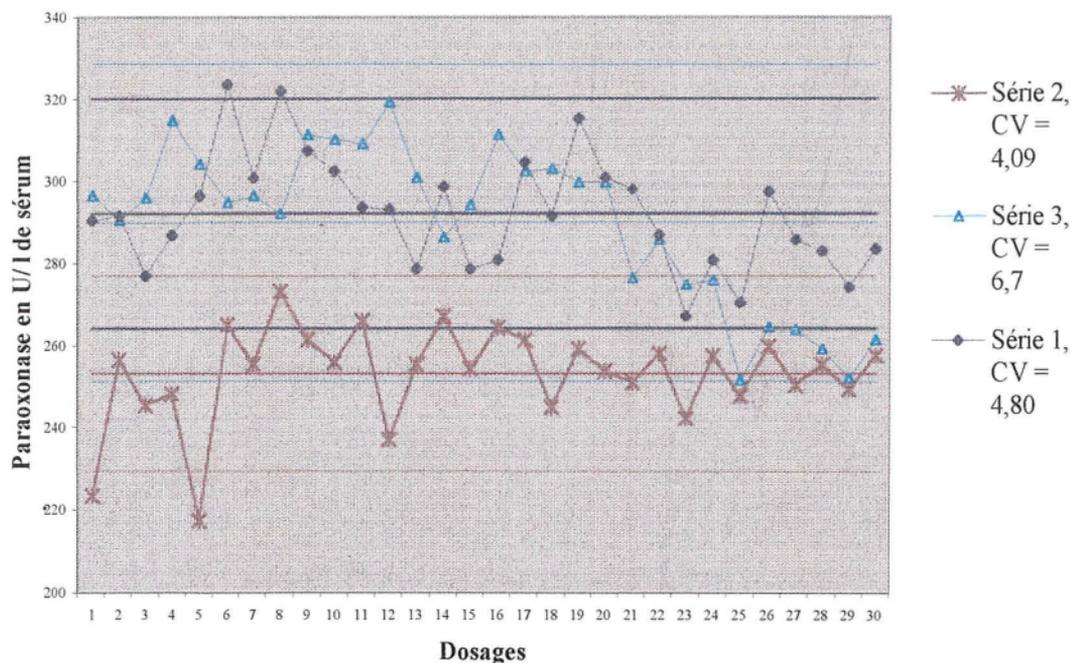


Figure 26. Répétabilité. Activité de la paraoxonase sérique avec moyenne +/- 2 écart type pour chaque série.
 Dosages de 3 sérums à pH 8,5, 30°C, dans du tampon Tris HCl (100 mM), contenant du calcium (2 mM)

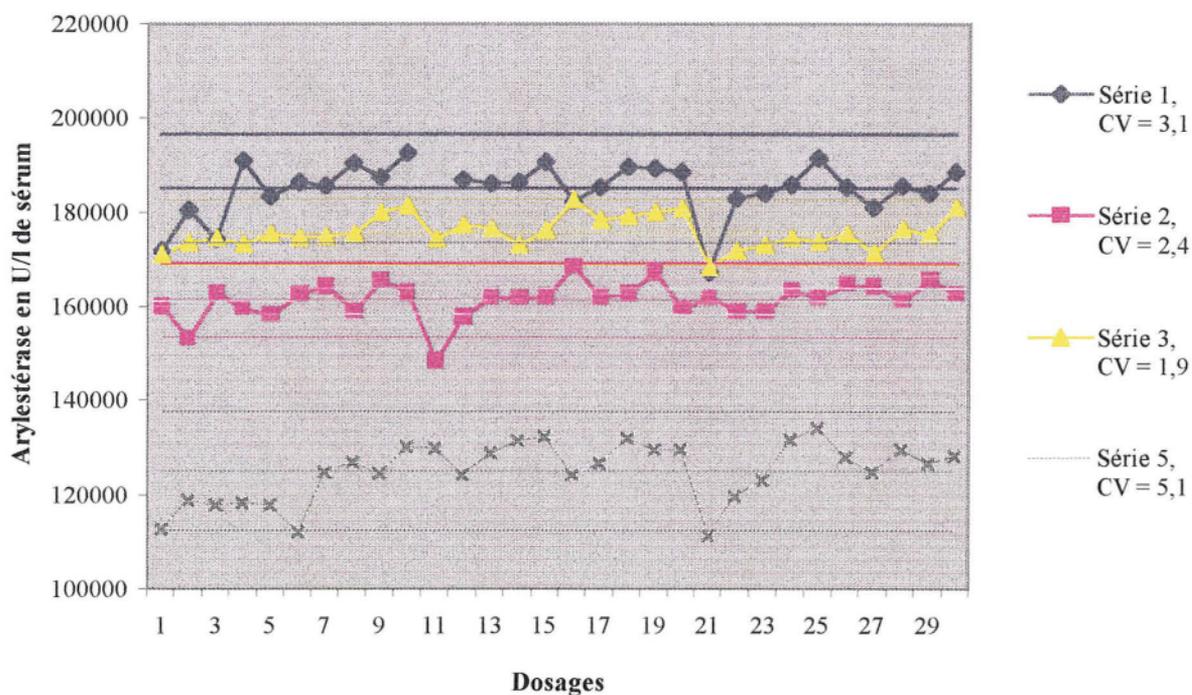


Figure 27. Répétabilité. Activité de l'arylestérase sérique avec moyenne +/- 2 écart type pour chaque série.
 Dosages de 3 sérums à pH 7,8, 30°C, dans du tampon Tris acétate (50 mM), contenant du calcium (20 mM)

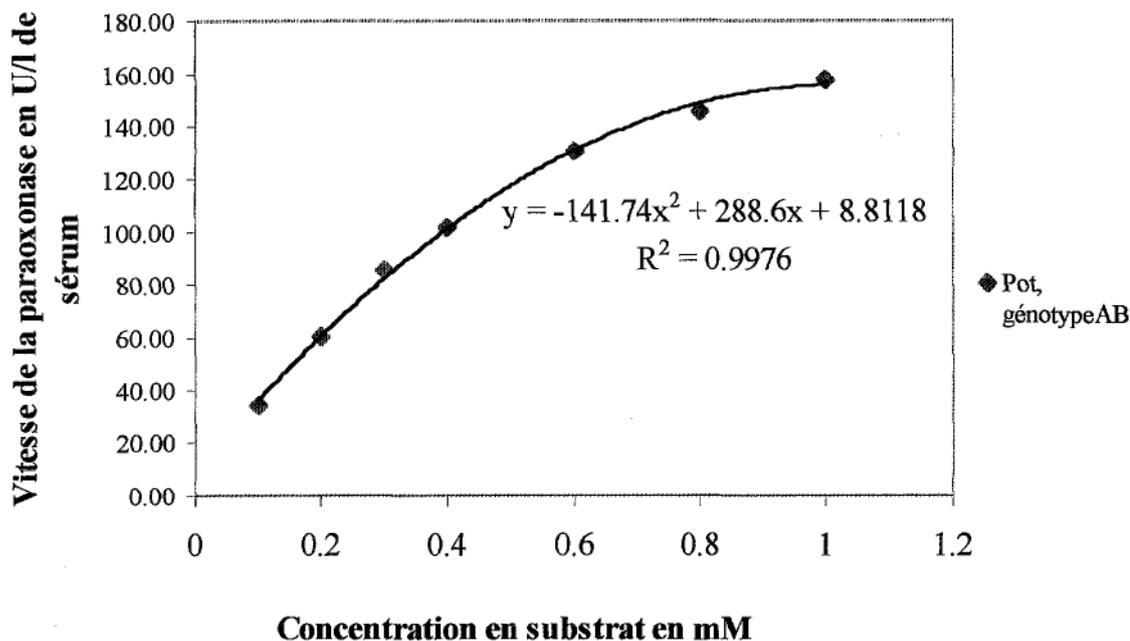


Figure 28. Courbe de Michaelis-Menten. Evolution de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en paraoxon.
 Dosage de l'activité de la paraoxonase sérique d'un sujet de génotype AB. Dosage à pH 8,5, 30°C, dans du tampon Tris HCl (100 mM), contenant du calcium (2 mM).

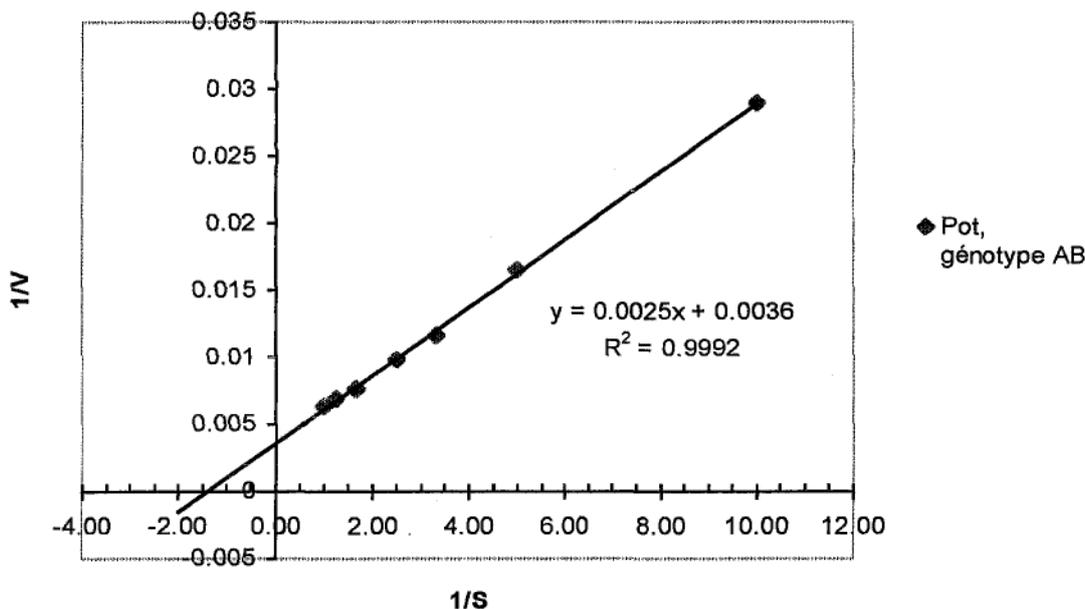


Figure 29. Représentation de Lineweaver-Burk pour la détermination du Km.

La droite coupe l'axe des ordonnées en $1/V_{max}$ et l'axe des abscisses en $-1/K_m$.

Quand $1/V = 0$, $1/S = -1/K_m = -1,44$ donc $K_m = 0.69$ mM.

Quand $1/S = 0$, $1/V = 1/V_{max} = 0,0036$ donc $V_{max} = 278$ U/l de sérum.

Nous travaillons avec une concentration en paraoxon de 5,45 mM, soit S proche de 10 Km.

Nous nous situons donc à 90 % de la V_{max} .

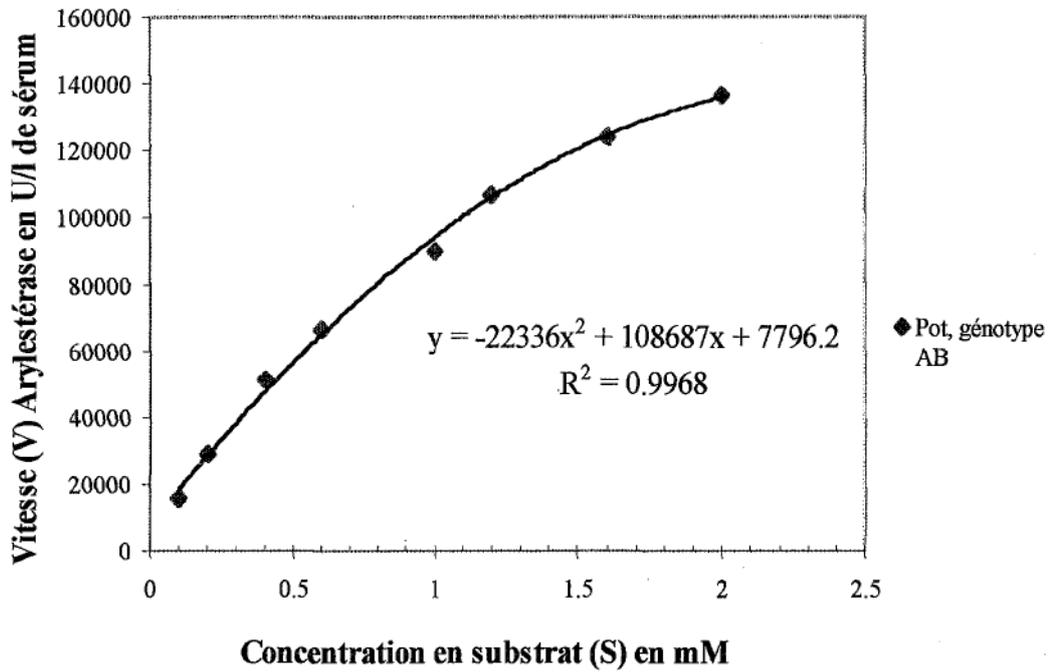


Figure 30. Courbe de Michaelis-Menten. Evolution de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en phénylacétate.
 Dosage de l'activité de l'aryléstérase sérique d'un sujet de génotype AB. Dosage à pH 7,8, 30°C, dans du tampon Tris acétate (50 mM), contenant du calcium (20 mM)

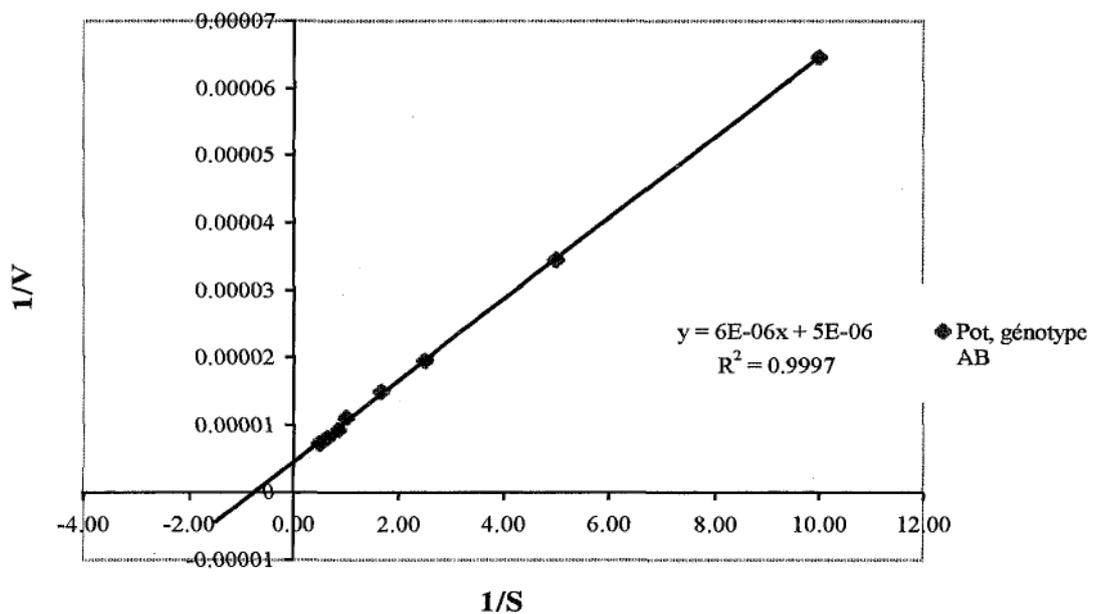


Figure 31. Représentation de Lineweaver-Burk pour la détermination du Km.
 La droite coupe l'axe des ordonnées en $1/V_{max}$ et l'axe des abscisses en $-1/K_m$.
 Quand $1/V = 0$, $1/S = -1/K_m = -0,83$ donc $K_m = 1,20$ mM.
 Quand $1/S = 0$, $1/V = 1/V_{max} = 5 \cdot 10^{-6}$ donc $V_{max} = 200000$ U/l de sérum.
 Nous travaillons avec une concentration en phénylacétate de 4 mM, soit $S = 4 K_m$.
 Nous nous situons donc à 80 % de la V_{max} .

Génotype AA	Constantes (Km en mM)	
	Paraoxon	Phénylacétate
Bla	0,50	1,80 (1,33)
Cuc	0,84	1,00
Gav	0,32	2,00
Ric	1,03	2,66 (1,75)
Conclusion	0,30 → 1,00 Km = 0,65 ± 0,35 mM	1,00 → 2,00 Km = 1,50 ± 0,50 mM

Tableau 7 Constantes de Mickaelis de la paraoxonase et de l'arylestérase pour le génotype AA

Génotype AB	Constantes (Km en mM)	
	Paraoxon	Phénylacétate
Ave	0,50	1,25
Ler	0,47	1,50 (1)
Pot	0,69	1,20
Conclusion	0,40 → 0,70 Km = 0,55 ± 0,15 mM	1,20 → 1,50 Km = 1,25 mM

Tableau 8 Constantes de Mickaelis de la paraoxonase et de l'arylestérase pour le génotype AB

Génotype BB	Constantes (Km en mM)	
	Paraoxon	Phénylacétate
Del	0,47 - 0,51	0,71 - 0,50
Lef	0,50 - 0,58	1,00 - (2)
Conclusion	0,50 Km = 0,5 mM	0,70 - 1,0 Km = 0,85 ± 0,15 mM

Tableau 9 Constantes de Mickaelis de la paraoxonase et de l'arylestérase pour le génotype BB

Tableaux (7-8-9) récapitulatifs des Km en fonction du génotype et du substrat. Les valeurs données après tiret – sont celles déterminées sur une deuxième série de mesures, celles entre parenthèse sont obtenues en supprimant la concentration en substrat la plus faible. La suppression de ce dernier point a pu s'avérer nécessaire lorsque le coefficient de corrélation de la droite de Lineweaver-Burk était inférieur à 0,99 (Lef. ; génotype BB) ou quand les variations d'absorbance lues étaient très faibles (activité trop faible pour cette concentration en substrat : génotype AA)

V- Mesure des activités paraoxonase - arylestérase dans les fractions de lipoprotéines

A- Influence du KBr sur l'activité

L'addition de KBr étant toujours une étape nécessaire pour ajuster la densité et permettre la séparation des lipoprotéines par UC, nous avons testé son influence sur les activités arylestérase - paraoxonase. La figure n°32 montre, pour les deux substrats, l'activité de l'enzyme à la densité finale rapportée à la densité initiale du sérum soit 1,006 g / ml. La baisse d'activité est maximale pour une densité ajustée à 1,21 g / ml avant UC. Dans ce cas, l'activité paraoxonase est en moyenne diminuée de 11 %, et l'activité arylestérase de 33 %.

Dans nos comptes-rendus de résultats d'activité, cette baisse, variable d'un sujet à l'autre et moindre lors de séparations par flottations successives, n'a pas été prise en compte.

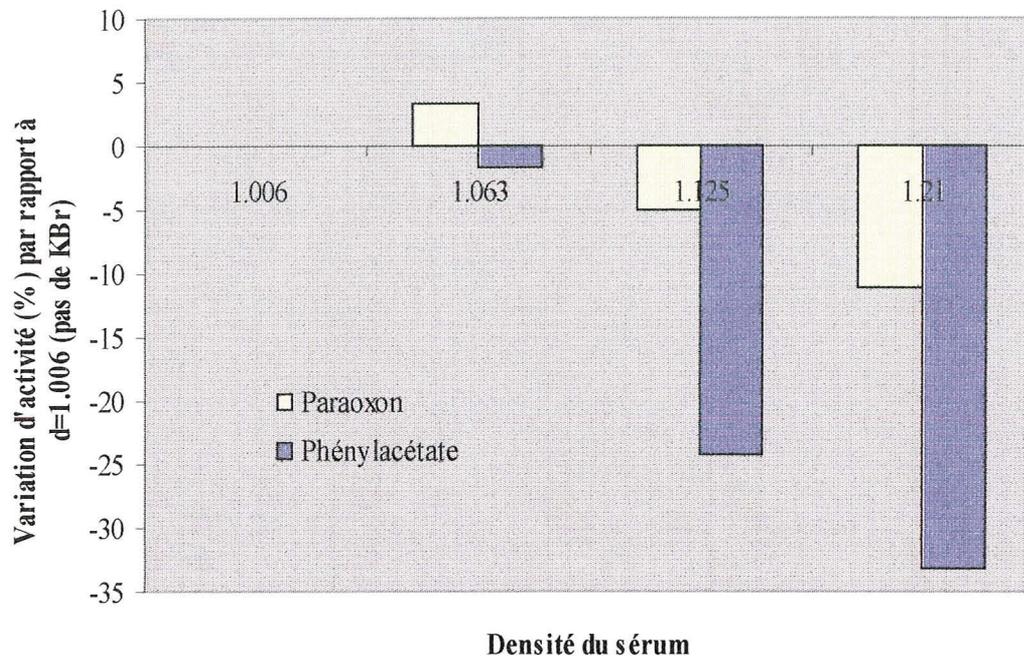


Figure 32 Influence du KBr sur l'activité de la paraoxonase et de l'arylesterase.
Moyenne des activités enzymatiques de 9 sérums.

B- Influence de la dialyse

Nous avons effectué des dialyses sur les fractions obtenues après UC en espérant éliminer le KBr et retrouver ainsi une activité enzymatique proche de celle mesurée initialement dans le sérum.

Une ultracentrifugation de flottation à la densité 1,063 g / ml permettant de séparer les LDL de leur sous-nageant (SN-LDL) c'est-à-dire **HDL_{Total} + protéines** est tout d'abord appliquée.

Ensuite, une dialyse contre NaCl 9‰ est effectuée sur ce sous nageant. L'activité de la paraoxonase est mesurée avant et après dialyse. La figure n°33 montre que la dialyse entraîne une perte de 85% de l'activité.

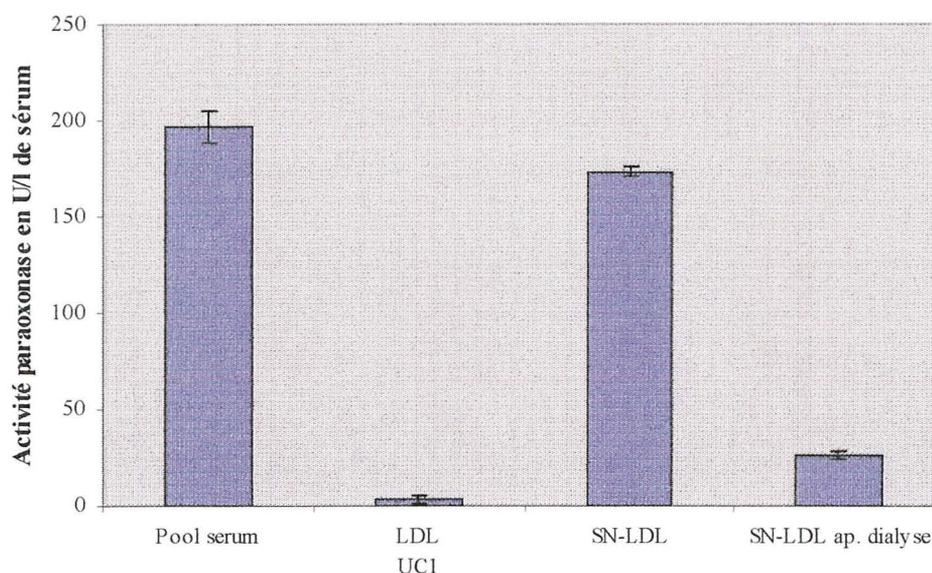


Figure 33. Influence de la dialyse contre NaCl 9‰ sur l'activité de la paraoxonase.

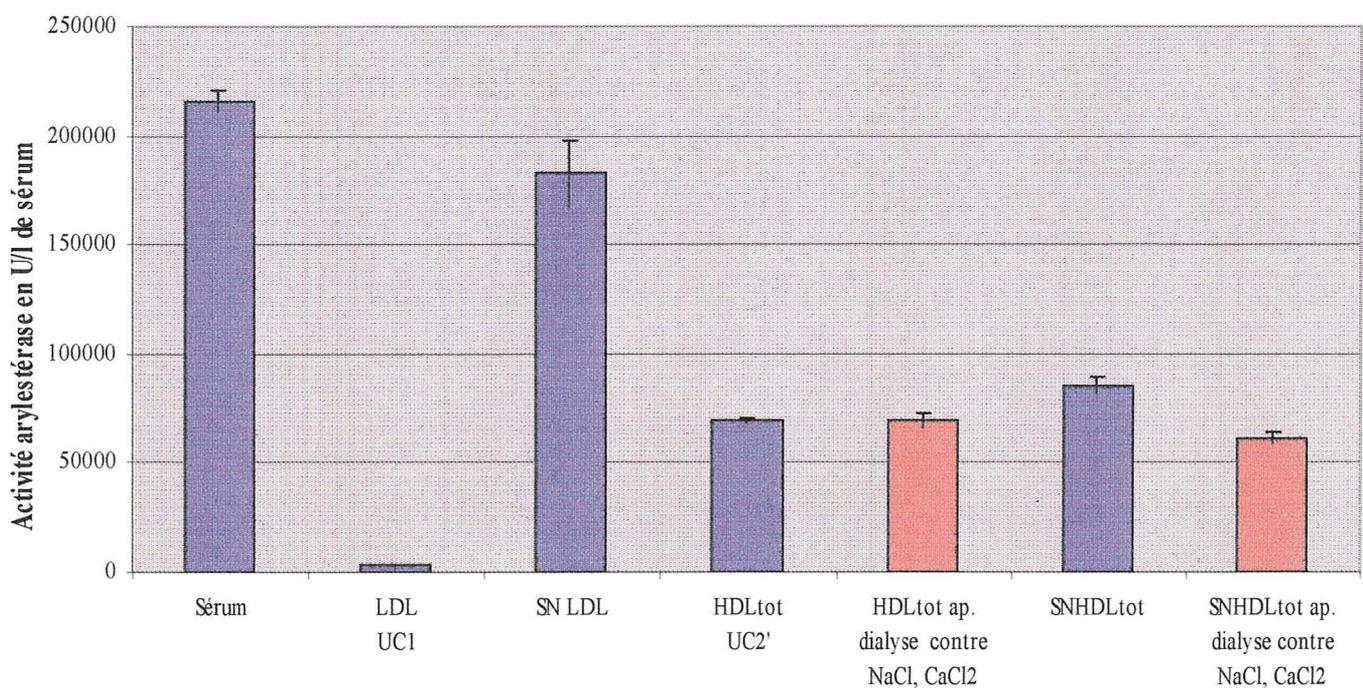
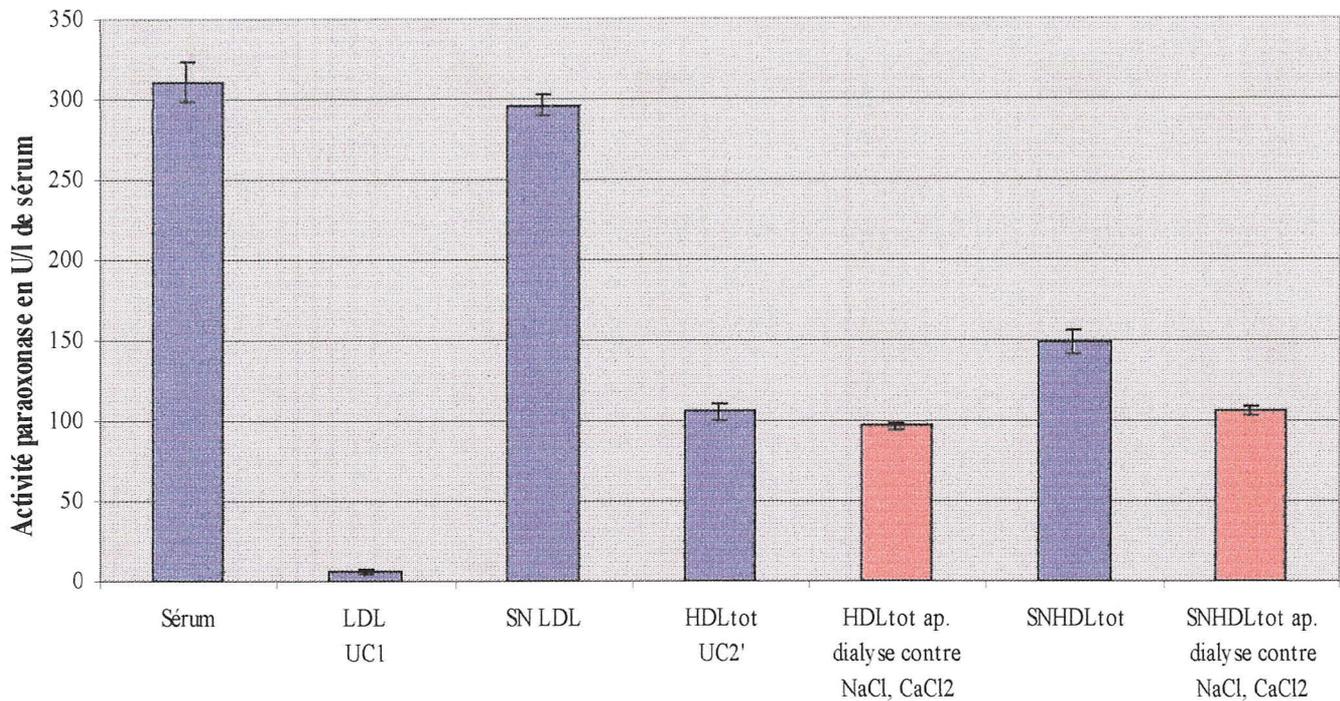
L'activité est mesurée à pH 8,5, 30°C, dans du tampon Tris HCl (100 mM), contenant du calcium (2 mM). Une ultracentrifugation de flottation à la densité 1,063 g / ml (UC à 100000 trs / min., 10°C, 2H) permet la séparation des LDL de leur sous-nageant (SN-LDL = HDL_{Total} + protéines). Une dialyse contre NaCl 9‰ est effectuée sur ce sous-nageant. Résultats donnant la moyenne ± écart type (n = 5).

Incriminant l'absence de calcium dans le bain de dialyse pour responsable de cette perte d'activité, une autre expérience a été faite avec dialyse contre NaCl 9‰ et une concentration en CaCl₂ de 2,4 mM.

Les figures n°34 a et b montrent que les activités de la paraoxonase et de l'arylestérase, sur les HDL_{total} et leur sous-nageant les protéines, sont comparables avant et après ce type de dialyse.

La dialyse ne rétablit donc pas la petite perte d'activité engendrée par le KBr et est donc inutile.

Les activités enzymatiques mesurées dans les HDL_{total} et leur sous-nageant étant pratiquement identiques, nous avons modifié quelque peu la méthode de fractionnement. Les densités sont ajustées à partir des densités salines et non des densités mesurées des sous-nageants, lesquelles prenaient en compte les protéines. Nos résultats (non présentés dans cette thèse) associant activités enzymatiques, concentration en apo AI, et identification en électrophorèse des différentes fractions, montrent une séparation HDL – protéines beaucoup plus satisfaisante lorsque nous travaillons à partir des densités salines



Figures 34 a et b. Influence de la dialyse contre NaCl 9 ‰ et CaCl₂.

Les HDL_{totaux} sont séparées de leur sous-nageant par deux UC de flottations successives (UC₁ à la densité 1,063 g / ml puis sur le sous-nageant des LDL, UC₂ à la densité 1,210 g / ml). Les densités initiales prennent en compte les protéines. Une dialyse contre NaCl 9 ‰ et CaCl₂ 2,4 mM, est appliquée sur les HDL_{totaux} et leur sous-nageant.

- L'activité paraoxonase est mesuré à pH 8,5, 30°C, dans du tampon Tris HCl (100 mM), contenant du calcium (2mM).
- L'activité arylestérase est mesuré à pH 7,8, 30°C, dans du tampon Tris acétate (50 mM), contenant du calcium (20mM)

C- Activité dans les différentes fractions

Les figures 35 a et b montrent les activités arylestérase - paraoxonase mesurées dans les différentes fractions de lipoprotéines.

Les lipoprotéines sont séparées par séries d'ultracentrifugation de flottation successives comme décrit dans le chapitre "Matériels et Méthodes" (figure n° 8). La première ultracentrifugation (UC1) s'effectue à la densité 1,063 g / ml. Sur le SN des LDL est effectuée une UC (UC₂) à la densité 1,125 g / ml (séparation HDL₂ des HDL₃ + protéines) d'une part et une UC (UC_{2'}) à la densité 1,210 g / ml (séparation HDL_{Totaux} des protéines). Sur le SN des HDL₂, les HDL₃ sont séparées des protéines par une UC à la densité 1,210 g / ml (UC₃).

Les fractions sont identifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de gradient 2 - 20 % (figure n°36).

Parallèlement, l'apo AI et les protéines sont mesurées dans les différentes fractions (figures n°37 et 38).

Après les séries d'UC 1 - 2 et 3, environ 62 % de l'activité arylestérase ou paraoxonase est retrouvée dans les HDL₃, 28 % dans les protéines et 10 % dans les HDL₂. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide révèle toutefois que la fraction HDL₂ contient également des HDL₃. La contamination des HDL₃ par les HDL₂ est par contre moins franche. Aucune sous-fraction d'HDL n'est retrouvée dans les protéines. L'apo AI se trouve principalement dans les HDL (85 %) avec une répartition égale entre HDL₂ et HDL₃.

Les activités enzymatiques ont de plus été dosées sur chaque fraction de 100 µl récupérées après les ultracentrifugations successives 2 et 3 : UC₂ à la densité 1,125 g / ml sur le SN-LDL (figure n°39a) et UC₃ à la densité 1,21 g / ml sur le SN-HDL₂ (figure n°40a). Parallèlement, ces fractions ont été identifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient 2 - 20 % (figure n°39b et 40b).

La figure n°39 montre que notre fraction HDL₂ est contaminée par des HDL₃ dès les 100 premiers microlitres (F1). L'activité enzymatique associée à cette fraction HDL₂ est donc bien inférieure à 10 %.

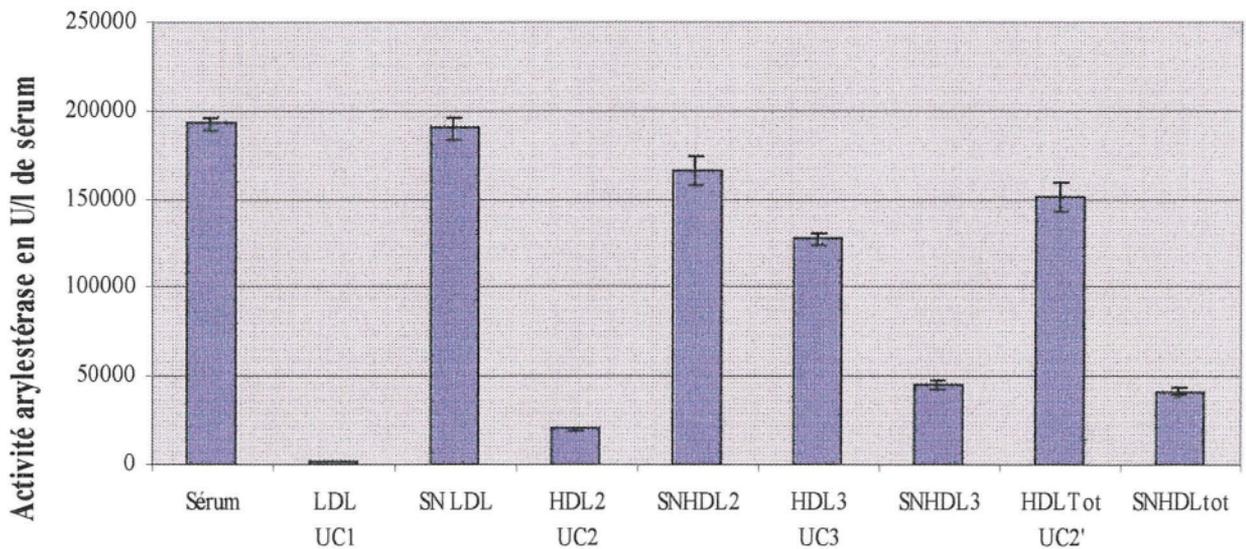
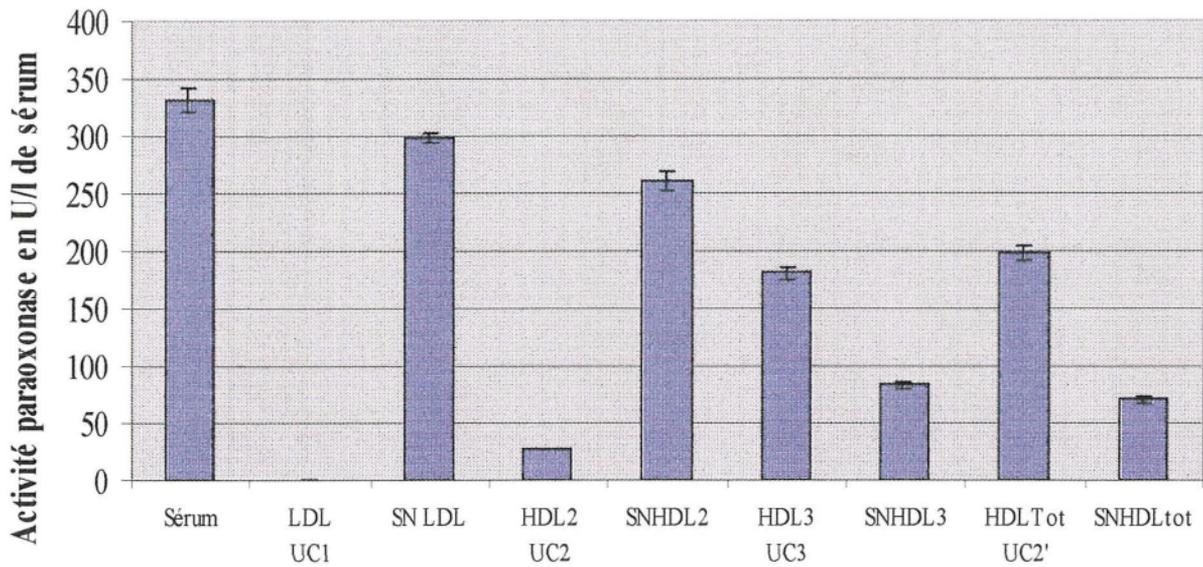


Figure 35 a et b. Activités de la paraoxonase et de l'arylestérase dans les fractions après ultracentrifugations.

Une ultracentrifugation de flottation à la densité 1,063 g / ml (UC₁ à 100000 trs / min., 10°C, 2H) permet la séparation des LDL de leur sous-nageant (SN-LDL = HDL_{Total} + protéines). Une ultracentrifugation de flottation à la densité 1,125 g / ml sur le SN des LDL, (UC₂ à 100000 trs / min., 10°C, 6H) permet la séparation des HDL₂ de leur sous-nageant (SN-HDL₂ = HDL₃ + protéines). Une ultracentrifugation de flottation à la densité 1,210 g / ml sur le SN des LDL, (UC₂ à 100000 trs / min., 10°C, 6H) permet la séparation des HDL_{Total} de leur SN (SN-HDL_{tot} = protéines).

L'activité paraoxonase est mesurée à pH 8,5, 30°C, dans du tampon Tris HCl (100 mM), contenant du calcium (2 mM).

L'activité arylestérase est mesurée à pH 7,8, 30°C, dans du tampon Tris Acétate (50mM), contenant du calcium (20mM). Résultats donnant la moyenne ± écart type (n = 5).

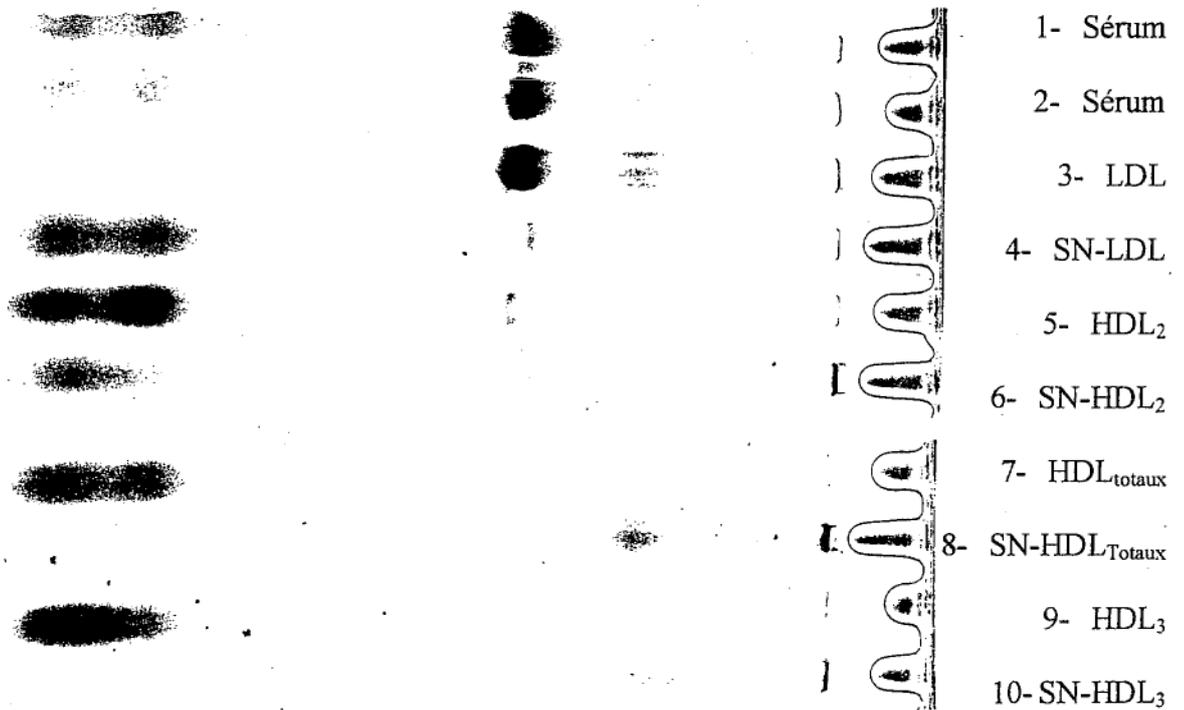


Figure 36. Electrophorèse en gel de polyacrylamide de gradient 2-20 %.
 Sérum (puits 1-2),

Fractions obtenues après UC₁ à la densité 1,063 g / ml (LDL : puits 3 ; SN-LDL : puits 4),
 Fractions obtenues après UC₂ à la densité 1,125 g / ml sur le SN LDL (HDL₂ : puits 5 ; SN-HDL₂ : puits 6),
 Fractions obtenues après UC₂ à la densité 1,210 g / ml sur le SN LDL (HDL_{total} : puits 7 ; SN-HDL_{total} : puits 8),
 Fractions obtenues après UC₃ à la densité 1,210 g / ml sur le SN HDL₂ (HDL₃ : puits 9 ; SN-HDL₃ : puits 10)
 Les activités correspondantes sont représentées sur les figures 35.

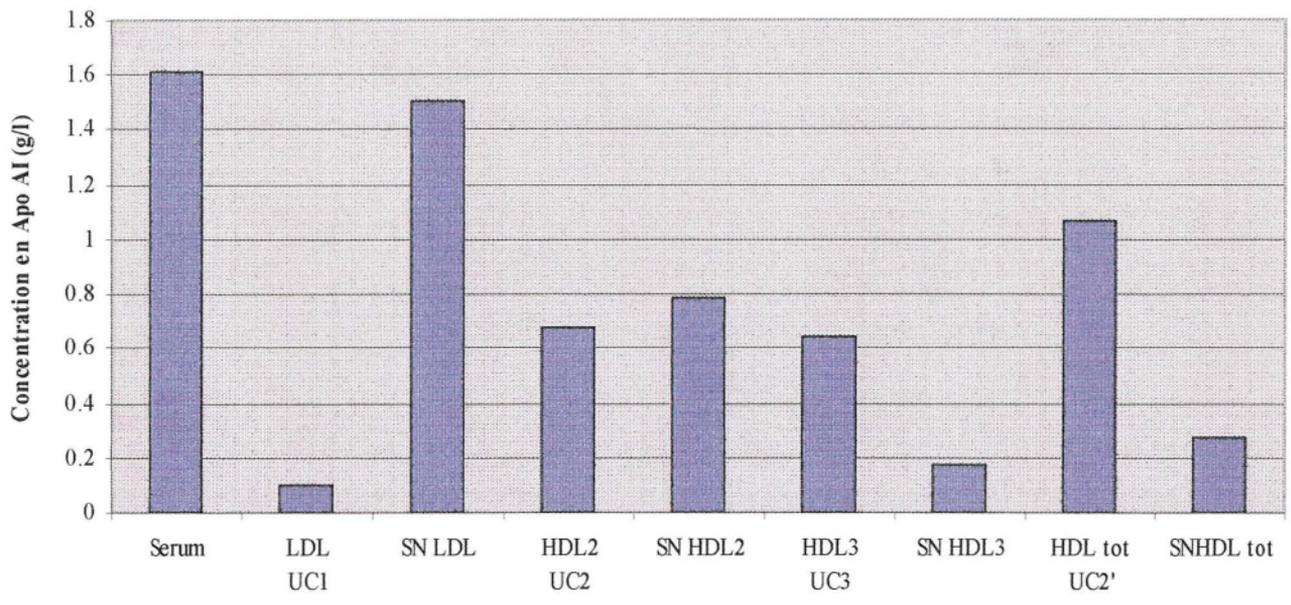


Figure 37. Concentration en Apo AI dans les différentes fractions.
Procédure opératoire : voir figure 35

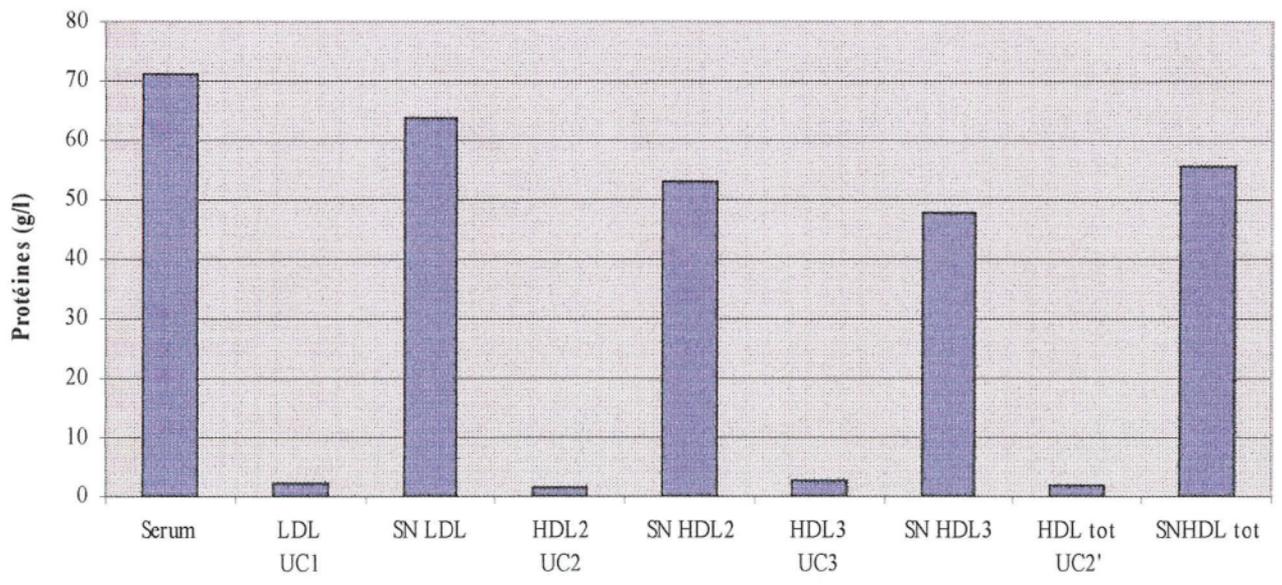


Figure 38. Concentration en protéines dans les différentes fractions.
Procédure opératoire : voir figure 35.

Après UC₃, l'activité est majoritairement mesurée dans les fractions 1 et 2 qui contiennent principalement les HDL₃ (figure n°40). Toutefois les fractions 3 et 4 contiennent encore des HDL₃ indiquant une contamination des protéines (SN-HDL₃) par ces HDL₃. L'activité mesurée dans les fractions 5 à 10 (protéines seules) représente donc seulement 12 % de l'activité totale.

L'ensemble de ces résultats montrent donc que l'activité paraoxonase - arylestérase est associée aux HDL₃.

D- Phénotypage et Génotypage

Certaines équipes utilisent le ratio [hydrolyse du paraoxon stimulé par NaCl / hydrolyse du phénylacétate] pour assigner un phénotype.

Les dosages des activités arylestérase et paraoxonase étant établis, nous avons voulu regarder si, en l'absence de NaCl, ces dosages pouvaient nous orienter vers un phénotype. Parallèlement aux dosages des activités enzymatiques, nous avons donc établi le génotype de 28 échantillons apparemment sains (13 de génotype AA représentés par des losanges roses, 13 de génotype AB en carré bleu et 2 de génotype BB en triangle jaune). La figure n°41a donne l'activité de l'arylestérase en fonction de l'activité de la paraoxonase et la figure n°41b donne le rapport [hydrolyse du paraoxon / hydrolyse du phénylacétate] en fonction du génotype. Ces deux représentations (et principalement la seconde) montrent que si la distinction entre le groupe des homozygotes à faible activité et celui des hétérozygotes est relativement bien défini, il n'en est pas du tout de même pour les homozygotes à forte activité.

Ce rapport des activités paraoxonase / arylestérase est donc insuffisant pour nous permettre d'assigner un phénotype. Si les ratios très faibles désignent clairement les homozygotes AA, les ratios des sujets AB et BB se chevauchent fortement.

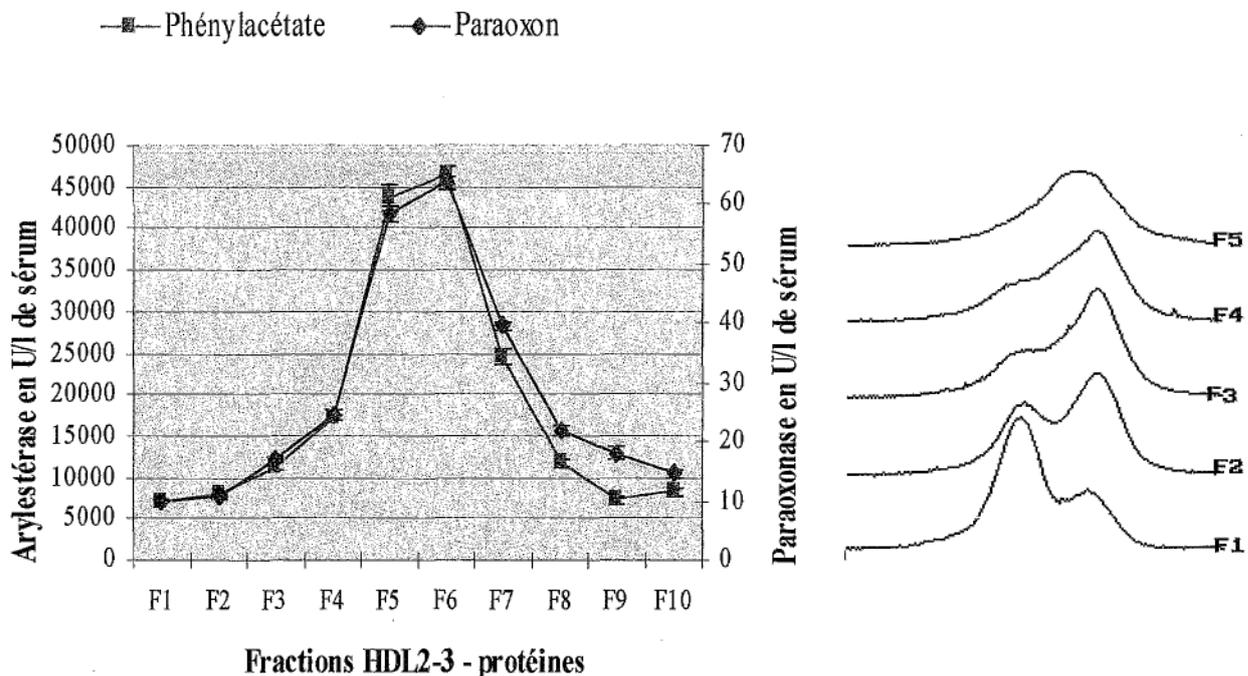


Figure 39 a et b. Localisation de l'activité après UC sur le SN-LDL (d = 1,125 g/ml)

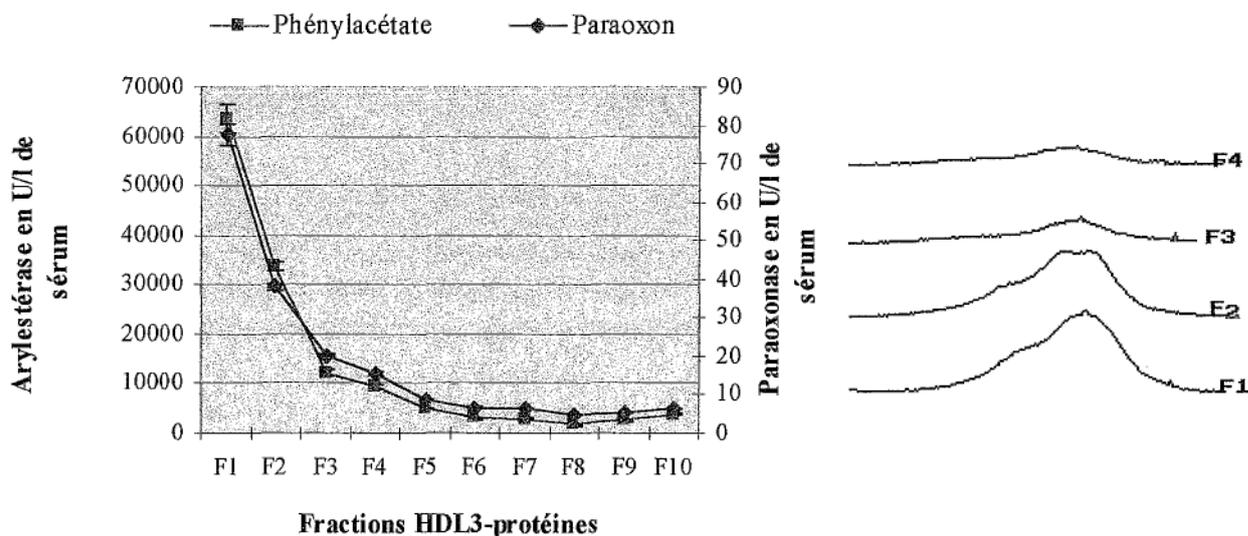


Figure 40 a et b. Localisation de l'activité après UC sur le SN-HDL₂ (d = 1,210 g/ml)

Figure 39 a et 40 a. Activité de la paraoxonase et de l'arylestérase dans les fractions de 100 µl

Les densités finales ont été ajustées à partir des densités salines.

L'activité paraoxonase est mesurée à pH 8,5, 30°C, dans du tampon Tris HCl (100 mM), contenant du calcium (2 mM). L'activité arylestérase est mesurée à pH 7,8, 30°C, dans du tampon Tris Acétate (50 mM), contenant du calcium (20 mM). Résultats donnant la moyenne ± écart type (n = 5).

Figure 39 b. et 40 b Distribution des HDL dans les 4 ou 5 premières fractions correspondantes.

Ces fractions ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide de gradient 2-20 % puis photométrées.

Seuls les pics correspondant à la présence d'HDL₂ (1^{er} pic) et d'HDL₃ (2^{ème} pic) sont représentés

Figure 39 b. F1-F3 : Présence d'HDL₂ (1^{er} pic) et d'HDL₃ (2^{ème} pic). F5 : Présence d'HDL₃.

Figure 40 b. F1 : très légère contamination par les HDL₂.

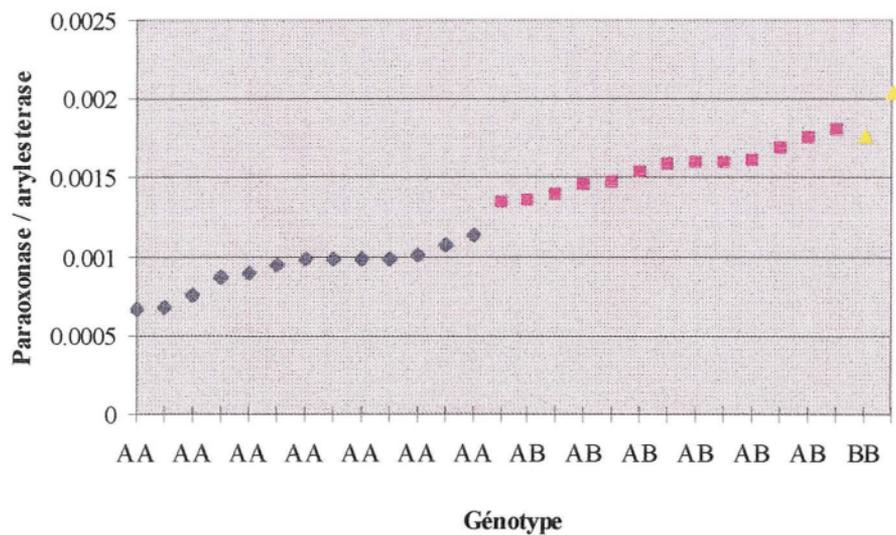
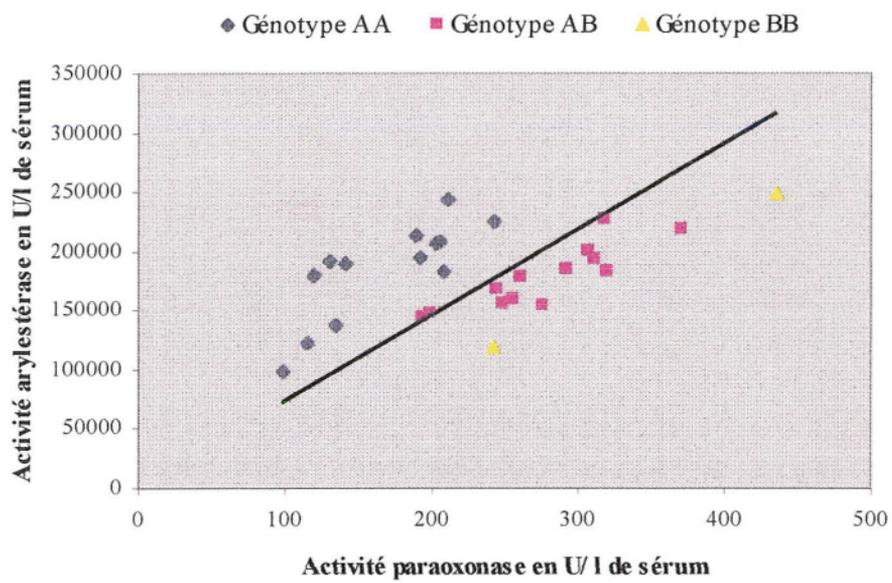


Figure 41 a et b. Phénotypage et génotypage.

L'activité paraoxonase est mesurée à pH 8,5, 30°C, dans du tampon Tris HCl (100 mM), contenant du calcium (2 mM). L'activité arylestérase est mesurée à pH 7,8, 30°C, dans du tampon Tris Acétate (50 mM), contenant du calcium (20 mM).

DISCUSSION

Notre travail a consisté dans un premier temps à optimiser les conditions opératoires du dosage de l'enzyme.

La spécificité de la paraoxonase pour les substrats tissulaires et sériques endogènes n'étant pas déterminée, l'activité enzymatique peut être suivie "in vitro" par un ou deux substrats synthétiques : le paraoxon et / ou le phénylacétate. Cependant, l'activité enzymatique montre une large variation entre ces deux substrats. Certains auteurs (Mackness et coll.) ne retiennent comme substrat, que le paraoxon pour lequel une discrimination entre les alloenzymes du polymorphisme 192 existe. La plupart des études cliniques suivent cette exemple. Toutefois il n'a pas été montré avec ce substrat une meilleure corrélation inverse avec les maladies cardiovasculaires. D'autres équipes, et notamment Aviram et coll. préfèrent suivre l'activité enzymatique en utilisant ces deux substrats. Cette attitude, en l'état actuel de nos connaissances, nous a paru plus judicieuse.

Nous avons donc tenter d'optimiser les conditions opératoires du dosage de cette enzyme pour ces deux substrats. Aucune modification majeure n'a été effectuée. Il faut toutefois souligner que l'enzyme est hautement dépendante du calcium tant pour son activité que pour sa stabilité. Une conséquence directe est qu'aucune mesure d'activité ne doit donc être effectuée sur plasma avec EDTA, ce qui n'a pas toujours été le cas (Mackness et coll. 1998e). Nos résultats montrent qu'il est vain de tenter de réactiver la paraoxonase en ajoutant un excès de calcium. Ceci s'explique par la perte de stabilité de l'enzyme en présence d'EDTA (Mackness et coll. 1998e).

En ce qui concerne la mesure d'activité de l'arylestérase, nous recommandons une concentration en phénylacétate de 4 mM. Ceci est relativement faible si l'on se rapporte au K_m ($S = 4 K_m$) mais permet de limiter le clivage non enzymatique du phénylacétate et améliore donc la sensibilité (Lorentz et coll. 1979).

A l'heure actuelle, la mesure de l'activité de la PON est uniquement un moyen d'investigation utilisé en recherche.

Dans notre travail, nous avons voulu localiser l'activité paraoxonase – arylestérase dans les sous-classes d'HDL. Nos résultats montrent que l'activité enzymatique est associée avec la sous-fraction d'HDL₃ à plus de 75 %.

Mackness et coll. (1988), Kelso et coll. (1994), Clendenning et coll. (1996) rapportent quant à eux, que la majorité de la PON est associée avec les HDL₂.

Cependant, les résultats de Graham et coll. (1997) montrent une distribution semblable de l'activité de la PON : seulement 1 à 5 % de l'activité totale est mesurée dans les HDL₂. De plus, Chemnitiu et coll. (1998) rapportent, qu'après fractionnement des lipoprotéines par précipitation dans le polyéthylène glycol, 21 % de l'activité arylestérase dans les HDL₂ et 80 % dans les HDL₃.

Nos résultats peuvent apparaître quelque peu surprenant si l'on se reporte à la nature antiathérogène des HDL. Cette dernière repose notamment sur deux hypothèses : d'une part, le transport inverse du cholestérol qui conduit le cholestérol cellulaire en excès vers le foie en vue de son excrétion biliaire, et d'autre part, le catabolisme des lipoprotéines riches en triacylglycérols, accélérant donc le retrait des remnants potentiellement nocifs (Tall, 1990). Dans l'ensemble de ces processus, les HDL₃ seraient les particules acceptrices initiales. Ainsi, dans le transport inverse du cholestérol, ce sont les sous-fractions d'HDL₃ de petites tailles qui captent le cholestérol cellulaire (Castro et Fielding, 1988). La LCAT estérifie alors le cholestérol libre présent à la surface de la lipoprotéine. Le cholestérol estérifié est transféré au centre de l'édifice, transformant les HDL₃ en HDL₂, particules plus grosses, moins denses. Ce processus de remodelage semble être un point important dans le potentiel antiathérogène des HDL, lequel est plus étroitement associée à la sous-classe HDL₂ isolée par ultracentrifugation (Miller 1987).

Aussi, pouvait-on s'attendre à ce que la PON, avec son rôle protecteur potentiel dans l'athérosclérose, soit associée avec les HDL₂. Or, l'activité enzymatique est principalement mesurée dans les HDL₃.

Toutefois, Klimov et coll. (1989 et 1993) rapportent un potentiel antioxydant associé aux HDL₃. L'injection intraveineuse d'HDL₃ à des souris avec hypercholestérolémie entraîne une diminution des conjugués diènes et triènes. Graham et coll. (1997) rapportent également un effet antioxydant plus marqué avec les HDL₃ qu'avec les HDL₂. Les deux sous-classes d'HDL -HDL₂ et HDL₃- diminuent l'oxydation des LDL (évaluée par la réduction des peroxydes et la migration des monocytes) pour des concentrations en HDL de 100 ou 500 µg / ml. Néanmoins, HDL₃ est la seule sous-fraction qui protège significativement les LDL de l'oxydation dès 100 µg / ml. Soulignons toutefois que ces effets inhibiteurs de l'oxydation des LDL ne sont pas compromis par l'inactivation de l'activité arylestérase de la PON par l'EDTA, laissant supposer un mécanisme antioxydant autre que celui de la PON (Graham et coll. 1997). Or Aviram et coll. (1998b) ont montré que l'activité arylestérase n'est pas une mesure quantitative de la capacité de

la PON à protéger contre l'oxydation des LDL puisque son inactivation par l'EDTA ne diminue pas la capacité de la PON à protéger contre l'oxydation.

La PON semble donc être un des systèmes antioxydants associés aux HDL₃. Ainsi, en protégeant contre l'oxydation des lipoprotéines, la PON préserve les fonctions antiathérogènes des HDL : notamment le transport inverse du cholestérol et la protection contre l'oxydation des LDL (Aviram et coll. 1998a).

Dans nos résultats, l'activité enzymatique de la PON dans le sous-nageant des HDL₃ représente 28 % de l'activité totale si l'on prend en compte tout le SN-HDL₃, mais seulement 12 % de l'activité totale si l'on considère les fractions protéiques non contaminées par les HDL₃. Cette mesure d'activité dans la fraction protéique est certainement liée à la centrifugation appliquée. En effet, on retrouve également dans le SN-HDL₃ 10 % de la concentration en apo AI, suggérant que les lipoprotéines ont été abîmées durant ces étapes d'UC. Aussi, une partie de l'apo AI et de la PON se sont doute décrochées des particules d'HDL.

Il est toutefois possible que dans certaines situations pathologiques, la paraoxonase circule non associée aux lipoprotéines. En effet, Mackness et coll. (1987) ont montré que seulement 15 % de l'activité paraoxonase était associée avec les lipoprotéines chez des patients avec des concentrations basses d'HDL (Fish-eye disease) (contre 80 % pour les contrôles). De plus, James et coll. (1998) ont montré chez des sujets Tangier et A-I Pisa où les concentrations en HDL sont indétectables, que les activités enzymatiques étaient toujours présentes en quantité appréciable.

A la vue des données contradictoires existantes dans la littérature (Mackness et coll. 1988 ; Kelso et coll. 1994 ; Clendenning et coll. 1996 ; Graham et coll. 1997 ; Chemnitius et coll. 1998), il semble nécessaire de confirmer nos résultats par d'autres mesures d'activités sur différents échantillons provenant de patients apparemment sains et de génotypes différents.

Dans un second temps, cette étude pourrait être refaite avec des échantillons provenant de patients avec risque de maladies cardio-vasculaires afin de vérifier si la localisation de l'activité de la paraoxonase n'est pas modifiée.

En effet, dans la circulation, la quantité, l'identité, le métabolisme et les variations physiopathologiques des différentes espèces d'HDL incorporant la PON doivent encore être établies. Des distributions distinctes, avec des tailles différentes, des sous-espèces d'HDL contenant la PON, pourraient être responsable de différents ratios de l'activité de la PON entre le sérum et le liquide interstitiel dans la population. Ainsi, l'enzyme aurait un effet "protecteur" plus ou moins prononcé pour une activité donnée dans la circulation.

D'autre part, une étude associant activité enzymatique, génotype, et risque de maladie cardio-vasculaire pourrait être réalisée. En effet, les données épidémiologiques existantes relient uniquement soit l'activité de la paraoxonase aux maladies cardio-vasculaires et pathologies où le risque de développer un athérome est important, soit le polymorphisme de l'enzyme au risque potentiel de maladie cardio-vasculaire.

Les données actuelles sur le polymorphisme 192 et les maladies cardio-vasculaires sont contradictoires. Toutefois, lorsqu'une relation existe, c'est toujours l'allèle B qui est impliqué positivement avec le risque potentiel de développer un athérome. Les résultats de Mackness et coll. (1997) et Aviram et coll. (1998) confirment d'ailleurs un effet antioxydant plus efficace du génotype AA de la PON. De plus, durant l'oxydation des LDL, l'activité arylestérase du génotype AA est mieux conservée que celle du génotype BB. Cette diminution sélective est peut être due à la sensibilité supérieure de la PON de génotype BB à certains peroxydes produits durant l'oxydation des LDL (Aviram et coll. 1998b).

Enfin, l'étude parallèle de l'activité enzymatique de la PON et d'autres constituants des HDL (PAF-AH, Apo J, Apo AI) pourrait être d'intérêt particulier. En effet, les données de Watson et coll. (1995) et celles de Navab et coll. (1997) indiquent que des ratios tels que PAF-AH / PON ou Apo J / PON ont une signification physiopathologique. Cependant, la complexité de l'état basal, la régulation de l'apo J dans la phase aiguë, sont, par exemple, autant de facteurs associés à prendre en considération (Navab et coll. 1996).

Aussi, une approche plus générale est envisageable avec un test mesurant globalement pour un individu donné, la capacité de ses HDL à protéger contre l'oxydation des LDL.

CONCLUSION

CONCLUSION

La paraoxonase est une enzyme calcium – dépendante qui circule associée aux lipoprotéines de haute densité (HDL), et plus particulièrement avec une sous-classe d'HDL contenant l'apolipoprotéine AI et la clustérine (apolipoprotéine J). La paraoxonase, responsable de l'hydrolyse du paraoxon, un catabolite de l'insecticide parathion, est également capable d'hydrolyser d'autres substrats tels que le phénylacétate. Bien que le substrat physiologique de la paraoxonase soit inconnu, un rôle protecteur contre la dégradation oxydative des lipoprotéines a été attribué à cette enzyme. Récemment, les effets antioxydant et anti-inflammatoire de la PON ont été confirmés "in vivo". Deux polymorphismes génétiques affectent les acides aminés en position 192 et 55. Le premier est le déterminant majeur du polymorphisme d'activité de l'enzyme contre le paraoxon. Certaines études relient l'allèle à forte activité contre le paraoxon, à un risque potentiel de développer une plaque d'athérome.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés dans un premier temps au dosage de cette enzyme en utilisant deux substrats : le paraoxon et le phénylacétate. A l'heure actuelle, ce dosage est uniquement un moyen d'investigation utilisé en recherche. Nous nous en sommes servi pour tenter de déterminer avec quelles sous-classes d'HDL la paraoxonase était associée.

Dans notre étude, l'activité enzymatique est principalement mesurée dans les fractions contenant des HDL₃ (plus de 80 %). L'activité retrouvée dans les fractions protéiques non contaminées par les HDL₃ (13 %) s'explique sans doute en partie par un décrochage de l'enzyme des particules d'HDL suite à la centrifugation appliquée.

Il est toutefois possible que dans certaines situations pathologiques, la paraoxonase circule non associée aux lipoprotéines. En effet, des activités enzymatiques ont pu être mesurées chez des patients où les concentrations en HDL n'étaient pas détectables (Tangier ou A-I Pisa).

Il serait donc intéressant de vérifier si la localisation de l'activité de la paraoxonase n'est pas modifiée chez des patients où le risque de développer une plaque d'athérome est important.

Il serait donc intéressant de vérifier si la localisation de l'activité de la paraoxonase n'est pas modifiée chez des patients où le risque de développer une plaque d'athérome est important.

On pourrait également envisager comme suite à ce travail, une étude associant activité enzymatique, génotype, et risque de maladies cardio-vasculaires. En effet, les données épidémiologiques existantes relient soit l'activité de la paraoxonase aux maladies cardio-vasculaires, soit le polymorphisme de l'enzyme au risque potentiel de maladies cardio-vasculaires.

Enfin, l'étude parallèle de l'activité enzymatique de la PON et d'autres constituants des HDL (PAF-AH, Apo J, Apo AI) pourrait être d'intérêt particulier. En effet, les données de Watson et coll. (1995) et celles de Navab et coll. (1997) indiquent que des rapports tels que PAF-AH / PON ou Apo J / PON ont une signification physiopathologique. Cependant, la complexité de l'état basal, la régulation de l'apo J dans la phase aiguë, sont, par exemple, autant de facteurs associés à prendre en considération (Navab et coll. 1996).

Une approche plus générale est aussi envisageable avec un test mesurant globalement pour un individu donné, la capacité de ses HDL à protéger contre l'oxydation des LDL.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 1^{er} mars 1999

LE DOYEN

P. DEMENGE



LE PRESIDENT DE THESE

PROFESSEUR A.M. ROUSSEL



BIBLIOGRAPHIE

Abbott C, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN.(1995)

Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 15 : 1812-1818

Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. (1993)

Molecular basis for the polymorphism of human serum paraoxonase/arylesterase : glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes.

Am. J. Hum. Genet. 52 : 598-608

Aldridge WN. (1953a)

Serum esterases I : two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate propionate and butyrate and a method for their determination.

Biochem.J. 53 : 110-117

Aldridge WN. (1953b)

Serum esterases II : an enzyme hydrolysing p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.

Biochem.J. 53 : 117-124

Antikainen M, Murtomäki S, Syväne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhainen M, Frick MH, Ehnholm C. (1996)

The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in finns.

J.Clin. Invest 98 : 883-885

Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. (1998a)

Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxydation rôle for paraoxonase.

J.Clin. Invest 101 : 1581-1590

Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du BN. (1998b)

Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities. Selective action of human paraoxonase allozymes Q and R.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18 : 1617-1624

Banka CL. (1996)

High density lipoprotein and lipoprotein oxidation.

Curr. Opin. Lipidol. 7 : 139-142

Berliner JA, Navab M, Watson AD, Van Lenten BJ, Liao , Lusis AJ, Parhami , Vora D, Territo MC, Fogelman AM. (1995)

Biological effects of minimally oxidized lipoproteins.

Atherosclerosis 10 : 213-215

Bielicki JK, Forte TM, McCall MR. (1996)

Minimally oxidized LDL is a potent inhibitor of lecithin cholesterol acyltransferase activity.

J. Lipid. Res. 37 : 1012-1021

Blatter-Garin MC, James RW, Messmer S, Barja , Pometta D. (1993)

Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase.

Eur. J. Biochem. 211 : 871-879

Blatter-Garin MC, Abbott CA, Messmer S, Mackness MI, Durrington PN, Pometta D, James R. (1994)

Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay : population differences in protein concentrations.

Biochem. J. 30 : 549-554

Blatter-Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanché H, Passa P, Froguel P, Ruiz J. (1997)
Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes.

J.Clin. Invest 99 : 62-66

Boright AP, Connely PW, Howart Brunt J, Scherer SW, Tsui LC, Hegele RA. (1998)
Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutteries.

Atherosclerosis 139 : 131-136

Brealey CJ, Walker Remise de chèques, Baldwin BC. (1980)

A-esterase activities in relations to the differential toxicity of pirimiphos-methyl to birds and mammals.

Pestic Sci. 11 : 546-554

Cao H, Girard-Globa A, Serusclat A, Bernard S, Bondon P, Picard S, Berthezene , Moulin P. (1998)

Lack of association between carotid intima-media thickness and paraoxonase gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus.

Atherosclerosis 138 : 361-366

Castro GR, Fielding CJ. (1988)

Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- β -migrating high-density lipoprotein.

Biochemistry 27 : 25-29

Chemnitius JM, Winkel H, Schirmacher K, Armstrong VW, Kreuzer H, Zech R. (1998).

Age related decrease of high density lipoproteins (HDL) in women after menopause. Quantification of HDL with genetically determined HDL arylesterase in women with healthy coronary vessels and in women with angiographically verified coronary heart disease.

Med Klin 93 (3) : 137-145

Clendenning JB, Humbert R, Green ED, Wood C, Traver D, Furlong CE. (1996).

Structural organization of the human PON1 gene.

Genomics 35 : 586-589

de Silva HV, Stuart WD, Duvic CR, Wetterau JR, Ray MJ, Ferguson DG, Albers HW, Smith WR, Harmony JA. (1990)

A 70-kDa apolipoprotein designated apo J is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins.

J. Biol. Chem. : 265 : 13240-13247

de Silva HV, Harmony JAK, Stuart WD, Gil CM, Robbins J. (1990)

Apolipoprotein J : structure and tissue distribution.

Biochemistry : 29 : 5380-5389

Eckerson HW, Romson J, Wyte C, La Du BN. (1983)

The human serum paraoxonase polymorphism : identification of phenotypes by their response to salts.

Am. J. Hum. Genet 35: 214-227

Ecobichon DJ, Stephens DS. (1973)

Perinatal development of human blood esterases.

Clin. Pharmac . Ther. 14 : 41-47

Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Grunfeld C. (1998)

Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response.

Atherosclerosis 139 : 307-315

Furlong CE, Richter RJ, Seidel SL, Motulsky AG.(1988)

Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon.

Am. J. Hum. Genet. 43 : 230-238

Furlong CE, Richter RJ, Seidel SL, Costa LG, Motulsky AG. (1989)

Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase.

Analytical biochemistry, 180 : 242-247

Furlong CE, Richter RJ, Chapline C, Crabb JW. (1991)

Purification of rabbit and human serum paraoxonase.

Biochemistry 30 : 10133-10140

Gambert P, Farnier M, Bouzerand C, Athias A, Lallemand C. (1988)

Direct quantification of serum high-density lipoprotein subfractions separated by gradient gel electrophoresis.

Clin. Chim. Acta 172 : 183-190

Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. (1991)

Purification of human serum paraoxonase / arylesterase.

Drug. Metab. Dispos. 19 : 100-106

Geldmacher von Mallinckrodt M, Lindorf HH, Petenyi M, Flügel M, Fischer T, Hiller T. (1973)

Genetisch determinierter polymorphismus der menschlichen serum paraoxonase.

Humangenetik 17 :331-335

Geldmacher von Mallinckrodt M, Diepgen TL. (1987)

The polymorphism of the human serum paraoxonase.

Toxicol. Environ. Chem. 14 : 165-181

Graham A, Hassall DG, Rafique S, Owen JS. (1997)

Evidence for a paraoxonase-independent inhibition of low-density lipoprotein oxidation by high-density lipoprotein.

Atherosclerosis 135 : 193-204

Hassett C, Richter J, Humbert R, Chapline C, Crabb JW, Omiecinski CJ, Furlong CE. (1991)
Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase : the mature protein retains its signal sequence.
Biochemistry 30 : 10141-10149

Hegele RA, Howart Brunt J, Connely PW.(1995)
A polymorphism of the paraoxonase gene associated with variation in plasma lipoproteins in a genetic isolate.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 15 : 89-95

Herrmann SM, Blanc H, Poirier O, Arveiler D, Luc G, Evans A, Marques-Vidal P, Bard JM, Cambien F. (1996)
The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON 192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study.
Atherosclerosis 126 : 299-303

Humbert R, Adler DA, DistecKe CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE.(1993)
The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism.
Nat. Genet. 3 : 73-76

Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, Nakauchi Y, Morita L, Arie K, Ito H, Kumon Y, Hashimoto K. (1998)
Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.
Metabolism. 47(5) : 598-602

James RW, Blatter-Garin MC, Calabresi L, Miccoli R, Von Eckardstein A, Tilly-Kiesi M, Taskinen MR, Assmann G, Franceschini G. (1998)
Modulated serum activities and concentrations of paraoxonase in high density lipoprotein deficiency states.
Atherosclerosis 139 : 77-82

Kao YL, Donaghue K, Chan A, Knight J, Silink M. (1998)

A variant of paraoxonase (PON1) gene is associated with diabetic retinopathy in IDDM.

J. Clin. Endocrinol. Metab 83(7) : 2589-2592

Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Stack TC, Harmony JAK. (1994)

Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma.

Biochemistry 33 : 832-839

Kitchen BJ, Masters CJ, Winzor DJ. (1973)

Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine plasma arylesterase.

Biochemistry 135 : 93-99

Klimov AN, Nikiforova AA, Plevskov VM, Kuzmin AA, Kalashnikova NN, Antipova TO. (1989)

The protective action of high-density lipoproteins, their subfractions, and lecithin-cholesterol acyltransferase in the peroxide modification of low density lipoproteins.

Biokhimiya 54 : 118-121

Klimov AN, Gurevich VS, Nikiforova AA, Shatilina LV, Kuzmin AA, Plavinsky SL, Teryukova NP. (1993)

Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo.

Atherosclerosis 100 : 13-18

Ko YL, Ko YS, Wang SM, Hsu LA, Chang CJ, Chu PH, Cheng NJ, Chen WJ, Chiang CW, Lee YS. (1998)

The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene is associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan.

Atherosclerosis 141(2) : 259-264

Kuo CL, La DU BN. (1998)

Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity.

Drug Metab. Dispos. 26/7 : 653-660

Laplaud M, Dantoine T, Chapman J. (1998)

Paraoxonase as a risk marker for cardiovascular disease : facts and hypotheses.

Clin. Chem. Lab. Med. 36 (7) 431-441

Lorentz K, Flatter B, Augustin E. (1979)

Arylesterase in serum : elaboration and clinical application of a fixed-incubation method.

Clin. Chem. 25/10 : 1714-1720

Mackness MI, Hallam SD, Peard T, Warner S, Walker CH. (1985)

The separation of sheep and human serum A-esterase activity into the lipoprotein fraction by ultracentrifugation.

Comp. Biochem. Physiol. 83B : 675-677

Mackness MI, Walker CH, Carlson LA. (1987)

Low A-esterase activity in serum of patients with Fish-Eye disease.

Clin. Chem. 33 ; 4 : 587-588

Mackness MI, Walker CH. (1988)

Multiple forms of sheep serum A-esterase activity associated with the high-density lipoprotein.

Biochem. J. 250 : 539-545

Mackness MI, Peuchant E, Dumon MF, Walker CH, Clerc M. (1989)

Absence of A-esterase activity in the serum of a patient with Tangier disease.

Clin. Biochem. 22 : 475-478

Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. (1991a)

Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein.

FEBS Lett. 286 : 152-154

Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour P, Arrol S, Ishola M, Durrington PN. (1991b)

Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolemia and insulin-dependent diabetes mellitus.

Atherosclerosis 86 : 193-199

Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. (1993a)

The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation.

Biochem. J. 294 : 829-834

Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. (1993b)

Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase.

Atherosclerosis 104 : 129-135

Mackness MI, Durrington PN. (1995a)

HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation.

Atherosclerosis 115 : 243-253

Mackness MI, Durrington PN. (1995b)

Paraoxonase : another factor in NIDDM cardiovascular disease.

Lancet 346 : 856

Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connely PW, Hegele RA. (1996)

Paraoxonase : biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins.

Curr. Opin. Lipidol. 7 : 69-76

Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. (1997a)

Effect of the molecular polymorphism of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon.

Br. J. Pharmac. 112 : 265-268

Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Durrington PN. (1997b)

Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high-density lipoproteins in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation.

Lancet 349 : 851-852

Mackness MI, Mackness B, Arrol S, Wood G, Bhatnagar D, Durrington PN. (1997c)

Presence of paraoxonase in human interstitial fluid.

FEBS Lett. 416 : 377-380

Mackness B, Hunt R, Durrington PN, Mackness MI. (1997d)

Increased immunolocalization of paraoxonase, clusterin, and apolipoprotein A-I in the human artery wall with the progression of atherosclerosis.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 17 : 1233-1238

Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. (1998a)

Human serum paraoxonase.

Gen. Pharmac. 31 ; 3 : 329-336

Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. (1998b)

Lack of protection against oxidative modification of LDL by avian HDL.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 247(2) : 443-446

Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. (1998c)

Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification.

FEBS Lett. 423 : 57-60

Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuasha B, Miller JE, Boulton AJM, Durrington PN. (1998d)

Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus.

Atherosclerosis 139 : 341-349

Mackness MI. (1998e)

Why plasma should not be used to study paraoxonase ?

Atherosclerosis 136 : 195-196

Maury CP, Junge W, Teppo AM. (1984)

Serum esterase activity in reactive systemic amyloidosis and its relation to amyloid A degrading activity.

J. Lab. Clin. Med. 104 : 761-766

McElveen J, Mackness MI, Colley M, Peard T, Warner S, Walker CH. (1986)

Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction.

Clin. Chem 32/4 : 671-673

Miller NE. (1987)

Association of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis.

Am. Heart J. 113 : 589-597

Morel DW. (1994)

Reduced cholesterol efflux to mildly oxidized high density lipoprotein.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 200 : 408-416

Mueller RF, Horning S, Furlong CE, Anderson J, Giblett ER, Motulsky A. (1983)

Plasma paraoxonase polymorphism, a new enzyme assay : population, family, biochemical and linkage studies.

Am. J. Hum. Genet. 35 : 393-408

Murugesan G, Fox PL. (1996)

Role of lysophosphatidylcholine in the inhibition of endothelial cell mobility by oxidized low density lipoprotein.

J. Clin. Invest. 97 : 2736-2744

Nagata Y, Yamamoto Y, Niki E. (1996)

Reaction of phosphatidylcholine hydroperoxide in human plasma : The role of peroxidase and lecithin cholesterol acyltransferase.

Arch. Biochem. Biophys. 329 : 24-30

Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM., Van Lenten BJ, Frank JS., DemerLL, Edwards PA, Fogelman AM. (1996)

The yin and yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff memorial lecture.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 16 : 831-842

Navab M, Hama SY, Van Lenten BJ, Fonarow GC, Cardinez CJ, Castellani LW, Brennan ML, Lusis AJ, Fogelman AM. (1997)

Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio.

J. Clin. Invest. 99 (8) : 2005-2019

Nishio E, Watanabe Y. (1997)

Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 236 : 289-293

Nisselbaum JS. (1987)

Statistical significance of paraoxonase activity in a control group of children and a group of children of parents who had had early myocardial infarction.

Clin. Chem. 33 : 1496

Odawara M, Tachi Y, Yamashita K. (1997)

Paraoxonase polymorphism (Gln192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese non-insulin-dependent diabetes mellitus.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 82 : 2257-2260

Ombres D, Panniteri G, Montali A, Candeloro A, Seccareccia F, Campagna F, Cantini R, Campa PP, Ricci G, Arca M. (1998)

The Gln-Arg 192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients:

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18 : 1611-1616

Omura O. (1980)

Serum paraoxonase polymorphisms in Japan.

MD Thesis, University of Erlangen (Germany)

Paragh P, Seres I, Balogh Z, Varga Z, Karpati I, Matyus J, Ujhelyi L, Kakuk G. (1998)

The serum paraoxonase activity in patients with chronic renal failure and hyperlipidemia.

Nephron 80 (2) : 166-170

Pati N, Pati U. (1998)

Paraoxonase gene polymorphism and coronary artery disease in Indian subjects.

Int. J. Cardiol. 66 (2) : 168-168

Pei L, McGUinn WD, Omburo G, Zitzer AH, Petrikovics I, Way JL. (1994)

Spectrophotometric determination of paraoxonase within mouse carrier red blood cells.

Biotechnol. Appl. Biochem. 20 : 35-41

Playfer JR, Eze L, Bullen MF, Evans DAP. (1976)

Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity.

J. Med. Genet. 13 : 337-342

Primo-Parma SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. (1996)

The serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family.

Genomic 33 : 498-509

Ruiz J, Blanché H, James RW, Blatter-Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, Cohen N, Morabia A, Passa P, Froguel P.(1995)

Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes.
Lancet 346 : 869-872

Saha N, Roy AC, Teo SH, Tay JSH, Ratnam SS. (1991)

Influence of serum paraoxonase polymorphism on serum lipids and apolipoproteins
Clin. Genet. 40 : 277-282

Sakai T, Matsuura B, Onji M. (1998)

Serum paraoxonase activity and genotype distribution in Japanese patients with diabetes mellitus.
Intern Med. 37 (7) : 581-584

Sanghera DK, Saha N, Atson CE, Kamboh MI. (1997)

Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17 : 1067-1073

Sanghera DK, Saha N, Kamboh MI. (1998)

The codon 55 polymorphism in the paraoxonase 1 gene is not associated with the risk of coronary heart disease in Asian Indians and Chinese.
Atherosclerosis 136: 217-223

Secchiero S, Mussap M, Zaninotto M, Bertorelle R, Burlina A. (1989)

Serum arylesterase (paraoxonase) activity following myocardial infarction.
Clin. Chim. Acta. 183 : 71-76

Senault C, Malhberg FH, Renaud G, Girard-Globa A, Chacko GK. (1990)

Effect of apoprotein cross-linking on the metabolism of human HDL3 in rat.
Biochem. Biophys. Acta. 1046 : 81-88

Serrato M, Marian AJ. (1995)

A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease.

J.Clin. Invest 96 : 3005-3008

Shih DM, Gu L, Hama S, Xia Y, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. (1996)

Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model.

J.Clin. Invest 97 : 1630-1639

Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. (1998)

Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis.

Nature 394 (6690) : 284-287

Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN. (1995)

Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 7187-7191

Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. (1996)

Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases.

Biochimica et Biophysica Acta 1301 : 161-173

Stuart WD, Krol B, Jenkins SH, Harmony JAK. (1992)

Structure and stability of apolipoprotein J-containing high-density lipoproteins.

Biochemistry 31 : 8552-8559

Subbaiah PV, Liu M. (1996)

Disparate effects of oxidation on plasma acyltransferase activities : inhibition of cholesterol esterification but stimulation of transesterification of oxidized phospholipids.

Biochim. Biophys. Acta. 1301 : 115-126

Szabo I, Rona K, CzinneA, Gachalyi B, Kaldor A. (1987)

Is paraoxon hydrolytic activity predictive of myocardial infarction ?

Clin. Chem. 33 : 742-743

Szafran Z, Nowak J, Szafran H, Janik A. (1979)

Esterolytic activity of blood serum in infants with hypertrophic pyloric stenosis.

J.Clin. Chem. Clin Biochem. 17 : 321-324

Tall AR (1990).

Plasma high-density lipoproteins : metabolism and relationship to atherogenesis.

J. Clin. Invest. 86 : 379-384

Tselepis AD, Dentan C, Karabina SAP, Chapman MJ, Ninio E. (1995)

PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL in human Plasma.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 15 : 1764-1773

Uriel A. (1961)

Characterisation des cholinesterases et d'autres esterases carboxyliques après électrophorèse et immunoélectrophorèse en gélose : applications à l'étude des estérases du sérum humain normal.

Ann. Inst. Pasteur 101 : 104

Van Lenten BJ, Hama SY, De Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. (1995)

Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures.

J.Clin. Invest 96 : 2758-2767

Vitarius JA, Sultatos LG. (1995)

The role of calcium in the hydrolysis of the organophosphate paraoxon by human serum A-esterase.

Drug. Metab. Dispos. 22 : 472-478.

Vitarius JA, Sultatos LG. (1994)

Kinetic mechanism of the detoxification of the organophosphate paraoxon by human serum A-esterase.

Life Sci. 56 : 125-134.

Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. (1995a)

Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase : inhibition of biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein.

J.Clin. Invest 96 : 2882-2891

Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, McIntyre T.M, La Du BN, Fogelman AM, Berliner JA. (1995b)

Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein.

J.Clin. Invest 95 : 774-782

Zama T, Murata M, Matsubara Y, Kawano K, Aoki N, Yoshino H, Watanabe G, Ishikawa K, Ikeda Y. (1997)

A 192Arg variant of the human paraoxonase (HUMPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17 : 3565-3569

LEXIQUE

Liste des abréviations

Apo	Apolipoprotéine : Apo AI; Apo AII ; Apo B ; Apo E.
Apo J	Apolipoprotéine J ou Clustérine
AGPI	Acide gras polyinsaturé
ARNm	Acide ribodésoxynucléique messager
CaCl₂	Chlorure de Calcium
CH	Cholestérol : CH-HDL ; CH-LDL
CHD	Maladie cardiaque coronarienne (Coronary Heart Disease)
CT	Cholestérol total
Cys	Cystéine
HDL	Lipoprotéine de forte densité (High-Density Lipoprotein)
KBr	Bromure de Potassium
LCAT	Lécithine cholestérol acyltransférase
LDL	Lipoprotéine de faible densité (Low-Density Lipoprotein)
MDA	Malondialdéhyde
OPS	Organophosphates
PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PAF-AH	Platelet activating factor – acetyl hydrolase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PL	Phospholipides
PNP	Paranitrophénol
PON	Paraoxonase
SDS	Sodium dodécylsulfate
SN-HDL	Sous-nageant des HDL
SN-LDL	Sous-nageant des LDL
TG	Triglycéride
TRIS	Tampon Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane
UC	Ultracentrifugation
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité (Very Low-Density Lipoprotein)

Liste des figures

Figure 1. Hydrolyse enzymatique du paraoxon.	4
Figure 2. Effets des polymorphismes 55 et 192 de la PON sur l'hydrolyse du paraoxon	12
Figure 3. Fréquence du génotype 192 dans les différentes populations.....	12
Figure 4. Fréquence du génotype 55 dans les différentes populations.....	14
Figure 5. Distribution des génotypes 192 et 55 associés dans la population européenne.....	14
Figure 6. Premières étapes de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés	20
Figure 7. Modèle hypothétique des mécanismes par lesquels les HDL détruiraient les lipides biologiquement actifs à l'intérieur des LDL modérément oxydées (d'après Watson et coll. 1995a).	28
Figure 8. Méthode de séparation des lipoprotéines. Ultracentrifugations de flottation successives.	52
Figure 9. Activité de la paraoxonase sérique en fonction de la concentration en paraoxon.....	56
Figure 10. Linéarité. Activité de la paraoxonase sérique en fonction du volume de sérum.	56
Figure 11. Activité de la paraoxonase sérique en fonction de la température.	58
Figure 12. Influence du calcium. Activité de la paraoxonase sérique en fonction du prélèvement et de la teneur en calcium dans le tampon.	59
Figure 13. Activité de la paraoxonase sérique en fonction de la concentration en calcium dans le tampon.....	60
Figure 14. Activité de la paraoxonase sérique en fonction de la concentration en calcium dans le tampon. Moyenne des activités de 13 sérums dosés à pH 8, 30°C, dans du tampon Tris HCL (100 mM).	60
Figure 15. Activité de la paraoxonase sérique en fonction du pH.....	61
Figure 16. Pourcentage d'augmentation de l'activité de la paraoxonase sérique à différents pH, par rapport à pH 8,6.....	62
Figure 17. Influence de 2 paramètres : pH et concentration en Tris HCl sur l'activité de la paraoxonase sérique.....	62
Figure 18. Activité de l'arylestérase sérique en fonction de la concentration en phénylacétate.	64
Figure 19. Linéarité . Activité de l'arylestérase sérique en fonction du volume de sérum.	65
Figure 20. Comparaison des milieux de dilution de l'échantillon. Activité arylestérase en fonction de la dilution et du milieu de dilution.....	66

Figure 21. Activité de l'arylestérase sérique en fonction de la température.....	66
Figure 22. Courbe "caractéristique" de la variation de l'activité de l'arylestérase sérique en fonction du pH.....	67
Figure 23. Courbe caractéristique de l'influence du calcium. Activité de l'arylestérase en fonction du prélèvement et de la teneur en calcium dans le tampon.....	68
Figure 26. Répétabilité. Activité de la paraoxonase sérique avec moyenne +/- 2écart type pour chaque série.	72
Figure 27. Répétabilité. Activité de l'arylestérase sérique avec moyenne +/- 2écart type pour chaque série.	72
Figure 28. Courbe de Michaelis-Menten. Evolution de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en paraoxon.....	73
Figure 29. Représentation de Lineweaver-Burk pour la détermination du Km.	73
Figure 30. Courbe de Michaelis-Menten. Evolution de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en phénylacétate.	74
Figure 31. Représentation de Lineweaver-Burk pour la détermination du Km.	74
Figure 32 Influence du KBr sur l'activité de la paraoxonase et de l'arylestérase.	77
Figures 34 a et b. Influence de la dialyse contre NaCl 9 ‰ et CaCl ₂	79
Figure 35 a et b. Activités de la paraoxonase et de l'arylestérase dans les fractions après ultracentrifugations.....	81
Figure 36. Electrophorèse en gel de polyacrylamide de gradient 2-20 %.	82
Figure 37. Concentration en Apo AI dans les différentes fractions.	83
Figure 38. Concentration en protéines dans les différentes fractions.	83
Figure 39 a et b. Localisation de l'activité après UC sur le SN-LDL (d = 1,125 g / ml)	85
Figure 40 a et b. Localisation de l'activité après UC sur le SN-HDL ₂ (d = 1,210 g / ml).....	85
Figure 41 a et b. Phénotypage et génotypage.	86

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des estérases.....	5
Tableau 2. Polymorphisme et activité de la PON en fonction du substrat (Mackness et coll. 1998a).....	10
Tableau 3. Polymorphisme et profil lipidique.....	35
Tableau 4. Relation entre le polymorphisme génétique 192 de la PON et la présence de maladie cardio-vasculaire.....	36
Tableau 5. Méthodes de dosage de l'activité paraoxonase.....	41
Tableau 6. Méthodes de dosage de l'activité arylestérase.....	42
Tableau 7 Constantes de Mickaelis de la paraoxonase et de l'arylestérase pour le génotype AA	75
Tableau 8 Constantes de Mickaelis de la paraoxonase et de l'arylestérase pour le génotype AB	75
Tableau 9 Constantes de Mickaelis de la paraoxonase et de l'arylestérase pour le génotype BB	75

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	3
I- LA PARAOXONASE SÉRIQUE HUMAINE	4
<i>A- Paraoxonase en toxicologie</i>	<i>4</i>
<i>B- Définition, Classification</i>	<i>5</i>
<i>C- Propriétés de la paraoxonase</i>	<i>6</i>
1. Structure	6
2. Cinétique et importance du calcium	7
3. Localisation	8
4. Variations physiologiques	8
5. Synthèse et sécrétion	8
<i>D- Association de la paraoxonase avec les lipoprotéines de haute densité HDL</i>	<i>9</i>
<i>E- Génétique et modification de l'activité de la paraoxonase sérique humaine</i>	<i>9</i>
1. Polymorphismes	9
2. Répartition des génotypes	11
3. Influence des polymorphismes sur la concentration et l'activité spécifique	15
4. Autres éléments génétiques	15
<i>F- Modification de l'activité de la paraoxonase en dehors de l'athérosclérose</i>	<i>16</i>
1. Influence de l'environnement et du régime alimentaire	16
2. Baisse d'activité dans la phase aiguë de la réponse inflammatoire	16
3. Pathologies diverses	17
II- POURQUOI DOSER LA PARAOXONASE ?	18
<i>A- Rappel sur le processus athérogène</i>	<i>18</i>
1. Importance des LDL oxydées	18
2. Rôle protecteur des HDL	21
<i>B- Paraoxonase et particules d'HDL</i>	<i>21</i>
1. PON et apolipoprotéine J (clustérine)	22
2. PON et autres constituants de la particule d'HDL	23
<i>C- PON : Protection contre l'oxydation des lipoprotéines</i>	<i>25</i>
1. Protection des LDL	25
2. Protection des HDL	25
3. Mécanismes d'action de la PON	26
<i>D- Site actif de la paraoxonase requis pour protéger contre l'oxydation</i>	<i>29</i>

<i>B-</i>	<i>Substrat : phénylacétate</i>	64
1.	Concentration en substrat.....	64
2.	Linéarité.....	65
3.	Etude de la linéarité de la réaction en fonction du temps d'incubation.....	67
4.	Influence de la température.....	67
5.	Influence du pH.....	67
6.	Influence du calcium.....	68
II-	ESSAIS DE CONSERVATION.....	69
III-	ESSAIS DE RÉPÉTABILITÉ - PRÉCISION.....	71
IV-	DÉTERMINATIONS DE LA CONSTANTE DE MICKAELIS.....	71
V-	MESURE DES ACTIVITÉS PARAOXONASE - ARYLESTÉRIASE DANS LES FRACTIONS DE LIPOPROTÉINES.....	76
<i>A-</i>	<i>Influence du KBr sur l'activité</i>	76
<i>B-</i>	<i>Influence de la dialyse</i>	77
<i>C-</i>	<i>Activité dans les différentes fractions</i>	80
<i>D-</i>	<i>Phénotypage et Génotypage</i>	84
	DISCUSSION	87
	CONCLUSION	92
	BIBLIOGRAPHIE	95
	LEXIQUE	113
	TABLE DES MATIERES	118

RESUME

La paraoxonase est une enzyme calcium – dépendante qui circule associée aux lipoprotéines de haute densité (HDL), et plus particulièrement avec une sous-classe d'HDL contenant l'apolipoprotéine A1 et la clustérine (apolipoprotéine J). La paraoxonase, responsable de l'hydrolyse du paraoxon, un catabolite de l'insecticide parathion, est également capable d'hydrolyser d'autres substrats tels que le phénylacétate. Bien que le substrat physiologique de la paraoxonase soit inconnu, un rôle protecteur contre la dégradation oxydative des lipoprotéines a été attribué à cette enzyme. Récemment, les effets antioxydant et anti-inflammatoire de la PON ont été confirmés "in vivo". Deux polymorphismes génétiques affectent les acides aminés en position 192 et 55. Le premier est le déterminant majeur du polymorphisme d'activité de l'enzyme contre le paraoxon. Certaines études relient l'allèle à forte activité contre le paraoxon, à un risque potentiel de développer une plaque d'athérome.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés dans un premier temps au dosage de cette enzyme en utilisant deux substrats : le paraoxon et le phénylacétate. A l'heure actuelle, ce dosage est uniquement un moyen d'investigation utilisé en recherche. Nous nous en sommes servi pour tenter de déterminer avec quelles sous-classes d'HDL la paraoxonase était associée.

Après ultracentrifugations successives, l'activité enzymatique est principalement mesurée dans les fractions contenant des HDL₃ (plus de 80 %). L'activité retrouvée dans les fractions protéiques non contaminées par les HDL₃ (13 %) s'explique sans doute en partie par un décrochage de l'enzyme des particules d'HDL suite à la centrifugation appliquée.

Mots clés : Paraoxonase – Dosage - Lipoprotéines de haute densité (HDL) –

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

Laboratoire de Biochimie A : Professeur E. Chambaz

FACULTE DE PHARMACIE

Domaine de la merci

38 708 La Tronche