

Ecole doctorale Environnements-Santé
Dossier de projet de thèse « Contrat doctoral Etablissements »
ANNEE 2025

1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse¹ (1 page maximum) :

Directeur de thèse HDR :

Nom : DENIMAL

Prénom : Damien

Section CNU : 44.01 Biochimie et Biologie Moléculaire

Grade : MCU-PH (concours PU-PH en avril 2025)

HDR : Date de soutenance 22/11/2024. Discipline : Biochimie et Biologie Moléculaire

l'HDR devra être soutenue, ou sa soutenance autorisée, au moment du dépôt du présent projet.

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) : Laboratoire de Biochimie, 2 rue Angélique Ducoudray, 21000 DIJON

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) : UMR 1231 CTM, INSERM, Pr F. Ghiringhelli

Co-directeur de thèse éventuel :

Nom : DUVILLARD

Prénom : Laurence

Section CNU : 44.01 Biochimie et Biologie Moléculaire

Grade : PU-PH

HDR : non ; oui Date de soutenance..... Discipline :

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) : Laboratoire de Biochimie, 2 rue Angélique Ducoudray, 21000 DIJON

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) : UMR 1231 CTM, INSERM, Pr F. Ghiringhelli

2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :

- nom et label de l'unité de recherche (ainsi que l'équipe interne s'il y a lieu) : UMR 1231 *Center for Translational Medicine* (Pr F. Ghiringhelli) ; Equipe « Physiopathologie des dyslipidémies » (PADYS) dirigée par le Pr Bruno Vergès.
- localisation : Bâtiment B3, UFR des Sciences de Santé, Université de Bourgogne Europe, 15 boulevard Maréchal De Lattre de Tassigny, 21000 DIJON
- nom du directeur de thèse et du co-directeur s'il y a lieu : Damien DENIMAL
- adresse courriel du contact scientifique : damien.denimal@u-bourgogne.fr
- titre du projet : « **Composition et fonctionnalité des lipoprotéines de haute densité au cours du diabète de type 1** »

- description du projet (2 pages maximum) :

¹ ATTENTION : selon l'article 16 de l'arrêté du 25 mai 2016, le total d'encadrants ne peut pas dépasser 2, sauf si l'un des encadrants appartient au monde socio-économique, qui peut venir en sus, ou en cas de co-tutelle; Le décompte des co-encadrements se fera au prorata du nombre d'encadrants : 1 pour 1 encadrant, ½ pour deux encadrants.

Rationnel du projet et hypothèses de recherche. Les lipoprotéines de haute densité (HDL) possèdent de multiples propriétés protectrices pour le système cardiovasculaire : capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol des cellules de la paroi vasculaire, effet anti-inflammatoire, effet anti-apoptotique, et capacité à activer la NO synthase endothéliale (eNOS). Les patients atteints de diabète de type 1 (DT1) ont un risque cardiovasculaire augmenté, en particulier lié à la durée du diabète, au niveau de contrôle glycémique et à la présence d'une néphropathie. Par conséquent, des anomalies affectant la composition et les fonctions antiathérogènes des HDL pourraient tout à fait jouer un rôle significatif dans cette élévation du risque cardiovasculaire. Jusqu'à présent, peu d'études se sont intéressées à la fonctionnalité des HDL dans cette population. Ces études comprenaient, le plus souvent, des effectifs de petite taille, n'étudiaient pas la relation entre la composition et la fonctionnalité des HDL, et montraient parfois des résultats discordants comme c'est le cas pour la capacité des HDL à promouvoir l'efflux du cholestérol. Dans ce contexte, nous émettons les trois hypothèses de travail suivantes :

① Les anomalies de la composition et la fonctionnalité des HDL pourraient être hétérogènes au cours du DT1. Il est tout à fait possible que chez un même patient seules certaines fonctions anti-athérogènes soient affectées, en lien avec la nature des anomalies de composition des HDL. Cela revêt une importance particulière pour identifier des cibles thérapeutiques potentielles. La présence de caractéristiques particulières chez certains patients DT1 pourrait également être à l'origine d'une hétérogénéité de la fonctionnalité des HDL pour une même fonction antiathérogène.

② la présence d'une néphropathie pourrait être un déterminant clé de cette hétérogénéité de la composition et de la fonctionnalité des HDL chez les patients DT1. En effet, certains arguments suggèrent que la néphropathie des patients DT1 pourrait entraîner des modifications délétères des HDL, susceptibles d'altérer leurs fonctions anti-athérogènes :

- l'augmentation de la perméabilité du glomérule rénal est susceptible de favoriser la fuite des HDL de plus petite taille (Soto-Miranda et al. 2012 Clin Chim Acta), qui sont connues pour être particulièrement actives.

- un syndrome inflammatoire de bas grade associé à la microalbuminurie pourrait induire un enrichissement des HDL en triglycérides et en protéine *serum amyloid A* (SAA), conduisant à un déplacement de l'apolipoprotéine AI qui joue un rôle clé dans la fonctionnalité des HDL, ainsi qu'une oxydation des HDL.

- les phospholipides et sphingolipides des HDL, qui jouent aussi un rôle majeur dans leur fonctionnalité, pourraient être modifiés en raison de l'inflammation et d'une augmentation de la triglycéridémie. Par exemple, l'activation des phospholipases A2 liée à l'inflammation pourrait induire une augmentation des lysophospholipides dans les HDL.

- chez des enfants non diabétiques avec une insuffisance rénale consécutive à une glomérulopathie ou une malformation, la capacité des HDL à induire la synthèse de NO et à promouvoir l'efflux de cholestérol est progressivement altérée dès le stade 2 (Kaseda et al. 2015 *Metabolism*). Ceci suggère que la fonctionnalité des HDL est altérée chez les patients DT1 avec macroalbuminurie, qui est souvent associée à une diminution du débit de filtration glomérulaire. En revanche, le cas des patients avec microalbuminurie reste, quant à lui, entièrement à étudier.

③ le niveau de contrôle glycémique chez les patients DT1 pourrait également être un déterminant clé de cette hétérogénéité de la fonctionnalité des HDL. En effet, au cours du DT1, les HDL présentent des modifications chimiques, de composition et de taille : glycation, oxydation, enrichissement en triglycérides et augmentation de la taille. Les modifications glyco-oxydatives des HDL, dont l'amplitude est liée au niveau de contrôle glycémique, sont susceptibles d'altérer leurs propriétés anti-athérogènes, comme cela a été démontré pour la glycation ou l'oxydation *in vitro* pour leurs effets anti-inflammatoire et antioxydant ainsi que pour leur capacité à activer eNOS et à s'opposer à l'effet vasoconstricteur des LDL oxydées.

De plus, la glycation de la paraoxonase-1, portée quasi-exclusivement par les HDL, réduit son activité antioxydante. La glycation des HDL altère aussi leur composition en diminuant la teneur en S1P. Dans une étude pilote de l'équipe (Denimal et al. 2022 *Cardiovasc Diabetol*), nous avons mis en évidence que la capacité des HDL à promouvoir l'efflux de cholestérol macrophagique était améliorée chez les patients DT1 après amélioration du contrôle glycémique, en lien avec une réduction du niveau de carbamylation des HDL, qui correspond à une modification post-traductionnelle des résidus lysine des protéines. Or, les HDL carbamylées présentent également une altération de leur capacité à induire l'activation d'eNOS, ainsi qu'à exercer un effet anti-inflammatoire. L'amélioration de l'équilibre glycémique pourrait ainsi exercer un effet favorable sur ces fonctions-là, de manière similaire à ce que nous avons observé pour l'efflux de cholestérol.

Objectifs du projet. Ce projet a donc pour objectif d'évaluer, à l'aide d'une cohorte de taille significative, s'il existe une hétérogénéité de la composition et de la fonctionnalité des HDL au cours du DT1, et d'en identifier les déterminants. Il va donc se concentrer sur deux déterminants majeurs du risque cardiovasculaire dans cette population, à savoir la néphropathie et le niveau de contrôle glycémique.

Méthodologie. Il s'agit d'une étude clinique en collaboration avec le service d'Endocrinologie-Diabétologie du CHU de Dijon (Pr B. Vergès), dont le recrutement des participants a déjà commencé. Pour étudier l'impact de la néphropathie, il est prévu de recruter 40 patients DT1 normoalbuminuriques, 40 patients DT1 microalbuminuriques, et 40 patients DT1 macroalbuminuriques. Comme groupe de comparaison, nous recruterons 40 sujets ne présentant ni diabète, ni dyslipidémie, ni atteinte de la fonction rénale. Pour l'étude de l'impact du contrôle glycémique, il est prévu de recruter un total de 80 patients DT1 déjà traités, qui présentent un DT1 déséquilibré, sans altération de la fonction rénale ni albuminurie. Comme groupe de comparaison, nous recruterons 63 sujets ne présentant ni diabète ni dyslipidémie dans l'objectif d'évaluer si l'amélioration de l'équilibre glycémique dans le groupe DT1 permet de restaurer les fonctions antiathérogènes et la composition des HDL à un niveau comparable à celui de ce groupe contrôle. Il s'agit d'une étude interventionnelle consistant en une intensification thérapeutique pendant trois mois chez les participants DT1 (modification de l'insulinothérapie, éducation thérapeutique et règles hygiéno-diététiques).

La partie expérimentale du projet consistera :

- à évaluer les fonctions antiathérogènes des HDL suivantes :
 - capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol de macrophages THP-1.
 - inhibition de l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 induite par le TNF- α à la surface des cellules HUVEC (*Human Umbilical Vascular Endothelial Cell*).
 - stimulation de la production de monoxyde d'azote (NO) et de la phosphorylation activatrice d'eNOS sur sa sérine 1177 et d'Akt sur sa sérine 473 dans les cellules endothéliales HUVEC.
 - inhibition *in vitro* de l'oxydation de lipoprotéines de faible densité (LDL) témoins.
- à déterminer la composition des HDL en phospholipides, sphingolipides, triglycérides, cholestérol libre, cholestérol estérifié, protéines totales, apoAI, apoM, SAA, résidus carboxyméthyl-lysine et carbamyl-lysine.
- à mesurer les activités paraoxonase-1 et lecithine cholestérol acyltransférase associées aux HDL, ainsi que la concentration circulante de myéloperoxydase (source d'oxydation des HDL).
- à évaluer la taille des HDL.

- Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat) :

La partie expérimentale de ce projet (réactifs, consommables et frais de plateforme) sera financé par :

- bourses de recherche :
 - « Recherche Clinique et Translationnelle » de la Région Bourgogne Franche Comté, obtenu en 2024 (60 000 euros).
 - Appel d'offre interne du CHU de Dijon, obtenu en 2023 (35 000 euros).
- dotations de fonctionnement de l'équipe d'accueil.

- connaissances et compétences requises :

- Connaissances théoriques de base : culture cellulaire, cytométrie en flux, techniques chromatographiques.

Résumé en français et anglais (limité chacun à 1800 caractères)

Les anomalies affectant la composition et les fonctions antiathérogènes des lipoprotéines de haute densité (HDL) sont susceptibles de contribuer à l'élévation du risque cardiovasculaire chez les patients atteints de diabète de type 1 (DT1). Cette étude clinique vise à évaluer l'impact de la présence d'une néphropathie et du contrôle glycémique sur la composition et la fonctionnalité des HDL des patients DT1. Elle inclura 120 patients DT1 à différents stades de néphropathie et 80 autres patients DT1 avec un niveau de contrôle glycémique non satisfaisant. Ce dernier groupe fera l'objet d'une intervention thérapeutique pendant trois mois afin d'améliorer le contrôle glycémique. La partie expérimentale du projet consiste à évaluer les fonctions antiathérogènes des HDL suivantes : capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol de macrophages THP-1, inhibition de l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 induite par le TNF- α à la surface des cellules HUVEC (*Human Umbilical Vascular Endothelial Cell*), stimulation de la production de monoxyde d'azote (NO) et de la phosphorylation activatrice de la NO synthase endothéliale dans les cellules, et inhibition *in vitro* de l'oxydation de lipoprotéines de faible densité (LDL) témoins. En parallèle, la composition détaillée des particules HDL et leur taille seront évaluées, notamment par analyse lipidomique en spectrométrie de masse, afin de déterminer les déterminants moléculaires à l'origine des altérations des fonctions antiathérogènes des HDL. Ceci revêt une importance particulière pour identifier des cibles thérapeutiques à visée cardioprotectrice dans la population DT1.

Abnormalities affecting the composition and anti-atherogenic functions of high-density lipoproteins (HDL) are likely to contribute to the increased cardiovascular risk in patients with type 1 diabetes (T1D). The present study aims to assess the impact of nephropathy and glycemic control on the composition and functionality of HDL in T1D patients. It will include 120 T1D patients at different stages of nephropathy and an additional 80 T1D patients with insufficient glycemic control. The latter group will undergo a therapeutic intervention for three months to improve glycemic control. The experimental part of the project focuses on evaluating the following anti-atherogenic functions of HDL: the capacity to promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages, the inhibition of TNF- α -induced expression of the adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1 at the surface of HUVEC endothelial cells, the stimulation of nitric oxide (NO) production and the activating phosphorylation of endothelial NO synthase in HUVEC cells, and the inhibition of the *in vitro* oxidation of control low-density lipoproteins (LDL). Concurrently, a detailed analysis of HDL particle composition and size will be conducted, particularly through lipidomic analysis using mass spectrometry, to identify the molecular patterns underlying HDL dysfunction. This is of particular importance for identifying new cardioprotective therapeutic targets in the T1D population.

Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous (2 choix possibles maximum – ne pas modifier les intitulés : ils sont imposés par certains sites web) :

Biologie

Santé, médecine humaine, vétérinaire

Mots clés : diabète de type 1 ; lipoprotéines de haute densité ; efflux de cholestérol ; risque cardiovasculaire ; lipidomique ; cytométrie en flux.