Significations physiopathologiques des hémorphines de type 7 dans le diabète et les cancers broncho-pulmonaires

Delphine Féron

▶ **To cite this version:**

Delphine Féron. Significations physiopathologiques des hémorphines de type 7 dans le diabète et les cancers broncho-pulmonaires. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2010. Français. NNT : 2010LAROS293 . tel-00537556

HAL Id: tel-00537556

https://theses.hal.science/tel-00537556

Submitted on 18 Nov 2010

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.

UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE
Sciences pour l'environnement Gay Lussac

Laboratoire LIENSs

THÈSE

présentée par :

Delphine FERON

soutenue le 30 Avril 2010
pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Biochimie

Significations physiopathologiques des hémorphines de type 7 dans le diabète et les cancers broncho-pulmonaires

---

JURY :

Bernard VIALETTES	Professeur, Université de Marseille, Rapporteur
Olivier MEILHAC	Chargé de Recherche, INSERM, Paris, Rapporteur
Jean-Marie PIOT	Professeur, Université de La Rochelle, Directeur de thèse
Ingrid ARNAUDIN	Maître de conférences, Université de La Rochelle, Examinatrice
Claudine KIEDA	Directeur de Recherche, CNRS, Orléans, Examinatrice

UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE
Sciences pour l'environnement Gay Lussac

Laboratoire LIENSs

THÈSE

présentée par :

Delphine FERON

soutenue le 30 Avril 2010
pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Biochimie

Significations physiopathologiques des hémorphines de type 7 dans le diabète et les cancers broncho-pulmonaires

---

JURY :

Bernard VIALETTES	Professeur, Université de Marseille, Rapporteur
Olivier MEILHAC	Chargé de Recherche, INSERM, Paris, Rapporteur
Jean-Marie PIOT	Professeur, Université de La Rochelle, Directeur de thèse
Ingrid ARNAUDIN	Maître de conférences, Université de La Rochelle, Examinatrice
Claudine KIEDA	Directeur de Recherche, CNRS, Orléans, Examinatrice

A mes parents,

« Une thèse est la somme d'un travail collectif
où l'apport de chacun,
bien que d'importance inégale,
est indispensable et précieux. »

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du laboratoire Littoral Environnement et Sociétés, dirigé par le Professeur Sylvain Lamare. Je le remercie de m'y avoir accueillie depuis mon arrivée en Master 2 et durant mes trois années de doctorat.

Le bon déroulement de ce travail a été possible grâce à mes deux co-directeurs de thèse, Ingrid Fruitier-Arnaudin et Jean-Marie Piot. Je leur suis reconnaissante des moyens qu'ils ont mis à ma disposition et du soutien qu'ils m'ont apporté. Je les remercie de la confiance qu'ils m'ont montrée en me laissant travailler sur de nombreux projets.

Je remercie également les rapporteurs et membres du jury de cette thèse qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail :

- Dr Vialettes Bernard, Professeur de l'Université de Marseille, Praticien Hospitalier à La Timone, rapporteur de ce travail.

- Mr Meilhac Olivier, Chargé de Recherche Inserm, Unité Inserm 698, CHU Bichat à Paris, rapporteur de ce travail.

- Mme Kieda, Directeur de Recherche CNRS, UPR CNRS 4301 à Orléans, examinatrice de ce travail.

Une partie de mon travail a été réalisée au laboratoire chimie analytique, Faculté de Pharmacie, à Marseille. Je remercie le Pr Portugal de m'y avoir accueillie.

Je remercie l'Ecole Doctorale de La Rochelle ainsi que la cellule Hygiène et Sécurité de l'Université de La Rochelle pour le financement de ma formation à l'expérimentation animale, réalisée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à ce travail au laboratoire que ce soit en m'aidant à la paillasse, en me conseillant ou en m'écoutant : Laurent, Michel, Valérie S., Isabelle G., Isabelle L., Nicolas B, Hélène, Hervé, Guillaume, Manu, Zsu, Mika, Vanessa, Valérie T., Cyrille, Sandrine, Viviane.

Cette thèse est aussi le travail de Myriam et Nicolas J. que j'ai eu la chance d'encadrer pendant ma thèse. J'espère vous avoir motivés à devenir chercheurs…. Merci pour votre soutien et bonne chance à vous dans ce domaine.

Je remercie aussi Laetitia qui a su m'alléger de nombreuses fois des soucis administratifs et qui a pris le temps de m'écouter et de m'encourager à plusieurs reprises.

Je tenais à remercier plus particulièrement :

- Laurence, tout d'abord une collègue, maintenant une amie. Tu m'as accueillie au labo, tu m'a souvent aidée à la paillasse, je me souviens moi aussi de nos manips sous la hotte…merci pour tes conseils, ton écoute.

- Matthieu et Pierre, mes deux collègues de bureau, qui m'ont écoutée, aidée à relativiser, à ne pas baisser les bras. Vous avez été une bouffée d'air frais pour moi. Merci.

- Virginie, merci pour toutes nos discussions, ton écoute et tes conseils, bonne chance à toi pour la suite.

Merci également à mes amis, Cédric, Annabelle, Jé, Célia, Grand Jean, Mandine, Ptij, Piouf, Tom M., Tonio et Sarah ,Isa, Nono et Valou…qui m'ont soutenue chacun à leur façon même dans les moments difficiles.

Il y a aussi ceux qui n'était pas au labo mais qui ont vécu cette thèse avec moi. Je tiens à remercier ma famille, Mamie, Bichon, Céline, JP, Pezet et Martine, et surtout mes parents pour leur soutien inconditionnel et leur écoute ; merci maman pour les corrections de la thèse. Je remercie également ma belle-famille, Brigitte, Philippe, Marilou, Clémence, Guillaume, France, James et Pierre pour m'avoir écoutée et toujours soutenue quelque soit mes décisions.

Enfin je souhaite remercier celui avec qui je partage ma vie pour son écoute et sa patience. Mon amour, merci d'avoir toujours cru en moi.

ABREVIATIONS

AAA : anévrisme de l'aorte abdominale

AH : acide hippurique

AngIV : angiotensine IV

CD : cathepsine D

CLHP : chromatographie liquide haute performance

DPPIV : dipeptidyl Peptidase IV

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay

FC : fraction cytosolique

FM : fraction membranaire

FT : fraction totale

GLP : glucagon like peptide

HbA1c : Hémoglobine A_{1C}

Hémorphines :
LVVH7 : LVV-Hémorphine-7
LVVH5 : LVV-Hémorphine-5
VVH7 : VV-Hémorphine-7
VVH5 : VV-Hémorphine-5
H7 : Hémorphine-7

HHL : hippuryl-L-histidyl-L-leucine

HTA : hypertension artérielle

IECA : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

IL : interleukine

IRAP : aminopeptidase régulée par l'insuline p/v : poids/volume ; v/v : volume/volume

LDH : lactate déshydrogénase

MEC : matrice extracellulaire

MMP : métalloprotéase

SRA : système Rénine-Angiotensine

TCA : acide tricholoroacétique

TNF : tumor necrosis facteur

LISTE

DES TABLEAUX ET FIGURES

A- Les Figures

Figure 1 : Séquence en acides aminés de la chaîne β de l'hémoglobine humaine 2

Figure 2 : Régulation du SRA par les IECA..... 8

Figure 3 : Interaction des hémorphines dans le SRA 10

Figure 4 : Interaction AngIV/IRAP/GLUT4 dans une cellule régulée par l'insuline (Vanderheyden, 2009)..... 14

Figure 5 : Sites de coupure de la cathepsine D sur la séquence de la chaîne β de l'hémoglobine bovine après quatre heures d'hydrolyse d'après (Fruitier, 1999) et (Fruitier *et al.*, 1999) 18

Figure 6 : Représentation schématique de la régulation de concentration en glucose dans le sang (a) cellule de personne non diabétique, (b) cellule de personne diabétique 23

Figure 7 : Mécanisme de translocation membranaire de GLUT4 par signalisation insulinique..... 24

Figure 8: Mécanisme de glycation des protéines 28

Figure 9 : Corrélation entre la concentration en hémorphines de type 7 et la pression artérielle diurne. 42

Figure 10 : Evolution de la cellule cancéreuse en cellule métastasée..... 48

Figure 11 : Principales étapes impliquées dans l'activation des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse..... 49

Figure 12 : Courbe de calibration typique de VVH7 en ELISA 81

Figure 13 : Répartition des concentrations en hémorphines de type 7 pour chaque catégorie de patients..... 83

Figure 14 : Analyse par CLHP de l'hydrolyse d'une hémoglobine glyquée à 10,7% par la cathepsine D après 30 minutes..... 93

Figure 15 : 1) Analyse LC/MS à 280nm de l'hydrolyse d'une glycohémoglobine (10,7%) par la cathepsine D pendant 10 minutes 2) Spectre de masse entre 12,9 et 14,7 minutes 3) Spectre de masse du peptide LVVH7 synthétique entre 13,1 et 16,4 minutes. 95

Figure 16 : Effet de la glycation de l'hémoglobine sur la libération de LVVH7 97

Figure 17 : Effet du rapport E/S sur la libération de LVVH7. 98

Figure 18 : Vitesses initiales de l'hydrolyse de glycohémoglobines par la cathepsine D à différents rapports E/S 99

Figure 19 : Représentation schématique de la méthode de séparation des fractions cellulaires..... 106

Figure 20: Evolution de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps pour la FC (A) et la FT (B)..... 113

Figure 21: Plan de charge des protéines transférées sur une membrane de nitrocellulose (anticorps 1 : 1/200 et anticorps 2 : 1/10000) 117

Figure 22: Histogramme représentant les quantités de protéines finales présentes au niveau des fractions protéiques lyophilisées issues des adipocytes dans différentes conditions de culture. 119

Figure 23: Marquage immunocytochimique de GLUT4 dans les adipocytes humains en condition témoin, grossissement x400. 120

Figure 24: Histogrammes représentant de l'évolution de la concentration en nitroalanine pour les quatre conditions de culture à différents temps d'incubation du substrat (A) t = 0 minutes (B) t = 18 minutes et (C) t= 60 minutes. 122

Figure 25: Représentation schématique récapitulative de l'approche expérimentale utilisée pour l'étude du pouvoir protéolytique de fractions cellulaires de cancers pulmonaires 133

Figure 26 : Chromatogramme à 280 nm d'un surnageant de culture de la lignée H460 cultivé à 10% de SVF en milieu acidifié (MOPS) 140

Figure 27 : Analyse par CLHP à 280 nm des hydrolysats résultant de l'action d'un surnageant de culture des lignées A549 et H460 avec ou sans SVF 141

Figure 28 : Analyse CLHP à 280 nm de l'hydrolysat résultant de l'action d'un surnageant de culture de la lignée H460 dans du tampon HEPES avec ou sans SVF 143

Figure 29 : Chromatogramme à 280 nm de l'hydrolysat résultant de l'action d'un surnageant de culture de la lignée H460 dans du tampon MOPS avec SVF (A) ou sans SVF (B) 144

Figure 30 : Film photographique du Western Blot des surnageants des deux fractions protéiques et du lysat total tissues des cellules MCF 7 149

Figure 31 : Film photographique du Western Blot des surnageants des cellules A549 et H460 151

Figure 32 : Immunocoloration de (L)VVH7 dans la media et l'adventice d'un AAA (coloration rouge). Les noyaux sont repérés par DAPI (bleu). 160

Figure 33 : Concentration en hémorphines de type 7 dans le sérum de patients souffrant d'AAA et de sujets sains. D représente le diamètre de l'aorte abdominale, * $p < 0,05$. 161

B- Les Tableaux

Tableau 1 : Séquences en acides aminés de quelques peptides de la famille hémorphines issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine et humaine..... 3

Tableau 2 : Nom et localisation cellulaire des hémorphines de type 7..... 4

Tableau 3 : Inhibition de l'activité ECA en présence de bradykinine et d'hémorphines..... 9

Tableau 4 : Similitude de séquence entre l'angiotensine IV et deux hémorphines 11

Tableau 5 : Effets combinés d'AngIV et de LVVH7 sur le récepteur AT4..... 13

Tableau 6 : Présence des hémorphines dans divers environnements pathologiques 15

Tableau 7 : Composition des différentes hémoglobines..... 17

Tableau 8 : Classification des types et sous-types du cancer du poumon..... 46

Tableau 9 : Marqueurs utilisés dans le dépistage de certains cancers 54

Tableau 10 : Caractéristiques des patients dont les sera ont été dosés (moyenne ± σ)..... 64

Tableau 11 : Taux d'HbA1c des patients étudiés..... 65

Tableau 12 : Conditions d'élution appliquées à la séparation des échantillons et témoins d'hydrolyse sur une colonne C18 en phase inverse..... 76

Tableau 13 : Gradient d'élution appliqué à l'analyse des peptides hémorphine-7 par LC/MS..... 79

Tableau 14 : Concentration sérique et écart-type en hémorphines de type 7 (H7) des contrôles, patients diabétiques de type 1 et de type 2 82

Tableau 15 : Comparaison de la concentration en hémorphine de type 7 pour chaque catégorie de patients (C : contrôle, T1 : type 1, T2 : type 2, T1/T2 : tous types confondus) par un test de Mann-Whitney..... 84

Tableau 16 : Mesure des corrélations entre les concentrations en hémorphines de type-7 et divers paramètres cliniques..... 86

Tableau 17 : Activité enzymatique sérique de la cathepsine D, de la DPPIV et de l'eca pour chaque catégorie de patients (C : contrôle, T1 : type 1, T2 : type 2, TT : type 1 et type 2)..... 88

Tableau 18 : Activité enzymatique de l'ECA en fonction du traitement pour des patients diabétiques de type 1 90

Tableau 19 : Coefficient de corrélation entre les activités sériques des trois enzymes testées et les hémorphines de type 7 (H7)..... 90

Tableau 20 : Etapes permettant de révéler la présence du récepteur GLUT4 à la surface des adipocytes humains. 112

Tableau 21 : Activité enzymatique de LDH dans la FC et la FT 115

Tableau 22 : Temps de rétention caractéristique pour chaque peptide..... 139

Tableau 23 : Concentration en hémorphines de type 7 dans les hydrolysats provenant de l'action des surnageants de culture sur l'hémoglobine..... 146

Tableau 24 : Quantité de protéines déposées pour chaque fraction et pour la cathepsine D commerciale sur un même gel d'électrophorèse..... 148

Tableau 25 : Résultats du dosage de l'activité cathepsine D dans les surnageants et culots de culture cellulaire des lignée A549 et H460 152

Sommaire

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....1

1 - Présentation du système peptidergique de type hémorphine.....2

1.1 - Origine et découverte des hémorphines.....2

1.2 - Caractéristiques structurales.....2

1.3 - Activités et effets biologiques.....4

1.4 - Métabolisme des hémorphines.....16

2 - Le diabète.....21

2.1 - Epidémiologie.....21

2.2 - Description de la maladie.....22

2.3 - Complications.....26

2.4 - Dépistage du diabète.....34

2.5 - Les traitements.....38

2.6 - Données préliminaires entre les hémorphines de type 7 et le diabète.....40

3 - Les cancers broncho-pulmonaires.....44

3.1 - Epidémiologie.....44

3.2 - Facteurs de risque.....45

3.3 - Diagnostic.....45

3.4 - Type de cancer.....46

3.5 - Biochimie du cancer.....46

POSITIONNEMENT DU SUJET.....55

CHAPITRE 1 : ETUDE DES HEMORPHINES DE TYPE 7 DANS LE DIABETE.....60

PARTIE A : SIGNIFICATION ET CONSEQUENCES PRONOSTIQUES DE LA BAISSE DES HEMORPHINES DE TYPE 7 DANS LE DIABETE.....61

1 - Matériels et méthodes.....62

1.1 - Les patients.....62

1.2 - Dosage immunoenzymatique des hémorphines de type 7.....65

1.3 - Dosage de l'activité de trois enzymes impliquées dans le métabolisme des hémorphines de type 7.....70

1.4 - Hydrolyse de l'hémoglobine glyquée par la cathepsine D.....74

2 - Résultats – Discussion.....80

2.1 - Concentration en hémorphines de type 7 sériques : application au diabète.....80

2.2 - Etude de l'activité sérique des enzymes impliquées dans le métabolisme des hémorphines de type 7.....87

2.3 - Etude du rôle de la glycation de l'hémoglobine sur la libération des hémorphines de type 7.....92

3 – Conclusions.....100

PARTIE B : ETUDE DU ROLE DES HEMORPHINES DE TYPE 7 DANS LA TRANSLOCATION DU RECEPTEUR GLUT4 A LA MEMBRANE DES ADIPOCYTES. 103

1 - Matériels et méthodes *104*

1.1 - Culture des adipocytes humains 104

1.2 - Préparation des fractions cytosoliques et membranaires 105

1.3 - Analyse des fractions cellulaires 107

1.4 - Etudes conduites sur cultures de cellules adipocytaires 109

2 - Résultats et discussion *113*

2.1 - Validation du protocole de fractionnement mis en place 113

2.2. - Identification du récepteur GLUT4 à la surface des adipocytes 115

2.3 – Etude de l'activité du récepteur IRAP à la membrane des adipocytes 121

3 - Conclusions *125*

CHAPITRE 2 : CARACTERISATION ET ACTIVITE BIOLOGIQUE DES HEMORPHINES DE TYPE 7 DANS LE MICROENVIRONNEMENT DU CANCER BRONCHO-PULMONAIRE 128

1 – Matériels et méthodes *131*

1.1 - Culture de cellules de cancers broncho-pulmonaires 131

1.2 - Etude du pouvoir protéolytique d'extraits cellulaires de cancers broncho-pulmonaires 132

1.3 - Caractérisation des protéases acides de l'environnement tumorale pulmonaire : application à la cathepsine D 136

2 – Résultats - Discussion *138*

2.1 - Analyse des produits d'hydrolyse de l'hémoglobine par les extraits cellulaires de cancers pulmonaires 138

2.2 - Caractérisation d'une protéase active dans le microenvironnement tumoral : la cathepsine D 147

> Western blot révélé par coloration au TMB 147

> Western Blot révélé par chimioluminescence 148

2.3 - Impact des hémorphines sur la croissance des cellules cancéreuses pulmonaires 153

3 - Conclusions *154*

PROJET COLLABORATIF : ETUDE DES HEMORPHINES DE TYPE 7 DANS LES ANEVRISMES DE L'AORTE ABDOMINALE 156

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES 163

RÉFÉRENCES 170

ANNEXES 181

Introduction bibliographique

1 - Présentation du système peptidergique de type hémorphine

1.1 - Origine et découverte des hémorphines

Les peptides du nom de hémorphines sont de courts peptides multifonctionnels dont la découverte a été faite par *Brantl et coll (1986)*. Ils proviennent de la protéolyse de la chaine β de l'hémoglobine. C'est en voulant purifier une exorphine que *Brantl et coll* découvrirent un fragment à activité opiacé composé de quatre acides aminés (Tyr-Pro-Trp-Thr), cette séquence correspond aux motifs 34-37 de la chaine β de l'hémoglobine humaine et bovine.

Figure 1 : **Séquence en acides aminés de la chaîne β de l'hémoglobine humaine**

1	VHLTPEEKSA	VTALWGKVNV	DEVGGEALGR	LLVV**YPWT**QR	FFESFGDLST
51	PDAVMGNPKV	KAHGKKVLGA	FSDGLAHLDN	LKGTFATLSE	LHCDKLHVDP
101	ENFRLLGNVL	VCVLAHHFGK	EFTPPVQAAY	QKVVAGVANA	LAHKYH

Ces peptides font aujourd'hui partie d'un nouveau concept désigné sous le terme de cryptome (Pimenta & Lebrun, 2007), qui correspond à une partie du protéome. Le cryptome rassemble les protéines qui sont capables de générer des peptides bioactifs (cryptides) ou des protéines (cryptéines) après avoir été soumis à un clivage protéolytique selon Autelino et coll, 2006. Ainsi, une zone cryptique enfouie dans la chaîne β de l'hémoglobine et correspondant au fragment 32-41 (chez l'homme) de cette même chaîne définit la zone hémorphine (Piot *et al.*, 1992).

1.2 - Caractéristiques structurales

Par la suite, de nombreuses études ont permis de démontrer l'existence d'une famille d'hémorphines dont la structure se caractérise par une extension C-terminale ou N-terminale du tétrapeptide Tyr-Pro-Trp-Thr. Leur séquence est comprise entre 4 et 10 acides aminés. Le

plus long étant LVV-hémorphine-7 (LVVYPWTQRF), découvert mais non identifié par Chang et coll (1980).

Le premier fragment peptidique isolé à partir de la séquence de l'hémoglobine a été nommé hémorphine-4 du fait de son origine (chaîne β de l'hémoglobine (Brantl *et al.*, 1986), du nombre d'acides aminés le caractérisant (Tyr-Pro-Trp-Thr) et de par son activité opiacée.

Tableau 1 : **Séquences en acides aminés de quelques peptides de la famille hémorphines issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine et humaine**

Position	Peptides	Structure	*Références*
β 34-37	Hémorphine-4	YPWT	*(Brantl et al., 1986)*
β 34-38	Hémorphine-5	YPWTQ	*(Brantl et al., 1986)*
β 32-38	VV-Hémorphine-5	VVYPWTQ	*(Erchegyi et al., 1992)*
β 32-38	Hémorphine-6	YPWTQR	*(Glamsta et al., 1993)*
β 32-38	LVV-Hémorphine-6	LVVYPWTQR	*(Lantz et al., 1991)*
β 32-38	Hémorphine-7	YPWTQRF	*(Lantz et al., 1991)*
β 32-40	VV-Hémorphine-7	VVYPWTQRF	*(Piot et al., 1992)*
β 31-40	LVV-Hémorphine-7	LVVYPWTQRF	*(Piot et al., 1992)*

A partir de 1991, de nombreux auteurs se sont intéressés à la libération de ces hémorphines *in vivo*. Ces peptides proviennent de l'action d'une enzyme *in vitro* sur l'hémoglobine, plusieurs études ont montré la libération de ces peptides *in vivo* à partir d'hémoglobine circulante. Cette hémoglobine, cible de diverses protéases, peut être dégradée, libérant ainsi *in vivo* des fragments peptidiques dont les hémorphines (Brantl *et al.*, 1986) ; (Glamsta *et al.*, 1992b). Certaines conditions physiologiques favorisent la libération

d'hémorphines notamment les environnements hémorragiques. En 1992, Glämsta et coll ont isolé LVVH7 en forte concentration dans hémorragies méningées.

Tableau 2 : Nom et localisation cellulaire des hémorphines de type 7

Source	Hémorphines	Références
Hypothalamus porcin	LVVH7 VVH7	(Chang *et al.*, 1980)
Cerveau de rat	LVVH7	(Skold *et al.*, 2002)
Cervelet bovin	LVVH7 VVH7	(Karelin *et al.*, 1994)
Glande surrénale humaine	LVVH7 VVH7	(Cerpa-Poljak *et al.*, 1997)
Plasma sanguin humain	H7	(Glamsta *et al.*, 1993)
Liquide céphalo-rachidien	LVVH7	(Glamsta *et al.*, 1992a)
Hémodialyse de patients	LVVH7	(Nyberg *et al.*, 1996)
Ecoulement gingival	LVVH7	(Mäkinen *et al.*, 1996)
Liquide de lavage bronchoalvéolaire	LVVH7	(Duethman *et al.*, 2000)

1.3 - Activités et effets biologiques

Les hémorphines sont représentées dans de nombreux compartiments tissulaires ce qui a conduit les scientifiques à vouloir comprendre comment les hémorphines pouvaient agir *in vivo.* Cette partie est consacrée à la présentation des principales activités biologiques des hémorphines. La première partie abordera leur activité morphinomimétique alors que la seconde expliquera leur rôle au sein du Système Rénine-Angiotensine (SRA). Enfin la dernière partie s'intéressera à la présence des hémorphines dans les pathologies.

1.3.1 - Activité morphinomimétique

Brantl et coll (1986) ont montré que des peptides issus du traitement enzymatique de l'hémoglobine, les hémorphines, peuvent se lier aux récepteurs opiacés. L'activité opioïde de l'ensemble de ces peptides a été confirmée par l'emploi du test GPI (Ginea Pig Ileum), tests biologiques *in vitro*. Les substances opioïdes modulent la libération de neuromédiateurs dans le système nerveux central et périphérique par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques : les récepteurs aux opioïdes ; trois classes de récepteurs (μ, δ et κ) existent. L'heptapeptide H7 semble être l'agoniste des récepteurs de type μ le plus puissant (Nyberg *et al.*, 1997b), il active donc ce récepteur. Il a aussi été démontré que les hémorphines peuvent être des antagonistes de récepteurs opiacés. Ainsi, des effets antagonistes ont été observés dans des préparations de *vas deferens* ou canal déférent de rat, tissu contenant de nombreux récepteurs de réserve (Yukhananov *et al.*, 1994).

De plus, les hémorphines sont également capables d'imiter les peptides opioïdes classiques en regard de leurs propriétés analgésiques, vraisemblablement le plus souvent par une activation du système opiacé. La première étude sur cet effet biologique des hémorphines a été réalisée par Davis et coll (1989). Les effets de l'injection centrale de fragments peptides obtenus de la chaîne-β de l'hémoglobine (hémorphines-4 et 5), ont été examinés dans deux modèles de nociception phasique et tonique de souris. Les résultats obtenus démontrent que les hémorphines-4 et 5 exercent des actions opioïdes réversibles par naloxone *in vivo*. La fixation de ces deux peptides sur les récepteurs opiacés entraînerait une inhibition de la perception de la douleur. Par la suite, Sheffer et coll (1990) ont démontré que l'hémorphine-4 et l'hémorphine-7 pouvaient induire la libération de β endorphine et de dynorphine à partir du tissu *in vitro*, suggérant que ces hémorphines pourraient produire une analgésie par activation du système opioïde classique. Dans le même contexte, il semblerait que la présence d'hémorphine-7 dans le plasma de coureur d'endurance provoquerait des effets analgésiques et euphorisants après l'effort (Glamsta *et al.*, 1993). Récemment, la même observation a été faite avec des chevaux soumis à un exercice de course (Collinder *et al.*, 2005). Le taux d'hémorphine-7 a sensiblement augmenté lors des exercices à grande vitesse. Les auteurs suggèrent que la libération du peptide serait impliquée dans les fonctions de régulation liées à la douleur, l'effort physique, l'inflammation et les variations de tension artérielle.

1.3.2 - Intervention dans le système Rénine-Angiotensine (SRA)

1.3.2.a - Le Système Rénine-Angiotensine (SRA)

Durant les vingt dernières années, le Système Rénine-Angiotensine (SRA) a fait l'objet de nombreuses études tant cliniques que fondamentales dans le domaine cardiovasculaire. Impliqué dans de nombreuses régulations, il joue un rôle majeur dans celle du tonus vasculaire. Le SRA apparaît comme un système circulant avec trois composants : la rénine sécrétée par le rein, l'angiotensinogène par le foie et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) par le poumon, permettant la synthèse d'angiotensine II, élément actif du système dont les effets sont médiés principalement par le récepteur à l'angiotensine AT_1. La découverte d'un SRA tissulaire ainsi que la compréhension de son rôle central dans la physiopathologie de l'athérogénèse et des remodelages vasculaires ont constitué une avancée considérable (Dzau *et al.*, 2002). Plus récemment, des recherches fondamentales ont mis en évidence qu'une partie ou la totalité des éléments du SRA peuvent être présents dans de nombreux tissus. L'enzyme de conversion est retrouvée à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux et la rénine peut être séquestrée dans la paroi vasculaire. Plusieurs tissus expriment les ARN messagers de la rénine, de l'angiotensinogène et de l'enzyme de conversion : le cerveau, les vaisseaux, les reins, le cœur. Ces constatations sont en faveur de SRA complets dans un même organe. Ainsi, il a été mis en évidence l'existence d'un SRA spécifique cérébral (Culman *et al.*, 2001) qui ressemble au SRA périphérique. Il participe à la régulation centrale de la pression artérielle. Il complète l'action périphérique vasoconstrictrice du SRA circulant. Comme le SRA périphérique, il est impliqué dans la physiopathologie de maladies cardiovasculaires (HTA, athérosclérose) et de leurs complications cérébrales.

L'activation chronique du SRA est à l'origine de nombreuses pathologies cardiovasculaires. Des essais cliniques pertinents ayant démontré que le blocage du SRA diminue la morbidité et la mortalité de l'hypertension artérielle (HTA), de l'infarctus du myocarde, de l'insuffisance cardiaque, des complications de l'athérosclérose (coronaropathies, néphropathies) ainsi que celles du diabète, pathologies souvent liées. Il a été admis que la meilleure stratégie pour la prévention des maladies cardiovasculaires était l'inhibition du SRA (Zaman *et al.*, 2002).

1.3.2.b - Inhibition de l'ECA

L'enzyme de conversion (EC 3.4.15.1) est une métallopeptidase à zinc appartenant au système rénine angiotensine qui joue un rôle important dans le contrôle de la pression artérielle et dans la physiopathologie de l'HTA. L'enzyme de conversion (ECA) est une enzyme membranaire de l'endothélium de nombreux vaisseaux, on la retrouve en forte concentration dans les vaisseaux pulmonaires. L'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) ou d'antagonistes des récepteurs AT_1 de l'angiotensine II semble appropriée pour traiter les pathologies cardiovasculaires impliquant le SRA et prévenir les complications attendues.

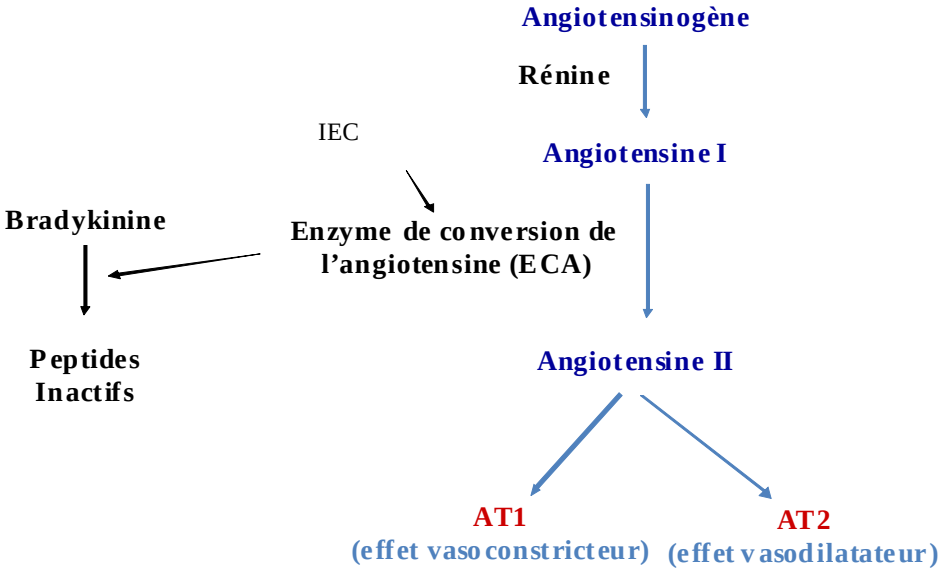
L'ECA catalyse la transformation de l'angiotensine I en angiotensine II, molécule ayant plusieurs fonctions :

- provoque un effet vasoconstricteur important,
- augmente la production d'hormone antidiurétique
- favorise la rétention sodée
- permet l'hydrolyse des bradykinines (substances vasodilatatrices).

Depuis que l'effet vasopresseur de l'angiotensine II a été caractérisé, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) sont devenus une stratégie importante dans le traitement de l'HTA. Après administration d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion :

- les effets de l'injection d'angiotensine I, vasoconstriction et sécrétion d'aldostérone, sont diminués ou supprimés,
- les effets de l'injection d'angiotensine II, vasoconstriction et sécrétion d'aldostérone, ne sont pas modifiés,
- les effets de la bradykinine, qui n'est plus détruite par l'enzyme de conversion, sont augmentés.

Figure 2 : Régulation du SRA par les IECA



La bradykinine est un polypeptide endogène, vasodilatateur, formé de neuf acides aminés, libéré à partir du bradykininogène des globulines plasmatiques. Celle-ci est impliquée dans divers processus physiologiques et physiopathologiques comme la douleur, les allergies (asthme, allergies chroniques, rhinites allergiques), les inflammations chroniques (arthrose, colite, polyarthrite) et aigues (chocs septiques) et certaines maladies cardiovasculaires (la bradykinine est un régulateur de la tension artérielle).

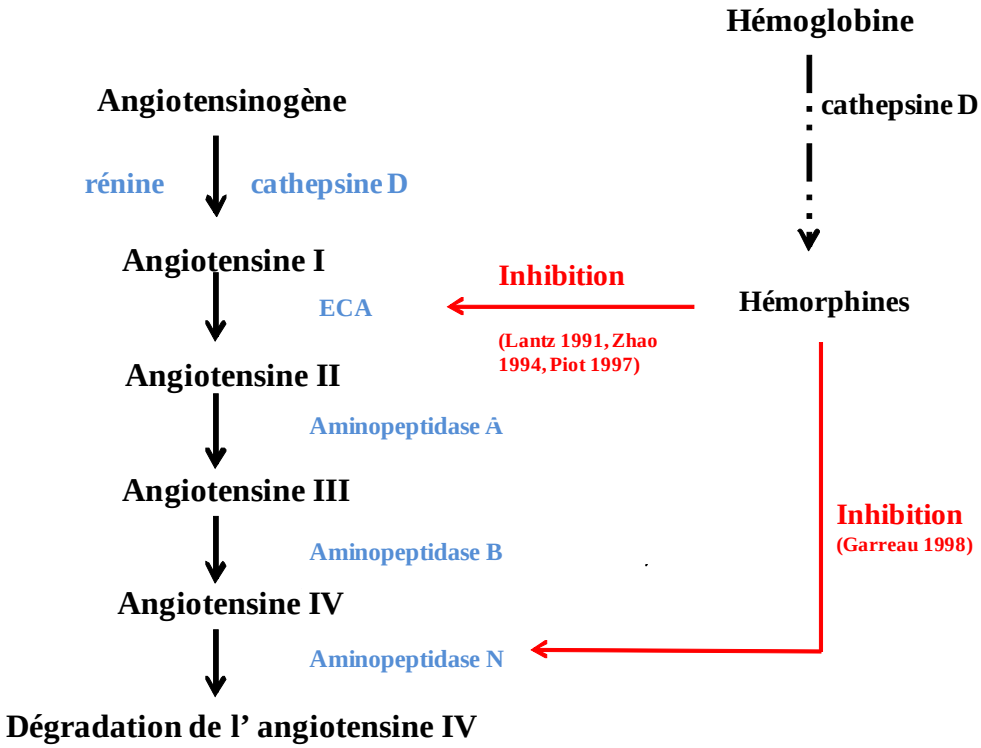
Il a été montré que les hémorphines sont des substrats et des inhibiteurs de l'ECA. Lantz et coll (1991) ont montré que deux peptides de type Hémorphine-6 et LVV-Hémorphine-6 inhibaient l'activité de l'ECA *in vitro* mais en proportion moins importante que la bradykinine pour une concentration à 100µM.

Tableau 3 : Inhibition de l'activité ECA en présence de bradykinine et d'hémorphines

Peptide	% d'inhibition
Control	0
Bradykinine	98
Hémorphine-6	63
LVV-Hémorphine-6	86

Fruitier-Arnaudin et coll (2002) ont décrit que VVH7 et la LVVH7 se comportaient comme des inhibiteurs non compétitifs de l'ECA avec des IC50 7 à 70 fois plus basses que celle de l'angiotensine IV. De plus, LVVH7 pouvait complètement inhiber l'activité enzymatique de l'ECA à une concentration de 16.7 µmol/L. L'injection d'hémorphine 7 est capable de diminuer la tension artérielle chez le rat (Cejka *et al.*, 2004). Dans la littérature, il existe une seule voix divergente ; un article de Moisan et coll (1998) montrant dans un modèle très particulier (rats anesthésiés et vagotomisés) un effet hypertenseur et tachycardisant de la LVVH7 par l'intermédiaire d'une activation du système nerveux sympathique. De plus, cet article a fait jouer un rôle primordial dans l'activité pressive de la LVVH7 aux acides aminés en position 6 et 7, respectivement une Arg et une Phe. La substitution de l'Arg en position 6 réduisait l'activité pressive de la LVVH7 d'un facteur 25.

Figure 3 : Interaction des hémorphines dans le SRA



1.3.2.c - Récepteurs AT4

L'angiotensine IV est un fragment de l'angiotensine II (3-8) pour lequel de nombreuses études ont montré un rôle dans les fonctions cognitives (Lee *et al.*, 2001), un rôle dans la modulation de la rétention sodée au niveau rénal et un effet vasodilatateur (inhibiteur compétitif de l'ECA). Ces effets sont médiés par des sites spécifiques : les récepteurs de l'angiotensine IV (AT_4) dont la présence a été démontrée tout d'abord dans l'hippocampe de cochon d'inde (Harding *et al.*, 1992) puis dans le cortex cérébral des divers bovins (Swanson *et al.*, 1992). Depuis, de nombreuses études ont été menées et ont mis en évidence une large distribution tissulaire du récepteur ainsi qu'une répartition dans diverses espèces de mammifère notamment l'humain et le singe (Harding *et al.*, 1994). Les dernières recherches scientifiques effectuées sur l'angiotensine IV ont montré que ce n'était pas seulement un métabolite provenant de la dégradation de l'angiotensine II. En effet, elles ont permis de montrer l'existence d'un autre récepteur AT4.

En 1998, Garreau et coll ont montré que les peptides contenant une valine ou une leucine à leur extrémité N-terminale et une phénylalanine à leur extrémité C-terminale peuvent être des analogues de l'angiotensine IV sur la fixation du récepteur AT4. En comparant les structures des hémorphines et de l'angiotensine IV, Garreau et al (Garreau et al., 1998) ont pu trouver une séquence « angiotensine-like » composée des deux premiers acides aminés N-terminaux de l'angiotensine IV (Val-Tyr).

Tableau 4 : Similitude de séquence entre l'angiotensine IV et deux hémorphines

Peptide	Séquence
Angiotensine (3-8) IV	**VY**IHPF
VVH7	LV**VY**PWTQRF
LVVH7	V**VY**PWTQRF

Autrement dit LVVH7, VVH7 et H7 sont des ligands potentiels du récepteur AT4. Moeller et coll (1997)ont découvert que LVVH7, isolé du cerveau de mouton, pouvait être un inhibiteur compétitif de l'angiotensine IV (K_I = 55nM). Ainsi, LVVH7 est défini comme un agoniste d'AT4 par Lee et coll (2001) car il a les mêmes effets que l'angiotensine IV sur l'amélioration de troubles cognitifs mais aussi sur l'augmentation de la dopamine extracellulaire dans le striatum de rat (Stragier *et al.*, 2004). Ces récepteurs ont été assimilés à l'aminopeptidase régulée par l'insuline (IRAP) dont la LVV-hémorphine 7 est un ligand spécifique inhibiteur de l'activité peptidase (Lee *et al.*, 2003).

La nature moléculaire du site de liaison spécifique de l'angiotensine IV (Ang-IV), initialement dénommé « récepteur » AT_4, a été identifiée récemment. Il s'agit d'une enzyme, Insulin Regulated Aminopeptidase (IRAP, E.C.3.4.11.3) (Albiston *et al.*, 2001), initialement caractérisée dans les tissus sensibles à l'insuline (adipocyte et muscle strié) (Ross *et al.*,

1997). IRAP est contenu dans des vésicules cytoplasmiques avec le transporteur de glucose GLUT4; la stimulation par l'insuline induit leur expression à la membrane (Waters *et al.*, 1997). Insérée dans la membrane, IRAP présente un fragment cytosolique et un fragment extracellulaire qui contient le site catalytique de l'activité leucine-peptidase zinc-dépendante (Thomas & Mendelsohn, 2003). Les substrats *in vivo* d'IRAP ne sont pas connus, mais *in vitro* elle clive la vasopressine, l'ocytocine, les met-enkephalines, … (Matsumoto *et al.*, 2001), (Lew *et al.*, 2003). L'Ang-IV se fixe sur la partie extracellulaire d'IRAP et inhibe son activité catalytique. Le fait que dans le placenta l'ocytocine induise l'expression à la membrane d'une enzyme dont l'ocytocine est précisément substrat a ainsi conduit à proposer l'hypothèse générale qu'un rôle physiologique d'IRAP, qui est exprimée dans de très nombreux tissus, pourrait être de permettre une boucle de rétrocontrôle négatif autocrine de la signalisation peptidique extracellulaire. Il est ainsi postulé, mais non démontré, que l'effet facilitateur de l'Ang-IV sur les processus de mémorisation soit la conséquence de l'inhibition par l'Ang-IV de la dégradation de la vasopressine et / ou de l'ocytocine.

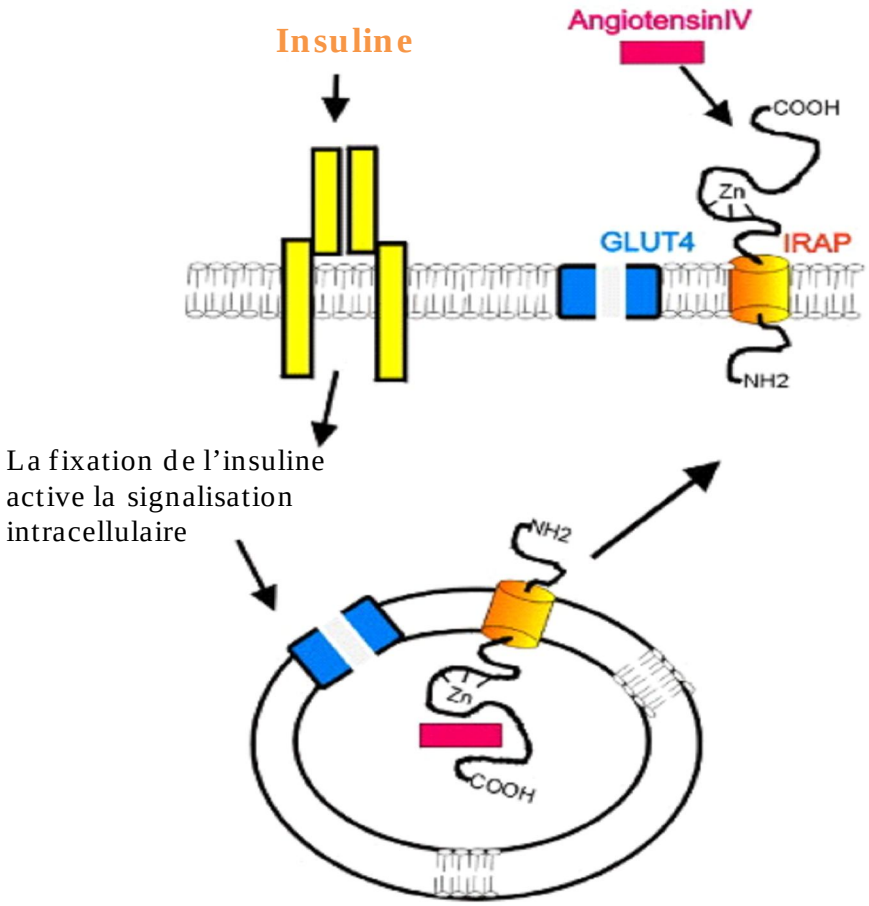
La liaison de l'Ang IV à son récepteur AT4 a fait l'objet de nombreuses études et plusieurs rôles cellulaires lui ont été affectés. Certains concernent notamment l'effet combiné de l'angiotensine IV et de LVVH7.

<u>Tableau 5</u> : Effets combinés d'AngIV et de LVVH7 sur le récepteur AT4.

Type cellulaire	Effets sur la cellule	Références
Lignée cellulaire neurone/glie NG108-15 **Lignée cellulaire de neuroblastomes humains**	AngIV et LVVH7 induisent l'incorporation de 3H-thymidine	(Moeller *et al.*, 1999)
Cerveaux de rat	AngIV et LVVH7 favorisent l'acquisition et la consolidation de la mémoire spatiale	(Lee *et al.*, 2004)
Hippocampe de souris	AngIV et LVVH7 augmentent l'absorption de glucose	(Fernando *et al.*, 2008)

AT4 ou IRAP a été décrit comme co-localisé avec le transporteur de glucose (GLUT4) dans des vésicules intracellulaires sensibles à la concentration en insuline (Keller *et al.*, 1995) dans les adipocytes (Ross *et al.*, 1997) et myocytes (Sumitani *et al.*, 1997). Plus récemment, il semblerait qu'IRAP ait été retrouvé co-localisé à GLUT4 dans des neurones de souris (Fernando *et al.*, 2007).

Figure 4 : Interaction AngIV/IRAP/GLUT4 dans une cellule régulée par l'insuline (Vanderheyden, 2009)



Récemment, il a été suggéré que la liaison des ligands à AT4 pourrait prolonger la structure d'IRAP à la membrane cellulaire de même que celle de GLUT4. Ceci pourrait avoir comme conséquence une augmentation de l'absorption du glucose par la cellule (Figure 4).

1.3.3 - Présence des hémorphines dans des contextes pathologiques

La découverte de ces peptides opiacés dans les tissus a mené de nombreuses équipes à étudier la relation entre la libération d'hémorphines et certaines situations pathologiques. Les premiers à observer ce lien sont Glämsta et coll (1992a) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients victimes d'accidents cérébraux.

Le tableau 6 présente les environnements pathologiques où les hémorphines ont été identifiées.

Tableau 6 : Présence des hémorphines dans divers environnements pathologiques

Pathologie	Hémorphines	Références
LCR accident cérébral	[LVVH7] augmente	(Glamsta *et al.*, 1992a)
Phéochromocytomes	[VVH6] et [LVVH6] diminue	(Cerpa-Poljak *et al.*, 1997)
Lavages broncho alvéolaire de patients atteints de cancer du poumon	[LVVH7] augmente	(Duethman *et al.*, 2000)
Sérums de patientes atteintes de cancer du sein	[LVVH7], [VVH7] et [H7] diminue	(Cohen *et al.*, 2003b)
Sérums de patients diabétiques	[LVVH7], [VVH7] et [H7] diminue	(Fruiter-Arnaudin *et al.*, 2003)
Cortex de patients atteints d'Alzheimer	[LVVH6] augmente	(Poljak *et al.*, 2004)
Carcinome hépatocellulaire	Présence de LVVH6	(Zhou *et al.*, 2006)

Les hémorphines et principalement les hémorphines de type 6 et 7 sont représentées de façon plus ou moins importante dans différentes pathologies (cancer, diabète et Alzheimer). Les hémorphines semblent en corrélation avec les symptômes de la maladie comme après un choc vasculaire ou un accident cérébral où l'on observe une augmentation de LVVH7. Dans d'autres cas, tels que les environnements tumoraux où la vascularisation est plus importante, il apparaît que les concentrations en hémorphines sont diminuées (phéochromocytomes, cancers du sein). La quantité et le type d'hémorphines libérées dépendent de l'environnement pathologique et des diverses protéases actives dans les tissus.

Les hémorphines mentionnées ci-dessus, identifiées *in vivo*, sont issues d'une même région de la chaîne β de l'hémoglobine, suggérant que l'hémoglobine est le précurseur (Piot *et al.*, 1992). Ces peptides peuvent être générés par protéolyse dont les conditions peuvent évoluer suivant l'état de modification du précurseur et suivant le statut physiologique et pathologique.

Quelle est l'influence de la modification du précurseur des hémorphines ? Quelles modifications protéolytiques permettraient d'expliquer les variations de production en hémorphines suivant le statut pathologique du patient ?

1.4 - Métabolisme des hémorphines

1.4.1 - Voie de biogenèse

Il a été démontré *in vivo* pour la première fois, en 1992, qu'une enzyme de type pepsine pouvait générer les hémorphines à partir d'hémoglobine (Piot *et al.*). Ces peptides ont une séquence peptidique identique à une région de la chaîne β de l'hémoglobine (LVVH7 correspond aux résidus 32-41 de l'hémoglobine humaine et 31-40 de l'hémoglobine bovine), suggérant ainsi que l'hémoglobine pouvait être le précurseur de ces peptides biologiquement actifs. Les hémorphines pourraient être libérées dans l'organisme durant la protéolyse cellulaire (catabolisme des érythrocytes) ou physiopathologique (inflammation) de l'hémoglobine.

1.4.1.a - L'hémoglobine précurseur des hémorphines

L'hémoglobine est constituée de 4 chaînes polypeptidiques, les globines, contenant un groupe prosthétique (hème ou ferroprotoporphyrine IX).

Il existe différents types d'hémoglobines en fonction de leur composition en chaînes polypeptidiques : l'hémoglobine A, A2, fœtale ou F, et l'hémoglobine A1c (Tableau 7). L'hémoglobine A représente 92% de l'hémoglobine totale et est formée de deux chaînes α et de deux chaînes β.

Tableau 7 : Composition des différentes hémoglobines

	% Hémoglobine totale	Composition
Hémoglobine A	92	2 chaînes α + 2 chaînes β
Hémoglobine A2	2,5	2 chaînes α + 2 chaînes δ
Hémoglobine F	1	2 chaînes α + 2 chaînes κ
Hémoglobine A1c	3	2 chaînes α + 2 chaînes β-N-Glc

L'hémoglobine est contenue dans les globules rouges ou érythrocytes et permet de transporter l'oxygène des poumons vers les tissus. La durée de vie des érythrocytes est de 120 jours dans la circulation, après quoi, ils sont phagocytés par les macrophages. L'hémoglobine restée intacte durant la durée de vie du globule rouge sera alors dégradée dans le macrophage. Par ailleurs, les érythrocytes peuvent être dégradés dans la circulation. On parle alors de l'hémolyse intravasculaire, mais cette voie de destruction reste minoritaire (10 à 20%). L'hémoglobine, alors libérée dans le plasma, peut se lier à l'haptoglobine, formant un complexe stable soluble, et non filtrable par le glomérule rénal (Kino *et al.*, 1987). Ce complexe sera phagocyté par le système macrophagique hépatique par lequel l'hémoglobine est dégradée.

Les cathepsines sont des protéases détruisant les protéines au niveau des lysosomes intracellulaires. Après leur synthèse ribosomiale en pro enzymes, elles sont clivées au niveau des lysosomes où elles sont actives. La cathepsine D est une endopeptidase active à pH acide (3.4.23.5). La cathepsine D est une protéase lysosomale dont la surproduction est liée à l'apparition de métastases dans le cancer du sein. On explique cette excrétion par l'importance de l'excès de synthèse qui dépasse les capacités de stockage dans les lysosomes. La présence de cathepsine D est augmentée par la présence d'oestradiol, et corrélée avec le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses mammaires. D'autres cellules tumorales secrètent en excès la cathepsine B1 (tumeurs gynécologiques). Le mode d'action biologique exact de ces enzymes n'est pas démontré puisqu'elles n'agissent qu'à un pH très acide, non retrouvé dans l'espace extracellulaire.

1.4.1.b - De la dégradation de l'hémoglobine à la libération d'hémorphines

Les macrophages sont les principales cellules dégradant l'hémoglobine. Une étude réalisée au laboratoire a permis de mettre en évidence que les macrophages murins en présence de globine libéraient au moins une hémorphine, VVH7 (Dagouassat *et al.*, 1996). Le faible pH utilisé et l'inhibition par la pepstatine A, inhibiteur spécifique de la cathepsine D (Woessner, 1972), a permis de suggérer que la présence de VVH7 était caractéristique de la digestion de l'hémoglobine par la cathepsine D. VVH7 est un produit stable de dégradation puisqu'il n'est pas clivé en présence de cathepsine D (Fruitier *et al.*, 1998).

Par ailleurs, une étude du comportement de la cathepsine D vis-à-vis de l'hémoglobine et des hémorphines a mis en évidence des sites de coupure dans la séquence de l'hémoglobine bovine, préférentiellement au niveau des liaisons peptidiques impliquant des acides aminés hydrophobes tels que les résidus phénylalanyl, leucyl ou valyl, apportant des arguments supplémentaires en faveur de l'hypothèse selon laquelle la cathepsine D pourrait être l'enzyme principale impliquée dans la libération des hémorphines de type 7 (figure 5).

<u>Figure 5</u> : Sites de coupure de la cathepsine D sur la séquence de la chaîne β de l'hémoglobine bovine après quatre heures d'hydrolyse d'après (Fruitier, 1999) et (Fruitier *et al.*, 1999)

$_{NH2}$ ^{1}**MLTAEE ↓ KAAVTAF ↓ WGKVKVDECGGEALGRL ↓ L ↓ VVYPWTQRF FESF ↓ GDLSTADAV ↓ MNNPKVKAHGKKVLDSFSNGMKHLDDLKGTFAA LSELHCDK ↓ LVHDPENFKLLG ↓ NVLVVVL ↓ ARNFGKEFTPVLQADFQKV VAGVANALAHRYH**^{145} $_{COOH}$

La séquence en vert correspond à la séquence cryptique de LVVH7

L'hypothèse selon laquelle la dégradation de l'hémoglobine pourrait résulter de l'action ordonnée de différentes enzymes protéolytiques *in vivo* avait déjà été posée. En effet, à partir de la découverte de longs fragments issus de la chaîne β de l'hémoglobine localisés

dans l'hypophyse (Glamsta *et al.*, 1991) ou dans le plasma (Nyberg *et al.*, 1997a), il était suggéré que la libération du fragment β 1-41 puisse résulter de l'action d'une enzyme de type chymotrypsine, agissant au niveau de la liaison Phe_{41}-Phe_{42}. De même, ce type d'enzyme pourrait par la suite libérer LVVH7 en agissant au niveau de la liaison Leu_{31}-Leu_{32}. Enfin, des aminopeptidases ou carboxypeptidase pourraient ensuite agir pour libérer des fragments d'hémorphines plus courts. De plus, il a été mis en évidence qu'une endopeptidase de haut poids moléculaire libérait un peptide coronaro-constricteur correspondant aux fragments 33-37, 33-38, 32-39 ou 31-40 de la chaîne β de l'hémoglobine bovine (Barkhudaryan *et al.*, 1993). Ainsi, LVVH7 correspondant au fragment 31-40 de la chaîne β de l'hémoglobine contiendrait cette séquence « coronaro-constrictive ».

1.4.2 - Catabolisme des hémorphines

Beaucoup d'études ont été réalisées afin d'expliquer la libération des hémorphines. Dans la littérature, certains auteurs ont tenté d'expliciter le catabolisme de ces peptides. En effet, ces peptides seraient la cible d'exopeptidases telles que la cathepsine C, qui permettrait la libération de H7, et d'aminopeptidases dont le pH optimal serait compris entre 4 et 6 (Fruitier *et al.*, 1999). Une étude menée au laboratoire sur des séra de patientes atteintes de cancer du sein suggère que les peptides LVVH7 et VVH7, libérés par l'action de la cathepsine D sur l'hémoglobine, sont ensuite eux-mêmes clivés par la cathepsine B pour libérer les peptides LVVH5 et VVH5 (Cohen *et al.*, 2003b).

Comme nous l'avons précédemment vu, les hémorphines interviennent dans le SRA ; LVVH7 pourrait être dégradé par l'ECA (Zhao, 1994). De plus, Garreau et coll (1998) ont montré que LVVH7 pourrait être un inhibiteur de l'aminopeptidase N. Par la suite, deux études réalisées au laboratoire se sont intéressé au métabolisme rénal de LVVH7. Une étude cinétique avec la prolyl endopeptidase purifiée a montré que LVVH7 pourrait être un bon substrat avec une constante de spécificité proche de celle observé pour les peptides de type angiotensine (Fruitier-Arnaudin *et al.*, 2003). Il a également été démontré que l'H7 pouvait être libérée à partir de l'incubation de LVVH7 avec la fraction microsomale de reins de rat. Par la suite, ce produit peut être dégradé par la DPPIV présente dans cette fraction, puisque l'addition d'un inhibiteur de la DPPIV dans le milieu d'incubation entraîne une augmentation

de la quantité d'H7 libérée. Les hémorphines seraient donc des substrats endogènes de la DPPIV mais elles peuvent aussi agir comme des inhibiteurs compétitifs (Cohen *et al.*, 2004).

2 - Le diabète

C'est à Aretée de Cappadoce que l'on doit au 1er siècle avant J.C. la description initiale et la plus précise du diabète. « Le diabète est maladie remarquable mais heureusement plutôt rare. Elle consiste en une liquéfaction des chairs et des parties solides du corps dans l'urine. (…). Le développement de la maladie est progressif mais courte sera la vie de l'homme chez lequel la maladie est complètement développée. (…) Ils désespèrent de tout et la mort survient rapidement dans un tableau de sécheresse brûlante et de soif comme causée par un feu dévorant. »

L'implication des cellules de Langerhans dans la pathogénie du diabète sucré est mise en évidence par deux anatomopathologistes, L.WL Szobolev en Russie et E.L. Opie aux Etats-Unis. L'hormone fabriqué par les îlots du pancréas, soit l'insuline a été découverte en 1922. La découverte de l'insuline a permis aux diabétiques non seulement de survivre mais aussi de vivre aussi longtemps que leur contemporain. Cette longue durée de vie a pour conséquence de faire apparaître le risque majeur du diabète qui est l'existence de complications.

2.1 - Epidémiologie

Le diabète, sans être véritablement classé dans les maladies émergentes, est une maladie non contagieuse qui se développe de manière épidémique depuis quelques décennies, et dont la prévalence augmente fortement et rapidement dans tous les pays.

Dans le monde, 3,2 millions de décès sont attribuables au diabète chaque année. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, au moins 171 millions de personnes souffrent de diabète en 2008, et ce chiffre pourrait plus que doubler d'ici 2030. Cependant, cette maladie reste mal connue et de nombreux diabétiques ne savent même pas qu'ils ont cette pathologie puisque qu'elle passe souvent inaperçue au départ. Elle commence à être suspectée lorsque des complications, qui peuvent être gravissimes, apparaissent.

2.2 - Description de la maladie

2.2.1 - Les différents types de diabète

Le diabète se caractérise par un excès de glucose dans le sang. On distingue classiquement deux grands types de diabète : le diabète de type 1, autrefois appelé respectivement insulinodépendant et le diabète de type 2, non insulinodépendant[1]. Cette maladie est du à deux phénomènes diversement associés selon les types : l'insulinorésistance et le défaut de la sécrétion d'insuline.

Le type 1 représente environ 10% des personnes touchées par la maladie, il est également appelé diabète "maigre" ou diabète juvénile. Il résulte d'une incapacité du pancréas à sécréter une quantité suffisante d'insuline, hormone indispensable pour freiner l'augmentation de la glycémie, après le repas par exemple. Il s'agit d'une maladie "auto-immune", c'est-à-dire une maladie dans laquelle l'organisme retourne ses mécanismes de défense naturels contre son propre pancréas, ce qui conduit à la destruction progressive des cellules sécrétrices d'insuline, les cellules bêta des îlots de Langerhans. Le diabète de type 1 nécessite donc un apport régulier d'hormone extérieure.

Le type 2 survient souvent après la quarantaine chez des personnes en surpoids. Il résulte de l'association de deux anomalies interdépendantes : une insulino-résistance, c'est-à-dire une moindre sensibilité à l'insuline des cellules cible de l'organisme (tissu adipeux, foie et muscles) et une moindre sécrétion d'hormone en réponse au glucose (sucre). Les mécanismes qui conduisent au diabète de type 2 sont fort nombreux : une hyperglycémie chronique est constatée dans une soixantaine de pathologies différentes.

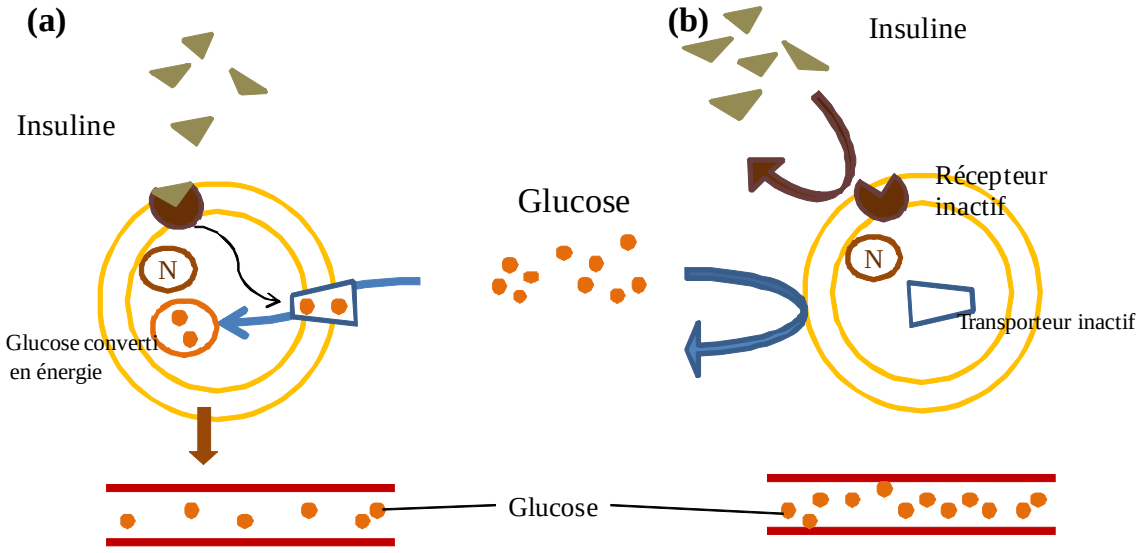
2.2.2 - L'insuline, hormone de régulation

Quel que soit le type de diabète, c'est l'absence ou le manque d'insuline qui est en cause. En effet, l'insuline est une hormone qui est sécrétée par les cellules ß du pancréas

[1] ALFEDIAM, www.alfediam.com

situées dans des zones appelées îlots de Langerhans qui a pour rôle de réguler la glycémie. L'insuline est une hormone constituée de 57 acides aminés, structurée en 2 chaînes. Quand le taux de glucose dans le sang est trop élevé, elle agit sur toutes les cellules de l'organisme (sauf les neurones) et entraîne l'absorption du glucose en activant toute une cascade de protéines (elle est dite hypoglycémiante).

<u>Figure 6</u> : Représentation schématique de la régulation de concentration en glucose dans le sang (a) cellule de personne non diabétique, (b) cellule de personne diabétique



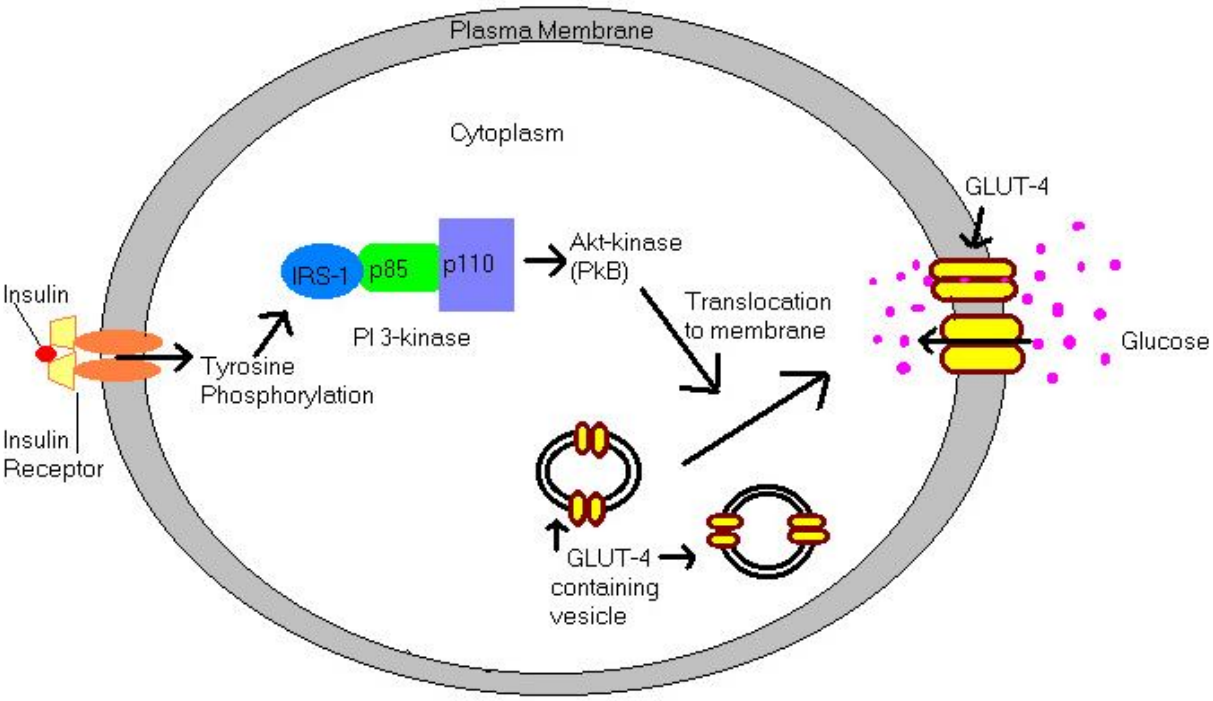
L'insuline entraîne aussi la transformation du glucose en glycogène en provoquant l'activation d'une enzyme, la glycogène synthétase, ainsi que l'accroissement des entrées de glucose dans les adipocytes du foie où il sera mis en réserve (notamment sous forme de triglycérides). Elle a aussi une action au niveau des myocytes (dégradation du glucose et stimulation de la glycogénogénèse) et des adipocytes (stimule la lipogénèse).

L'insuline se fixe sur un récepteur membranaire constitué de quatre peptides glycosylés reliés par des ponts disulfures. Ils forment une glycoprotéine de 400 kDa. On distingue deux paires de sous unités : deux sous unités transmembranaires β (80 kDa) ont une

activité enzymatique de protéine kinase, et deux sous unités α (120 kDa) sont à la surface de la membrane cellulaire et assurent la fixation de l'hormone grâce à leur partie glucidique[2].

Quand l'hormone se fixe sur ses récepteurs situés sur la membrane plasmique de la cellule, le récepteur de l'insuline d'autophosphoryle ce qui entraîne la phosphorylation des IRS (Insuline Receptor Substrates). Ceux-ci recrutent la PI3K à la membrane plasmique où elle catalyse la formation de 3'-phosphoinositides impliqués à leur tour dans l'activation d'une autre protéine, la PDK 1/2 qui va, elle, activer la PKB (protéine Kinase B) (cf : figure 7).

<u>Figure 7</u> : Mécanisme de translocation membranaire de GLUT4 par signalisation insulinique



Cette dernière protéine va entraîner, par un mécanisme encore mal compris à ce jour, le mouvement de vésicules intracellulaires vers la membrane plasmique. Ces vésicules sont

[2] « *Les Diabètes : comprendre pour traiter* » A. Grimaldi

équipées sur leur propre membrane de transporteur de glucose. Le récepteur GLUT4 représente plus de 90% de la totalité des transporteurs de glucose exprimés dans le muscle squelettique et cardiaque, et dans les tissus adipeux blanc et brun. Sa particularité réside dans le fait qu'il subit une redistribution intracellulaire en réponse à l'insuline ainsi qu'à d'autres stimuli (Bryant *et al.*, 2002); (Czech & Corvera, 1999). Avant d'être métabolisé, le glucose sanguin doit pouvoir franchir de nombreuses barrières pour finalement atteindre l'espace intracellulaire. Les transporteurs GLUT4 interviennent au niveau de son passage de la membrane au cytoplasme des myocytes et des adipocytes. Ce transfert aura lieu suite à une signalisation insulinique ou suite à la contraction musculaire. Par ailleurs, il a été proposé que GLUT4 jouerait un rôle dans le métabolisme glucidique dans les cellules nerveuses en cas d'hypoglycémie. Une étude a montré que GLUT4 était présent dans le système nerveux central et la corde spinal du rat. La stimulation des cellules permet l'utilisation du glucose par l'intermédiaire de ce transporteur ; la translocation de GLUT4 dans le système nerveux central pourrait elle aussi être régulé par l'insuline (El Messari *et al.*, 1998).

Implication de GLUT4 dans la résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline est définie comme étant la désensibilisation d'une ou plusieurs des réactions engendrées par l'activation du récepteur de l'insuline suite à la fixation de cette hormone. Naturellement, il s'en suit une diminution des repenses biologique normalement observées en réponse à l'insuline. La résistance à l'insuline est une anomalie présente chez la plupart des sujets obèses, hypertendus, diabétiques de type 2 ou présentant une intolérance au glucose. Cette caractéristique peut être également décelée chez des individus non diabétiques qui plus tard développent la maladie, de même que chez les enfants de parents hypertendus (Gans & Donker, 1991; Stern, 1995). Ce disfonctionnement induit une augmentation de la concentration plasmatique du glucose, ce qui amène les cellules β du pancréas à augmenter leur production d'insuline afin de ramener la glycémie à une valeur stable et de remédier à la réduction de l'efficacité gluco-régulatrice de l'hormone.

La production excessive d'insuline qui accompagne l'insulinorésistance aboutit à long terme à une désensibilisation des récepteurs à insuline et conduit à l'épuisement des cellules β du pancréas. . La stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline est diminuée dans le muscle du diabétique de type 2, en raison d'une inhibition de la voie de signalisation de l'insuline (phosphorylation d'IRS sur des sérines). Par contre la stimulation du transport de

glucose en réponse à l'exercice physique est normale dans le muscle du diabétique de type 2, suggérant un mécanisme de signalisation différent (Wheatcroft *et al.*, 2003).

2.3 - Complications

Le diabète entraîne des complications importantes mais on peut en souligner cinq plus fréquentes [3]:

- la microangiopathie recouvrant l'ensemble des lésions constatées sur les petits vaisseaux d'un diamètre inférieur à 30µm,
- la macroangiopathie concernant les lésions des grosses et moyennes artères,
- la rétinopathie,
- la néphropathie,
- la neuropathie.

Le DCCT[4] est une étude multi-centrique incluant 1441 patients diabétiques de type 1 âgés de 13 à 39 ans sur 29 centres aux Etats Unis et au Canada. L'Etude s'est déroulée sur 6,5 ans en moyenne de 1983 à 1993, et comparait l'effet d'un traitement intensif par rapport à un conventionnel au sein de deux populations de patients diabétiques insulino-dépendants indemnes ou non de rétinopathie diabétique, sur la survenue de complications microangiopathiques. Nous ferons appel à des résultats de cette étude dans l'explication des différentes complications.

2.3.1- Les mécanismes de la microangiopathie

La microangiopathie désigne, d'une manière générale, l'ensemble des lésions artérielles allant de l'altération discrète de l'intima à l'obstruction complète de certains

[3] «*Diabète et maladies métaboliques* » L. Perlemuter, édition Masson

[4] ALFEDIAM, www.alfediam.com

vaisseaux. Chez le sujet âgé, elle se traduit principalement par une athérosclérose accélérée.

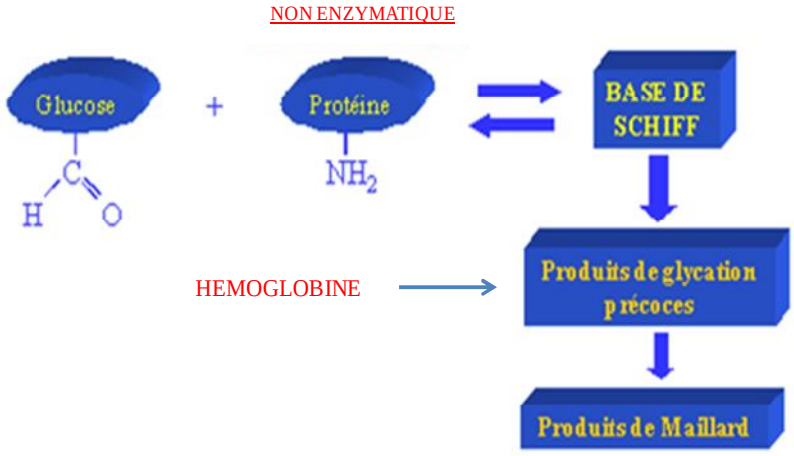
Ces lésions sont la conséquence de quatre mécanismes essentiels :

- la glycation,
- le stress oxydatif,
- la production de facteurs de prolifération tissulaire,
- les voies parallèles du métabolisme du glucose.

L'hyperglycémie est d'assez loin le facteur le plus important du développement de la microangiopathie. Les lésions sont d'autant plus sévères que le diabète est plus ancien et que les glycémies sont élevées. L'hyperglycémie agit essentiellement par la glycation non enzymatique qu'elle provoque. Ce processus se déroule selon trois étapes :

- formation d'une base de Schiff par combinaison de la fonction aldéhyde du glucose avec les résidus aminés de la protéine, principalement la lysine et la fonction amine N-terminale, le taux de formation étant égal au taux de dissociation,
- réarrangement d'Amadori, atteignant un équilibre après quelques semaines, la constante de dissociation ne représentant que 1,6 % de la constante de formation (réaction quasi-irréversible) ; ces deux étapes aboutissent aux produits de glycation dits précoces et caractérisent les protéines de demi-vie brèves ou intermédiaires. (exemple de l'hémoglobine),
- accumulation lente et irréversible, par réarrangements, transferts d'hydrogène et formation d'intermédiaires très réactifs, de produits terminaux de glycation ou produits de Maillard, caractérisant les protéines structurales de durée de vie prolongée, et dont les traits biochimiques principaux sont leur pigmentation brune, leur fluorescence, et leur implication dans la formation de liaisons croisées entre protéines.

Figure 8: Mécanisme de glycation des protéines



Les produits finaux de glycation (AGE ou Advanced Glycation End-products) sont particulièrement nocifs pour les microvaisseaux. En effet, la glycation est ainsi susceptible de modifier les propriétés de différentes enzymes et protéines en fonction de leur demi-vie (augmentation de l'affinité de l'hémoglobine glyquée pour l'oxygène ce qui en théorie favorise l'hypoxie tissulaire mais dont les effets restent minimes in vivo).

En revanche, les protéines à durée de vie longue (collagène, myéline) vont subir des réactions complexes, notamment la réaction de Maillard. Leur accumulation tient de l'irréversibilité de la réaction. Elles seraient responsables :

- de modifications structurales au niveau des membranes basales qui perdent leur protéoglycanes suite au masquage de leurs sites de liaison (en particulier l'héparane sulfate) et dont les pores sont élargis. L'assemblage plurimoléculaire de la membrane basale est perturbé par la glycation, fragilisant cette dernière et réduisant l'adhésion des cellules endothéliales. L'altération de l'interface endothélium-membrane basale s'accompagne d'une baisse des charges négatives par perte de protéoglycanes entraînant une hyperperméabilité vasculaire,

- d'une fixation anormale de l'albumine, des globulines et des lipoprotéines dans la matrice extra-cellulaire de la paroi vasculaire au niveau de groupements réactifs,

- d'une réduction de la susceptibilité à la protéolyse du collagène et de la membrane basale,

- d'une production par les macrophages de cytokines suite à la liaison de produits terminaux de glycation sur leurs récepteurs macrophagiques, entraînant notamment une synthèse accrue du collagène et une prolifération des cellules endothéliales et musculaires lisses.

En effet, le métabolisme des protéines de la matrice extra-cellulaire fait intervenir les macrophages, au niveau desquels un récepteur spécifique des produits terminaux de glycation a été récemment mis en évidence. Ce récepteur est inhibé par l'insuline et activé par le TNF (tumor necrosis factor). La stimulation de ce récepteur induit la sécrétion de cytokines (TNF et IL-1) et de facteurs de croissance. Cette sécrétion a pour but le recrutement de cellules mésenchymateuses et endothéliales qui vont sécréter des collagénases, protéases et facteurs de croissance pour le remodelage de la matrice extra-cellulaire. La liaison sur des récepteurs spécifiques de produits terminaux de glycation va entraîner la prolifération de cellules mésangiales, endothéliales et fibres musculaires lisses.

Outre les effets délétères sur la structure des microvaisseaux, les AGE entraînent des perturbations fonctionnelles :

- diminution de la capacité de libération de l'oxygène par l'hémoglobine,

- augmentation de la capacité de liaison et de la stabilité thermique du collagène,

- apparition de propriétés immunogènes pour le collagène, l'albumine et les lipoprotéines,

- épaississement de l'intima.

2.3.2 - La formation de plaques d'athérome

Le diabète accélère notamment la formation des plaques d'athérome (dépôt de cholestérol dans les parois artérielles), augmentant non seulement les risques d'infarctus du myocarde, mais aussi d'hypertension artérielle, d'accident vasculaire cérébral et d'artérite des membres inférieurs.

Les maladies cardiovasculaires, c'est-à-dire des affections qui touchent le cœur et les vaisseaux sanguins, représentent la première cause de mortalité en France, avec près de 180000 décès par an. Le plus souvent, la phase ultime d'une maladie cardiovasculaire se manifeste soit par une crise cardiaque soit par un accident vasculaire cérébral. Ces accidents sont souvent associés à un thrombus, un caillot de sang qui bouche une artère principale. Si le thrombus bloque une des artères coronaires qui acheminent le sang au muscle cardiaque, une crise cardiaque se produit. Un thrombus qui cause une crise cardiaque peut se former dans l'artère coronaire même ou se développer ailleurs dans le système circulatoire et atteindre une artère coronaire par voie sanguine. Un tel caillot mobile est appelé embole. Un embole circule jusqu'à ce qu'il reste bloqué dans une artère trop petite pour permettre son passage. Le tissu musculaire cardiaque en aval de l'obstruction peut mourir. Si la lésion se trouve à un endroit où elle interrompt la conduction des influx électriques dans le muscle cardiaque, le cœur peut se mettre à battre de façon irrégulière voire s'arrêter.

De la même façon, de nombreux accidents vasculaires cérébraux sont associés à un thrombus ou à un embole qui bloque une artère du cerveau. Le tissu cérébral alimenté par cette artère meurt. Les effets de l'accident vasculaire cérébral et les chances de survie de la personne dépendent de l'ampleur et du siège de la lésion. Malgré le caractère subit d'une crise cardiaque ou d'un accident vasculaire cérébral, le fait est que les artères de la plupart des victimes se détériorent d'abord graduellement à cause d'une maladie chronique appelée athérosclérose. L'athérosclérose augmente considérablement le risque d'occlusion artérielle par un caillot sanguin. Au cours du développement de cette maladie cardiovasculaire, des dépôts lipidiques appelés athéromes se forment sur la tunique interne des artères et rétrécissent le calibre des vaisseaux. Un athérome se constitue lorsque des lipides s'introduisent dans une matrice anormalement épaisse de muscle lisse. Dans certains cas, les athéromes durcissent à cause de dépôts de calcium, ce qui provoque une forme d'athérosclérose appelée artériosclérose ou plus communément durcissement des artères. Un

embole a plus de chances de rester bloqué dans un vaisseau rétréci par des athéromes. En outre, les athéromes favorisent la formation de thrombus. Dans une artère saine, la tunique est lisse. L'artère touchée par l'athérosclérose possède une tunique rugueuse qui semble favoriser l'adhésion des plaquettes, ce qui déclenche le processus de coagulation. À mesure que l'athérosclérose évolue, les athéromes obstruent de plus en plus les artères, et la menace d'une crise cardiaque ou d'un accident vasculaire cérébral s'accroît. Cependant, de nombreuses personnes atteintes d'athérosclérose ignorent complètement leur maladie jusqu'à ce qu'une crise survienne.

Des chercheurs américains ont découvert comment le diabète, en conduisant l'inflammation et en ralentissant le flux sanguin, accélère significativement l'athérosclérose (Woo *et al.*, 2008). Jusqu'alors, il semblait que l'athérosclérose se développait quand trop de cholestérol bouchait les artères avec des dépôts gras appelés plaques. Quand les vaisseaux sanguins devenaient complètement bloqués, les crises cardiaques et les attaques survenaient. Aujourd'hui, la plupart reconnaissent que la réaction du système immunitaire de l'organisme au développement du gras crée un risque de crise cardiaque. Des cellules immunisées voyageant avec le sang prennent les dépôts adipeux pour des intrus, apparentés aux bactéries, se dirigent vers eux et l'attaquent. Cela cause une inflammation qui produit des plaques probablement pour gonfler, rompre et couper le flux sanguin. Les cellules des patients diabétiques ne peuvent pas assimiler efficacement le sucre, provoquant une accumulation dans le sang, l'inflammation athérosclérose augmente.

2.3.3 - Les néphropathies

L'ensemble des enquêtes épidémiologiques a montré que l'hypertension artérielle était plus fréquente chez les diabétiques, insulinodépendants ou non, que chez les non diabétiques. Même si les estimations sont très variables, le problème est donc d'une ampleur considérable puisque dans ces populations de diabétiques d'âge moyen, l'hypertension artérielle concerne de 1 sujet sur 8 à 2 sujets sur 3. Les facteurs rendant compte du nombre excessif d'hypertendus sont multiples chez les diabétiques de type 2. En revanche, chez les patients atteint du type 1, la prévalence excessive de l'hypertension est expliquée entièrement et seulement par la proportion importante de néphropathie diabétique chez ces malades

(Norgaard *et al.*, 1990). L'hypertension artérielle et le diabète sont les causes principales de l'insuffisance rénale terminale. La néphropathie diabétique représente la plus grave des complications à long terme du diabète. Environ 15 à 30% des sujets diabétiques développent une néphropathie diabétique après 10 à 15 ans de diabète. D'après les données de l'US Renal Data System, 57 % des nouveaux cas sont attribuables au diabète et à l'hypertension artérielle. Dans une étude de patients atteints d'insuffisance rénale, Perneger et coll (1994) ont calculé que le risque était augmenté de manière majeure par la présence d'un diabète : risque relatif de 33,7 pour le diabète insulinodépendant et de 7 pour le diabète non insulinodépendant.

Chez les patients diabétiques et hypertendus, un traitement antihypertenseur diminue le risque d'apparition d'une néphropathie et de progression d'une néphropathie existante. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) paraissent ici les plus efficaces. Grâce à leur effet de constriction des vaisseaux glomérulaires, ils diminuent au mieux la pression intraglomérulaire et assurent de ce fait une réduction efficace de la protéinurie. Il apparaît également que l'effet rénoprotecteur des IECA est en partie indépendant de leur effet antihypertenseur ; c'est ainsi que les IECA sont également recommandés chez les patients normotendus atteints d'une néphropathie diabétique. Les effets favorables des IECA ont été observés tant chez les patients atteints d'un diabète de type 1 que chez ceux atteints d'un diabète de type 2. Des effets favorables sur les reins ont également été observés avec les sartans, irbésartan et losartan, chez des patients avec un diabète de type 2 (la plupart hypertendus) (Brenner *et al.*, 2000).

2.3.4 - Les rétinopathies

Complication la plus spécifique du diabète, elle est la première cause de cécité en France après 60 ans encore aujourd'hui. Elle répond aux mécanismes généraux de la microangiopathie diabétique. Elle se manifeste par une baisse de l'acuité visuelle avec des douleurs oculaires associées. L'évaluation du pronostic est difficile et il n'existe pas de méthode permettant de connaître l'évolution vers cette pathologie. Les IEC sont, à l'heure actuelle, capables de prévenir partiellement la rétinopathie diabétique. Dans tous les cas, il faut tenir compte de la glycémie et de l'hypertension artérielle qui sont souvent associé à cette complication.

L'étude du DCCT n'a pas montré de valeur seuil d'HbA1c permettant un risque zéro d'apparition de rétinopathie[5].

2.3.5 - Les neuropathies

La neuropathie diabétique est remarquable pour trois raisons :

- sa fréquence : 7,5% des diabétiques découverts ont une neuropathie symptomatique ; la prévalence augmente avec la durée du diabète et atteint près de 50% au bout de vingt-cinq ans.

- son caractère invalidant

- les progrès effectués dans sa connaissance physiopathologique, mise en évidence de l'importance des voies métaboliques accessibles au glucose et des glycations non enzymatiques.

Le seul traitement préventif est le contrôle des glycémies ainsi que l'insulinothérapie intensive, avec maintien de l'HbA1c au-dessous de 6,5%. Une fois les neuropathies déclarées, différents traitements peuvent être mis en place en fonction des symptômes :

- Traitement de la douleur

- Traitements spécifiques par vitaminothérapie (Vitamine du groupe B), inhibiteurs de l'aldose réductase, inhibiteurs des radicaux libres.

L'étude DCCT a montré qu'en prévention primaire, le risque de neuropathie est diminué de 69% ($p=0,006$) dans le groupe intensif, et de 57% ($p<0,001$) en prévention secondaire.

[5] The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. *Diabetes. 1995* **44**(8), 968-83.

2.4 - Dépistage du diabète

Au vu des diverses complications que l'augmentation de la glycémie implique, les recherche se sont accentuées ces dernières années à trouver des moyens de dépister précocement cette pathologie.

2.4.1 - Mesure de la glycémie

Jusqu'en 1998, le diagnostic de diabète reposait sur un examen appelé hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) qui consistait à mesurer la glycémie à jeun, à faire avaler 75 grammes de glucose dans 250 à 300 ml d'eau, puis à mesurer la glycémie toutes les trente minutes pendant trois heures. Cependant, si la glycémie à jeun était déjà élevée, l'HGPO n'était pas nécessaire car le diabète pouvait alors être affirmé sur le simple résultat de la glycémie à jeun.

Schématiquement, était considéré comme diabétique tout sujet présentant à deux reprises :

- une glycémie à jeun supérieure à 1,40 g/l (7,70 mmol/l),

- une glycémie supérieure à 2 g/l (11 mmol/l) deux heures après prise orale de 75 g de glucose.

Ces critères, datant de 1980, étaient basés sur le fait que :

- la rétinopathie diabétique est une atteinte spécifique du diabète (c'est-à-dire qu'elle ne peut être observée qu'en cas de diabète) et que cette atteinte est la plus facile à affirmer précocement,

- les personnes ayant une rétinopathie diabétique avaient toutes une glycémie supérieure à 2 g/l deux heures après prise orale de 75 g de glucose.

Cependant, comme un grand nombre des personnes ayant une glycémie supérieure à 2 g/l deux heures après prise orale de 75 g de glucose, avaient également une glycémie à jeun supérieure à 1,40 g/l, on pouvait se dispenser de l'HGPO si la glycémie à jeun était constatée supérieure à 1,40 g/l. Les critères diagnostiques du diabète ont été modifiés en 1998. Ces nouveaux critères ont été proposés en juin 1997 par l'American Diabetic Association (ADA). Ils ont été adoptés en 1998 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), puis en France par

l'Association Française pour l'Etude du Diabète et des Maladies métaboliques (ALFEDIAM), et ont été retenus par l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES) en 1999.

Les nouveaux critères sont les suivants :

- est considéré comme diabétique, un sujet présentant à deux reprises : - une glycémie à jeun (après au moins 8 heures de jeûne) supérieure ou égale à 1,26 g/l (7,0 mmol/l) - ou une glycémie supérieure à 2 g/l (11 mmol/l) deux heures après une prise orale de 75 g de glucose. Ce dosage doit être réalisé à deux reprises.

- est considéré comme normal, un sujet ayant une glycémie à jeun inférieure à 1,10 g/l (6,1 mmol/l).

- sont considérés comme ayant une glycorégulation anormale : 1) les sujets ayant une hyperglycémie modérée à jeun : glycémie à jeun supérieure ou égale à 1,10 g/l (6,1 mmol/l) et inférieure à 1,26 g/l (7,0 mmol/l) 2) les sujets ayant une intolérance au glucose : glycémie à jeun inférieure à 1,26 g/l (7,0 mmol/l) et glycémie supérieure ou égale à 1,40 g/l (7,6 mmol/l) et inférieure à 2 g/l (11,1 mmol/l) deux heures après une prise orale de 75 g de glucose.

2.4.2 - L'hémoglobine glyquée

Les premiers travaux montrant un lien entre l'augmentation de l'hémoglobine glyquée et le diabète ont été publiés dans les années 70 (Kilpatrick ES., 2000). Le dosage périodique de l'hémoglobine glyquée, ou HbA1c, est une analyse biologique qui fait partie des examens de suivi d'un sujet diabétique sous traitement. Ce n'est en aucun cas un test de diagnostic de diabète utilisé en première intention, le diagnostic reposant sur la mesure la glycémie à jeun à plusieurs reprises (au moins à 8 heures d'un repas).

L'hémoglobine glyquée HbA1c est une fraction de l'hémoglobine totale circulante, issue de la glycation de l'hémoglobine HbA (Svendsen PA, 1980 et Bunn HF, 1975). Cette synthèse se fait en deux étapes. La première, rapide, réversible et dépendante de la concentration plasmatique de glucose, conduit à un composé labile appelé Hb pré-A1c. La

seconde étape, lente, irréversible, conduit par réarrangement d'Amadori à l'hémoglobine HbA1c. Cette réaction a lieu à l'intérieur des globules rouges tout au long de leur vie. La formation de l'HbA_{1c} résulte de la liaison du glucose sur la valine en position N-terminale de la chaîne β de l'hémoglobine A (Bry L, 2001). L'HbA1c est donc un paramètre de la surveillance biologique des patients diabétiques (Gebhart SS, 1991). La glycation non enzymatique des protéines est un processus physiologique lent qui affecte toutes les protéines de l'organisme et dont l'intensité augmente avec la glycémie. Puisque la durée de vie des hématies est d'environ 120 jours, la concentration d'hémoglobine glyquée renseigne sur la qualité de l'équilibre glycémique des 8 à 12 semaines qui précèdent le dosage. Il s'agit donc d'un index rétrospectif et cumulatif à long terme, utilisé dans la surveillance de routine du diabète sucré. Permettant un meilleur équilibre du diabète, qui constitue l'aspect essentiel du traitement, ce marqueur a un rôle essentiel dans la prévention des complications de la maladie. Son dosage est recommandé 4 fois par an chez les sujets diabétiques.

Il existe une corrélation entre les glycémies moyennes et la valeur de HbA1c.

- le taux normal est de 4 à 6%,
- toute variation de 1 % de l'HbA1c correspond à une variation de 0,35 g/L de glycémie moyenne.

HbA1c (%)	**Glycémie moyenne (mg/dl)**
6	126 (100-152)
7	154 (123-185)
8	183 (147-217)
9	212 (170-249)
10	240 (193-282)
11	269 (217-314)
12	298 (240-347)

Extrait de Nathan et al, Diabetes Care, 2008, 31

Il existe une variation possible entre la glycémie moyenne et la valeur de l'HbA1c d'environ 15%

Selon l'Afsaaps en 2006, l'objectif du traitement d'un patient diabétique est la normalisation glycémique qui est définie par une hémoglobine glyquée (HbA1c) inférieure à 6,5 %.

La chromatographie liquide haute performance (CLHP), en permettant la séparation spécifique et le dosage quantitatif de l'hémoglobine A1c (Eckerbom S, 1994), est considérée comme la technique de référence du dosage de HbA1c (Gillery P, 1995). La première étude sur l'HbA1c a été menée par une équipe américaine (Santiago JV, 1978) et a comparé le taux d'HbA1c avec le test de tolérance au glucose. La relation entre des hautes concentrations en glucose plasmatique et une augmentation de l'HbA1c a pu être mis en évidence. Svendsen et coll (1981) ont relié ces deux paramètres sur une cohorte de patients diabétiques plus importante afin d'évaluer si l'HbA1c pouvait être un critère de diagnostic. Les résultats ont montré que l'HbA1c ne permettait pas de diagnostiquer si le patient est atteint de diabète puisque seule une corrélation entre l'HbA1c et une diminution de la tolérance au glucose a été démontrée. Les recherches menées ensuite sur l'HbA1c ont montré que ce paramètre ne pouvait pas être retenu comme outil diagnostic et ce pour plusieurs raisons :

- les méthodes de dosages de l'HbA1c n'étaient pas standardisées et toutes les méthodes de dosages n'avaient pas la même fiabilité lorsque les études révisant les critères de diabète ont été menées (la situation s'est améliorée depuis mais, contrairement au dosage de la glycémie, il n'y toujours pas une méthode de dosage universellement utilisée dans tous les laboratoires).

- les limites de la normale des différentes méthodes de dosages de l'HbA1c ne sont pas identiques, ce qui rend difficile l'énonciation d'un seuil universel, contrairement à ce que permet la glycémie à jeun.

- lorsqu'il y a un diabète avéré, la glycémie à jeun est élevée et souvent variable d'un jour à l'autre, alors qu'au début du diabète la glycémie à jeun n'est pas non plus strictement identique d'un jour à l'autre mais est nettement moins variable.

Par conséquent, l'HbA1c n'est pas apparue plus intéressante que la glycémie à jeun pour le diagnostic de diabète. L'outil « glycémie à jeun» comprend des imperfections mais reste à ce jour la méthode la plus fiable et la plus précoce pour détecter un diabète.

2.5 - Les traitements

Le diabète est une maladie difficile à traiter car il faut non seulement traiter le déficit de sécrétion en insuline mais aussi les effets secondaires principalement liés à la présence de glucose dans le sang. Nous ne ferons pas une liste exhaustive de tous les traitements, nous citerons les derniers mis en place et ceux qui sont recommandés par l'Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé et l'HAS (Haute Autorité de Santé).

2.5.1 - Chez les diabétiques de type 1

- le traitement par insuline

L'insuline est le seul médicament du diabète insulinodépendant. Sulfamides et biguanides n'ont aucun intérêt en dehors de la période initiale de rémission éventuelle. Depuis une dizaine d'années, les techniques de fabrication et de purification de l'insuline ont été révolutionnées. Actuellement le moyen le plus simple est le stylo à insuline. Ainsi, il permet une injection très facile et pratiquement indolore. Le dosage est uniformisé : 100 unités par ml. A l'avenir, l'objectif est d'imiter au mieux la sécrétion physiologique d'insuline, à savoir une diffusion massive au moment des repas et en dehors des repas. Actuellement, un nombre d'injections quotidiennes élevé permet un équilibre glycémique fin mais impose de fortes contraintes aux patients.

L'insulinothérapie par pompe

C'est le traitement imitant le mieux la sécrétion physiologique d'insuline. L'insuline est perfusée de manière continue à l'aide d'un pousse-seringue miniaturisé portable à piles. Le débit de base est modifiable et des suppléments de dose sont prévus au moment des repas. Développé aux alentours des années 1980, ce traitement par pompe s'est imposé depuis 1985. L'infusion d'insuline se fait par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale.

Les indications médicales de la pompe à insuline sont :

- Le diabète très instable ;
- Les femmes désireuses de débuter une grossesse ;
- Les patients souffrant de complications oculaires ou rénales graves.

- **L'alimentation**

Actuellement, on ne parle plus de "régime diabétique" mais d'alimentation adaptée aux diabétiques. En effet, le diabétique peut, à quelques détails près, s'alimenter normalement, à condition que cette alimentation soit équilibrée.

Les objectifs recherchés sont au nombre de trois :

- Assurer un équilibre nutritionnel correct ;
- Eviter des variations trop importantes de la glycémie : il faut " mesurer " les glucides et adapter sa dose d'insuline rapide à chaque repas ;
- Corriger les erreurs diététiques accélérant l'athérosclérose.

2.5.2 - Chez les diabétiques de type 2

- Prise en charge non médicamenteuse

- Diététique et hygiène de vie

La lutte active contre la sédentarité ainsi que la planification alimentaire représentent des interventions irremplaçables à toutes les étapes de la prise en charge du diabète de type 2.

- Education thérapeutique

L'éducation thérapeutique est un volet fondamental de la prise en charge de tout patient diabétique. Elle doit être mise en œuvre dès la découverte du diabète par des professionnels médecins ou paramédicaux formés à cette activité.

- Traitement médicamenteux

- La metformine

Substance est capable de normaliser ou de réduire l'hyperglycémie des diabétiques de type 2 indépendamment du niveau pondéral, de l'âge et de l'ancienneté du diabète (diminution de l' HbA1c de l'ordre de 1% à 1.5%).

C'est le seul antidiabétique oral à avoir fait la preuve, en monothérapie, d'une réduction de la mortalité cardiovasculaire dans le diabète de type 2.

- Les insulinosécréteurs

i) les sulfamides hypoglycémiants

ii) les glinides

- Les glitazones (thiazolidinediones)

Médicament qui diminue l'insulinorésistance musculaire et hépatique. Elles ont fait la preuve de leur effet hypoglycémiant en monothérapie (diminution de l''HbA1c de l'ordre de 1%), ainsi qu'en bithérapie, en association à la metformine ou aux sulfamides hypoglycémiants.

- Les inhibiteurs des alphaglucosidases intestinales.

Ils ralentissent l'absorption intestinale des glucides alimentaires complexes. Leur pouvoir hypoglycémiant est de l'ordre de -0.5 à -1% d'HbA1c. Ils sont principalement actifs sur la glycémie post-prandiale. Leurs effets secondaires sont digestifs et fréquents, sans gravité.

- L'insulinothérapie du diabète de type 2

L'insuline est capable de réduire l'hyperglycémie, voire de normaliser les glycémies des diabétiques de type 2 avec ou sans surpoids. L'insulinothérapie a été montrée capable de diminuer au long cours la survenue des complications microangiopathiques oculaires et rénales chez les diabétiques de type 2.

2.6 - Données préliminaires entre les hémorphines de type 7 et le diabète

Le diabète est une maladie complexe à dépister. Les complications de la maladie sont généralement déjà présentes au moment du diagnostic. Les méthodes de dépistage actuelles sont basées sur la mesure du glucose dans le sang. Lorsque le glucose est présent en concentration importante dans le sang, les conséquences physiologiques de l'augmentation du

glucose plasmatique sont déjà présentes. À l'heure actuelle, les études scientifiques s'orientent sur la recherche d'un marqueur précoce de la maladie qui permettrait de détecter le début de la maladie avant le début des complications.

Grâce à un financement obtenu dans le cadre d'une allocation de recherche clinique (Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille), notre laboratoire a travaillé sur la concentration des hémorphines de type 7 dans le plasma des patients diabétiques. Le taux de ces peptides était significativement diminué dans le plasma des patients diabétiques. Les interférences connues entre les hémorphines et le système rénine-angiotensine suggèrent que cette baisse des hémorphines circulantes pourrait entraîner la levée du frein physiologique qu'elles appliquent sur le système rénine-angiotensine et participer au développement de l'hypertension artérielle si fréquent au cours du diabète. Des résultats préliminaires montrent que, en effet, les diabétiques de type 1 qui ont la baisse la plus accusée des hémorphines 7 ont une tendance à élever leur pression artérielle diastolique pendant la journée. Le rôle des fluctuations tensionnelles dans la genèse des complications microvasculaires (néphropathie et rétinopathie) et macrovasculaires du diabète suggèrent que la baisse des hémorphines 7 pourrait être corrélée à l'importance de ces complications. L'objectif du projet est d'expliciter les raisons biochimiques et physiopathologiques de cette diminution des hémorphines 7 liée au diabète et d'apprécier les conséquences à court et à moyen termes sur l'équilibre tensionnel et le développement de la néphropathie.

Suite à une étude sur la possibilité que les hémorphines sériques soient un biomarqueur du cancer du sein (Cohen *et al.*, 2003b), il s'est avéré que la concentration en hémorphines de type 7 était diminuée chez des patientes diabétiques. A partir de ces résultats, des études au laboratoire ont été menées sur le précurseur de ces hémorphines, l'hémoglobine. Il semblait important de regarder l'impact de la modification du substrat, soit la glycation sur la libération des hémorphines de type 7 dans un contexte pathologique particulier.

Les résultats obtenus sont en faveur d'une diminution constante de la concentration sérique des hémorphines de type 7 et d'un impact de la modification de l'hémoglobine sur la production d'hémorphines (Fruiter-Arnaudin *et al.*, 2003):

1) un taux plasmatique d'hémorphine de type 7 significativement abaissé chez des sujets diabétiques par rapport à des sujets sains. Cette étude a été réalisée sur 31 patients

diabétiques à 25 sujets contrôles appariés sur l'âge, les résultats ont montré que les patients diabétiques ont des taux plasmatiques d'hémorphines de type 7 significativement abaissés par rapport aux sujets contrôles (0,8 +/- 0,94 µmol/l vs 4,09 +/- 1,05 µmol/l, p< 0,0001),

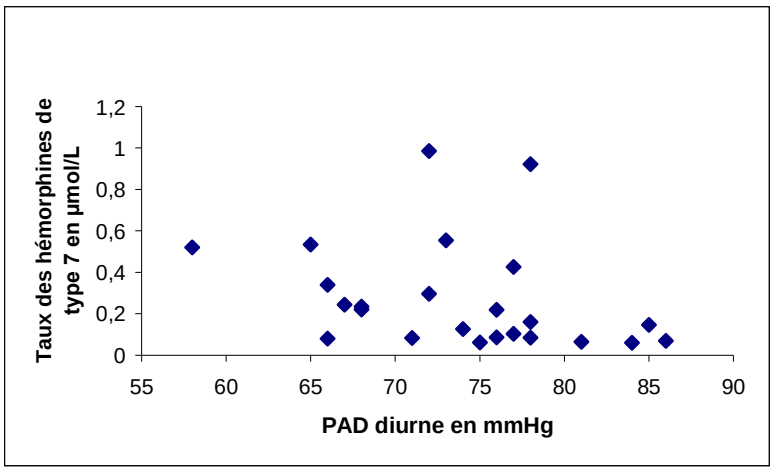
2) la mise en évidence de la libération de LVV-hémorphine 7 et de VV-hémorphine 7 par la cathepsine D à partir d'hémoglobine glyquée *in vitro*,

3) la diminution de cette libération de 3 à 5 fois à partir d'hémoglobine glyquée *in vitro*.

D'autre part, des études menés en parallèle à Marseille (Bégu, 2005)ont montré qu'il n'existait pas de corrélation entre le pourcentage d'HbA1c et le taux d'hémorphines 7 venant ainsi infirmer l'hypothèse initiale que la baisse des hémorphines circulantes était due principalement à la glycation des chaînes de globine et au masquage des sites de clivage reconnus par les cathepsines.

De plus, 24 patients diabétiques de type 1 normo-éliminateurs d'albumine indemne de tout médicament à activité hypotensive ont été soumis à un enregistrement nycthéméral de la tension dans les conditions ambulatoires (MAPA). Chez ces patients, il existe une corrélation négative entre le taux d'hémorphines d'une part et la pression artérielle moyenne diurne d'autres parts (r=0,449, p<0,028) (figure 9).

<u>Figure 9 :</u> Corrélation entre la concentration en hémorphines de type 7 et la pression artérielle diurne.



Il semble bien que dans cette forme assez pure conduisant à l'HTA et à la néphropathie diabétique qu'est le type 1, la baisse des hémorphines 7 dans le plasma est bien associée à une augmentation de la Ta diastolique. Ce marqueur peut avoir une signification pathologique certaine quand on sait que la tension artérielle diastolique est un puissant marqueur de risque coronarien dans l'étude Framminghам (Franklin *et al.*, 2001). Ces données ont été réunies dans un travail de thèse de médecine (Bégu, 2005). Ces données préliminaires purement phénoménologiques vont dans le sens d'un rôle pathogène de l'anomalie participant à l'histoire naturelle des complications micro- et macrovasculaires du diabète. Leur caractère novateur et prometteur justifie maintenant un travail d'approfondissement pour améliorer la compréhension des mécanismes et permettre une éventuelle utilisation clinique de ces marqueurs, si ce n'est dans un futur éloigné la possibilité d'intervenir sur eux pour en limiter la nocivité.

A partir de ces premières conclusions, un Projet Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) a été mis en place entre le CHU La Timone de Marseille et le Laboratoire LIENSs de l'Université de La Rochelle en 2006.

Les objectifs de ce PHRC sont de déterminer la cause de cette baisse sérique des hémorphines de type 7 par une approche à la fois clinique et biochimique.

3 - Les cancers broncho-pulmonaires

Le mot cancer désigne en fait un groupe de maladies très différentes les unes des autres. Une première façon de les classer consiste à désigner l'endroit du corps où la tumeur se forme : le poumon, le sein ou la peau, par exemple. Une autre manière fait appel aux différents types de tissu qui constituent le corps humain. Un tissu, le tissu musculaire ou osseux par exemple, est formé d'un ensemble de cellules partageant des caractéristiques communes et assemblées pour réaliser une fonction particulière : on en compte près de 200 dans notre organisme. Lorsque la maladie naît dans un épithélium, c'est-à-dire un tissu recouvrant les surfaces internes (tissu de revêtement des organes) ou externes (épiderme par exemple), on l'appelle un carcinome. Les formes les plus communes de cancer relèvent du groupe des carcinomes (sein, prostate, poumon, côlon…). Lorsque les cellules cancéreuses apparaissent dans un tissu « de support » (les os, par exemple), la maladie est un sarcome. Enfin, lorsque le cancer affecte le sang ou les organes lymphoïdes dans lesquels certaines cellules du sang acquièrent leur fonction, il est qualifié d' « hématopoïétique ». Dans le cas du cancer du poumon, on parlera donc de carcinomes.

3.1 - Epidémiologie

Les cancers du poumon sont les plus répandus dans le monde avec 900 000 nouveaux cas par an chez l'homme et 330 000 chez la femme. Le cancer du poumon est l'une des formes les plus fréquentes de cancer. Plus de 4 cancers du poumon sur 5 sont liés au tabac. Les hommes sont actuellement plus touchés que les femmes. Néanmoins, cette tendance tend à disparaître compte tenu de l'augmentation du tabagisme féminin. Le cancer du poumon représente la première cause de mortalité chez l'homme. Il est la troisième cause de mortalité chez la femme après celui du sein et du cancer colorectal. La fréquence de ce cancer augmente chez les femmes, elle a été multipliée par 4 en 10 ans chez les femmes de 35 à 45 ans : augmentation de 5,8 %par an, avec 7000 cas par an. Le diagnostic s'avère souvent long, des premiers symptômes à la prescription d'un scanner ou d'une fibroscopie des bronches,

laissant à la maladie le temps de se développer. Le taux moyen de survie à cinq ans n'est que de l'ordre de 15 %.

3.2 - Facteurs de risque

Il y a quatre raisons majeures de développer un cancer du poumon :

- des substances cancérigènes telles celles contenues dans les cigarettes,
- des radiations,
- une susceptibilité génétique,
- des virus.

3.3 - Diagnostic

Le diagnostic de cancer broncho-pulmonaire est anatomopathologique et repose en première intention sur l'analyse de biopsies réalisées lors d'une fibroscopie bronchique. Afin de connaître le type de cancer pulmonaire, d'autres examens sont nécessaires : médiatinoscopie, pleuroscopie, ponction transpariétale. Des examens systématiques sont effectués tels qu'un hémogramme**,** ionogramme, clairance de la créatinine, calcémie, bilan hépatique (bilirubine, transaminases, gamma glutamyl transférase). Pour le moment, il n'existe pas de dosage de marqueurs tumoraux sériques à visée diagnostique.

Pour beaucoup de cancers, plus le diagnostic est fait tôt, moins les traitements sont lourds et meilleures sont les chances de guérison[6]. L'intérêt du diagnostic précoce est ainsi de mieux soigner, c'est-à-dire bien sûr d'augmenter les chances de guérir, mais aussi de limiter les séquelles liées à certains traitements. Les deux moyens d'agir pour permettre un diagnostic précoce sont d'une part le dépistage lorsqu'il existe, c'est-à-dire la pratique d'examens de

6 - INCa : Institut National du Cancer, http://www.e-cancer.fr/les-moyens-pour-agir/html/, « Cancer, il y a des moyens pour agir »

surveillance en l'absence de symptômes, et d'autre part l'identification des signes d'alerte dès leur apparition.

3.4 - Type de cancer

Il existe deux principaux types de cancer du poumon : le cancer du poumon à petites cellules (le plus répandu) et le cancer du poumon à petites cellules (Tableau 8).

Tableau 8 : Classification des types et sous-types du cancer du poumon

Cancer du poumon non à petites cellules	Cancer du poumon à petites cellules
Adénocarcinome (A549)	Carcinome à petites cellules
Carcinome épidermoïde (H460)	Carcinome mixte à petites et grandes cellules
Carcinome à grandes cellules indifférenciées	Carcinome mixte à petites cellules
Localisation : aucune partie du poumon n'est privilégiée	Localisation : alvéoles, bronches, bronchioles, tissu de soutien des poumons

3.5 - Biochimie du cancer

3.5.1 - Le développement d'une cellule cancéreuse

N'importe quelle cellule du corps peut donner naissance à un cancer. Mais cette transformation est un processus long, qui peut durer des dizaines d'années. Pour comprendre l'enchaînement des événements, il faut savoir que le corps contient des centaines de milliards de cellules qui forment les tissus et les organes. La plupart ont une durée de vie limitée. Tous les jours, des cellules se divisent donc pour remplacer les cellules mortes, mais aussi pour cicatriser les blessures.

Ce processus est étroitement contrôlé. Une cellule ne commence à se diviser que si elle en reçoit l'ordre, via des signaux chimiques appelés « facteurs de croissance ». Chaque cellule est aussi dotée d'un programme interne de « suicide », appelé mort programmée ou « apoptose ». Il se déclenche en cas d'anomalie de la cellule et provoque sa destruction en quelques heures. Pour déjouer ces mécanismes de contrôle, la cellule cancéreuse doit acquérir un ensemble de facultés :

- ne plus attendre les signaux externes pour croître et se diviser, ou bien forcer les cellules normales qui l'entourent à produire ces signaux,
- être insensible aux signaux freinant sa croissance et sa multiplication,
- échapper à la mort cellulaire programmée,
- pouvoir se diviser indéfiniment.

L'ordre dans lequel ces facultés sont acquises diffère d'un cancer à l'autre. S'y ajoutent deux autres caractéristiques essentielles [7]:

- d'une part, la cellule cancéreuse est capable de s'insinuer dans les tissus sains voisins et de migrer dans l'organisme pour donner des métastases,
- d'autre part, elle provoque la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui irriguent la tumeur et l'alimentent en oxygène et en nutriments (ce qu'on appelle l'angiogénèse). Ce dernier point est capital. Sans irrigation sanguine, la tumeur ne pourrait en effet grossir au-delà d'un dixième de millimètre.

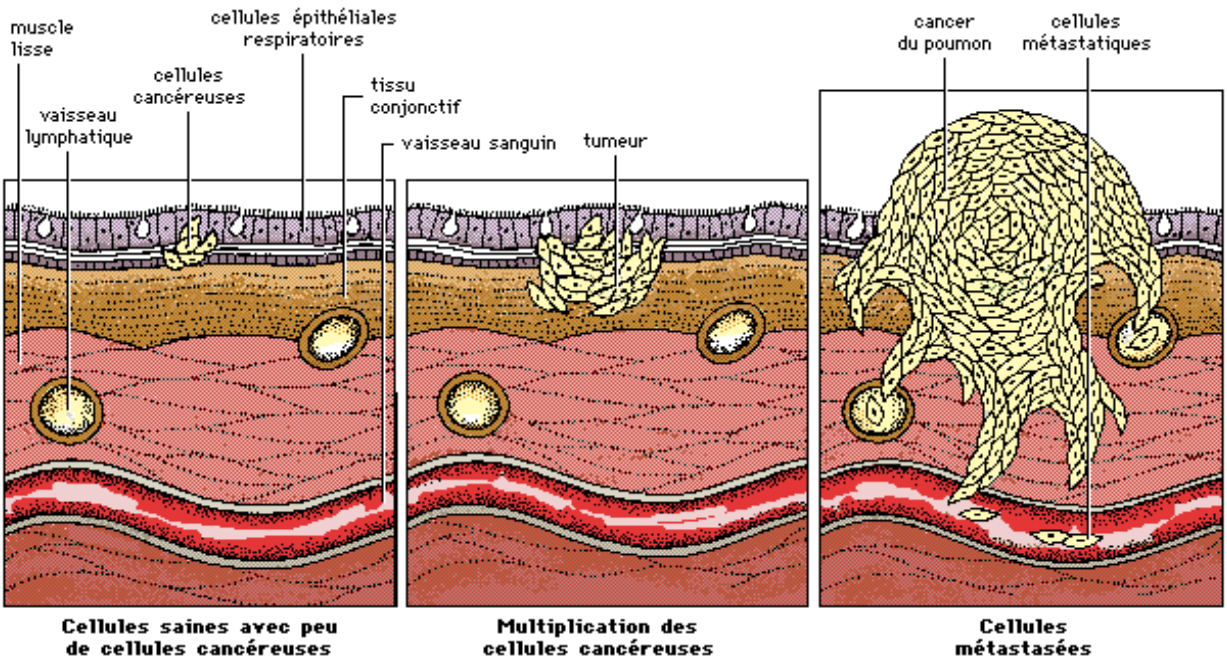
Toutes les cellules cancéreuses ne donnent cependant pas des cancers menaçant l'organisme. Le système immunitaire du corps dispose en effet d'armes spécialisées, les « cellules tueuses », qui sont capables de détecter les cellules anormales et de les éliminer. C'est seulement si ces défenses immunitaires sont débordées que le cancer se développe.

7 " *La Biochimie* " (Flammarion) de Lubert Stryer**.**

3.5.2 - De la cellule cancéreuse aux métastases

Les recherches en biologie du cancer ont montré que le développement tumoral ne se réduit pas à une simple multiplication anarchique et incontrôlée des cellules mais qu'il dépend également de nombreuses interactions entre ces cellules et les éléments tissulaires de l'hôte. La modification de la matrice extracellulaire est ainsi une étape importante non seulement nécessaire à l'invasion par les cellules tumorales mais aussi à leur prolifération[8]. Elle permet aussi la formation de néo-vaisseaux qui favorisent la croissance tumorale et, par la suite, représentent le point de départ des cellules cancéreuses migrant à travers leur paroi pour donner naissance à des sites métastatiques (Chantrain *et al.*, 2003).

<u>Figure 10</u> : Evolution de la cellule cancéreuse en cellule métastasée



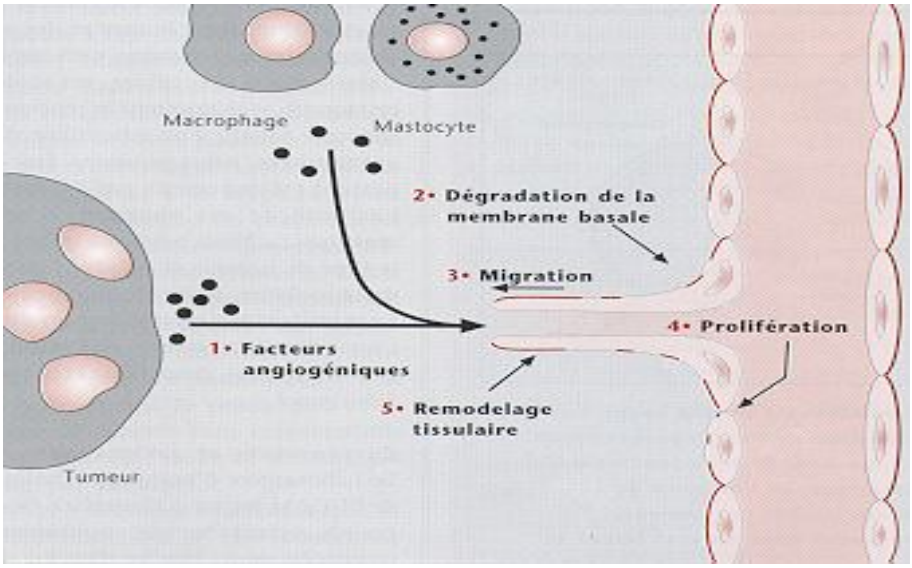
Le cancer du poumon est une maladie causée par le développement désordonné de cellules anormales, dites cancéreuses, dans les poumons. Ces dernières, se multipliant de manière incontrôlée, forment rapidement une tumeur. Lorsque cette tumeur atteint une certaine masse, elle a besoin de nutriments pour poursuivre sa croissance. Ainsi, elle peut atteindre la circulation sanguine et conduire à la formation de métastases, c'est-à-dire à la formation de tumeurs dans d'autres parties du corps (figure 10).

8 *Combustion toxique : Acroléine, polluant environnemental et cancer du poumon* **Julie Roy, B.Sc., Département de chimie, UQAM**

3.5.3 - L'angiogénèse

En plus de se multiplier de façon incontrôlée, les cellules cancéreuses corrompent donc les cellules qui les entourent et les utilisent à leur avantage. Une tumeur est toujours formée par un agglomérat de cellules cancéreuses et de cellules normales, qui collaborent entre elles. Les dernières recherches scientifiques se sont concentrées sur l'angiogénèse. L'approche a déjà été couronnée de succès avec la mise au point d'«anti-angiogéniques» bloquant la formation des vaisseaux sanguins autour des tumeurs qui, privées de nourriture, se nécrosent.

<u>Figure 11</u> : Principales étapes impliquées dans l'activation des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse



Les tumeurs sécrètent diverses molécules angiogéniques (figure 11), comme le bFGF et le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), qui sont exportées hors des cellules tumorales et diffusent à travers le tissu pour atteindre les vaisseaux (1). Ces molécules angiogéniques stimulent la production de collagénases et de l'activateur du plasminogène par les cellules endothéliales, permettant la dégradation de la membrane basale entourant le vaisseau (2). Les cellules endothéliales peuvent alors migrer vers la source du stimulus et

amorcer le bourgeonnement du vaisseau parental (3). Les cellules endothéliales prolifèrent rapidement pour permettre aux vaisseaux de prendre une expansion (4). La synthèse de composantes de la matrice extracellulaire par les cellules composant les nouveaux vaisseaux permet le remodelage du réseau capillaire (5).

Les dernières recherches scientifiques se sont concentrées sur la mise au point d'anti-angiogéniques. Le traitement fondé sur l'anti-angiogenèse, une stratégie suggérée pour la première fois il y a déjà plus de 20 ans, offre plusieurs avantages par rapport aux thérapies anticancéreuses classiques : spécificité d'action antitumorale, cible plus facilement accessible, risque moins élevé de résistance, efficacité dans le traitement d'association avec des anticancéreux classiques, et possibilité de chimioprophylaxie. En 2009, des médicaments anti-VEGF existent sur le marché : bévacizumab [Avastin], sunitinib [Sutent], sorafénib [Néxevar]) et sont de plus en plus utilisés dans le traitement de certains cancers (côlon, sein, poumon, foie et rein).

3.5.4 - La matrice extracellulaire (MEC)

L'espace qui entoure les cellules, appelé espace extracellulaire, contient un ensemble de macromolécules, polysaccharides ou glycosaminoglycanes, protéines fibreuses, sels et eau, que l'on désigne sous le nom de matrice extracellulaire. Les glycosaminoglycanes portent des charges négatives notamment sur les groupes sulfate et sont l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, le dermatan sulfate, l'héparan, l'héparine et le keratan sulfate. Les principales protéines de structure sont le collagène et l'élastine et les protéines d'adhésion, fibronectine et laminine.

Selon sa composition, la matrice extracellulaire peut prendre divers aspects, liquide comme le liquide interstitiel ou le liquide synovial riches en polysaccharides, gélatineux comme les tendons riches en protéines fibreuses, solides comme l'os riche en phosphate de calcium. La membrane basale qui sépare le tissu épithélial du tissu conjonctif constitue un type de matrice extracellulaire. Les constituants de la matrice extracellulaire sont synthétisés

et sécrétés par les cellules comme les fibroblastes, les chondroblastes et les chondrocytes et décomposés par des enzymes appelés MMP (métalloprotéases de la matrice).

La MEC est présente à tous les niveaux de l'organisme, mais son abondance et sa composition varient selon les tissus : très abondante dans les tissus conjonctifs lâches, particulière dans les tissus osseux et cartilagineux, très pauvre entre les cellules épithéliales. Les principales macromolécules de la MEC sont des polysaccharides (glycosaminoglycanes et protéoglycanes) et des protéines fibreuses, de structure (collagènes et élastine) ou d'adhérence (fibronectine et laminine), jouant un rôle important dans les interactions cellule-cellule et cellule-MEC.

- les glycosaminoglycanes sont de longues chaînes polysaccharidiques non ramifiées faites de la répétition d'un même motif disaccharidique. Les disaccharides de ce motif comportent un monosaccharide A (acide glucuronique, acide iduronique ou galactose) et un monosaccharide B (N-acétylglycosamine ou N-acétylgalactosamine). Les principaux glycosaminoglycanes présents dans la MEC sont l'acide hyaluronique, le chondroïtine-sulfate, le dermatane-sulfate, l'héparane-sulfate, l'héparine, le kératane-sulfate. L'acide hyaluronique est caractérisé par une longue chaîne unique de plusieurs milliers de résidus sucrés, avec absence de groupements sulfates. De nombreuses protéines extra-cellulaires de la MEC (collagène, fibronectine, laminine) ainsi que des récepteurs cellulaires de surface (comme le CD 44) peuvent se lier à l'acide hyaluronique.

- **les protéoglycanes** sont formés par un noyau protéique sur lequel se lient des glycosaminoglycanes. Les plus répandus sont la décorine (chondroïtine-sulfate/dermatane-sulfate) présente dans tous les tissus conjonctifs, le perlecan (héparane-sulfate) dans les membranes basales, et l'aggrécane, abondant dans le cartilage. L'acide hyaluronique ne forme pas des protéoglycanes. Par contre, les agrégats de protéoglycanes correspondent à une molécule d'acide hyaluronique sur laquelle se lient de multiples protéoglycanes. Leur charge négative élevée leur permet de retenir de grandes quantités d'eau. Les protéoglycanes ont la capacité de fixer certaines cytokines ou facteurs de croissance, et ainsi de moduler leur biodisponibilité.

- le collagène

Les collagènes constituent une superfamille de molécules formées par des protéines classiques et des protéines portant des domaines de type collagénique. Chaque molécule de tropocollagène est composée d'une triple hélice alpha dont la composition en acides aminés diffère selon le type de collagène. Dans un trimère, les chaînes alpha peuvent être identiques ou non. Les fibres de collagène sont formées, dans l'espace extra-cellulaire, par l'assemblage de molécules de tropocollagène synthétisées et excrétées essentiellement par les fibroblastes. On subdivise cette superfamille en plusieurs groupes. Nous n'envisagerons ici que les types de collagène les mieux connus.

Le collagène I est le plus communément distribué. Il se trouve dans le tissu conjonctif banal, dans le tissu conjonctif dense, dans le tissu osseux. Le collagène II est surtout présent dans le cartilage. Il se présente sous forme de fines fibrilles qui ne se groupent pas en fibres de plus fort calibre. Le collagène III est celui des fibres de réticuline. Le collagène IV entre dans la constitution des membranes basales. Le collagène X est propre aux chondrocytes hypertrophiques. L'élastine est la molécule principale des fibres élastiques.

- **la fibronectine** est un des maillons-clés de l'adhérence des cellules à la MEC. La fibronectine est une glycoprotéine extra-cellulaire ubiquitaire. Elle est présente sous forme soluble (sécrétée par les hépatocytes et les cellules endothéliales) dans les liquides de l'organisme et sous forme insoluble dans la MEC, où elle est sécrétée par les cellules mésenchymateuses (en particulier les fibroblastes) et par certaines cellules épithéliales. Elle présente de nombreux sites de liaison pour des protéines de la MEC (comme le collagène, la thrombospondine), des récepteurs membranaires (tels que les intégrines), des protéines du sang circulant (comme la fibrine), des glycosaminoglycanes (comme l'héparine et le chondroïtine-sulfate). La fibronectine, en plus de son rôle de molécule majeure de l'adhérence cellulaire avec le tissu conjonctif, intervient dans la communication cellulaire. La liaison fibronectine-intégrines membranaires peut activer des voies de transduction du signal (via des protéines kinases ou le cytosquelette) modifiant le comportement cellulaire (par exemple prolifération, différenciation, motilité). Ainsi, la fibronectine joue un rôle fondamental au cours de l'embryogénèse et dans de multiples processus physiologiques (cicatrisation, hémostase, angiogénèse) ou pathologiques (inflammation, cancérogénèse).

3.5.5 - Activation des macrophages dans le cancer du poumon

Récemment, des chercheurs ont identifié une protéine qui favoriserait la métastase du cancer du poumon[9]. Les chercheurs ont utilisé une approche biochimique simple, en se focalisant sur les macrophages, pour identifier cette protéine. Les macrophages sont des cellules ayant essentiellement une fonction de phagocytose et sont localisés dans les tissus, contrairement aux monocytes qui sont des cellules du sang. Les chercheurs ont ainsi examiné les différents facteurs causant un cancer par métastase chez la souris. Parmi les cellules analysées, celles issues d'un carcinome pulmonaire de Lewis (LLC) montrent une forte activation des macrophages par l'intermédiaire d'une protéine sécrétée par le LLC. Après différentes analyses, les chercheurs ont identifié cette protéine comme étant la versicane, une protéoglycane et l'une des principales composantes de la matrice extra-cellulaire. La versicane peut se trouver en faible quantité dans des cellules épithéliales de poumon chez l'homme, mais est surreprésentée dans les cellules du cancer du poumon, notamment dans les tumeurs agressives. De plus, elle s'avère accroître la croissance des métastases du LLC en activant des récepteurs produisant des cytokines, en particulier le récepteur TLR2 et la cytokine TNF-alpha. En limitant la production de versicane, les chercheurs espèrent développer un moyen thérapeutique pour limiter les métastases du cancer du poumon.

3.5.6 - Marqueurs biologiques sériques et détection des cancers

Par définition, les marqueurs tumoraux ne sont pas statiques et leur expression varie au cours du temps en fonction de l'état général du patient et du processus tumoral. En pratique, bien qu'un grand nombre de marqueurs présomptifs ait été identifié, peu d'entre eux ont été promus et recommandés pour une utilisation diagnostique dans la population générale.

[9] Lung Cancer Cells Activate Inflammation To Induce Metastasis. *Science Daily* (2009)

<u>Tableau 9</u> : Marqueurs utilisés dans le dépistage de certains cancers

Marqueur	Cancers cibles	Références
PSA (Antigène Prostatique Spécifique)	Adénocarcinome prostatique	(Greene *et al.*, 2009)
ACE (Antigène Carcino-embryonnaire)	Colorectal	(Park *et al.*, 2009)
CYFRA 21-1	Cancers bronchiques non à petites cellules	(Chen *et al.*, 2009)

Par ailleurs, ces marqueurs devraient montrer une corrélation nette entre leur concentration sérique et la taille de la tumeur. Actuellement, il en existe peu possédant une spécificité et une sensibilité suffisante pour avoir une utilité en clinique dans le diagnostic des stades précoces des cancers. Seuls l'antigène prostatique spécifique (PSA) et la thyrocalcitonine sont utilisés en routine, respectivement pour le dépistage et le diagnostic des cancers de la prostate et des formes familiales de cancers médullaires de la thyroïde. Ces deux seuls exemples illustrent la difficulté d'identifier des marqueurs de lésions cancéreuses pré-invasives qui sont, par définition, des tumeurs très localisées ne franchissant pas la membrane basale. Ces marqueurs correspondent généralement à des protéines sécrétées directement par les cellules cancéreuses ou par le microenvironnement tumoral dans un espace vasculaire de diffusion à proximité de la tumeur. Toute la difficulté consiste à les identifier et à les doser dans la circulation générale.

Positionnement du sujet

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés aux hémorphines, une catégorie originale de peptides qui tirent leur nom de leur origine, l'hémoglobine et de leur activité de morphinomimétique. Le fil conducteur de ces travaux de thèse a été de contribuer à la compréhension de leurs mécanismes de génération dans des environnements physiopathologiques favorables à leur biogenèse, à leur mode d'action et à démontrer l'utilité d'utiliser ces molécules comme outils de diagnostic.

Le point de départ de ces recherches a été la mise en évidence dans notre laboratoire de la capacité des macrophages murins à générer des hémorphines au cours de leur co-incubation avec de la globine. Depuis lors, l'approche qui a été privilégiée, notamment au cours de la thèse d'I. Fruitier (1999), a été d'étudier plus précisément la capacité du système protéolytique de ce type cellulaire (lysosomes et cathepsines) à dégrader le précurseur des hémorphines, à savoir l'hémoglobine.

La découverte de ces peptides dans les tissus humains a mené de nombreuses équipes à étudier la relation entre la libération d'hémorphines et certaines situations pathologiques. Les premiers à avoir observer ce lien sont Glämsta et coll (1992a) dans le LCR de patients victimes d'accidents cérébraux. Par la suite, LVVH7, VVH7 et H7 ont été isolées à partir de tissus issus de phéochromocytomes (Cerpa-Poljak *et al.*, 1997), de fluide de lavage bronchoaolvéolaire de patients atteints de cancer du poumon (Duethman *et al.*, 2000), dans les sera de patients atteints de cancer du sein (Cohen *et al.*, 2003b), dans le cortex de patients atteints d'Alzheimer (Poljak *et al.*, 2004) ou encore dans les carcinomes hépatocellulaires (Zhou *et al.*, 2005). Dans ce contexte, l'hypothèse d'utiliser les hémorphines, et plus particulièrement les hémorphines de type 7, comme marqueurs de pathologies a été rapidement suggérée. Plusieurs méthodes expérimentales ont été mises en place pour détecter et quantifier les concentrations d'hémorphines produites et circulantes. La plus répandue est la CLHP en phase inverse, puis le dosage radioimmunologique (RIA) (Glamsta *et al.*, 1993); (Nyberg *et al.*, 1996). En 2003, un dosage immunoenzymatique a été mis en place dans notre laboratoire permettant de développer une méthode aussi sensible que le dosage radioimmunologique tout en s'affranchissant de matériels radioactifs.

Cet outil ELISA de dosage des hémorphines a permis de tester l'hypothèse que les hémorphines ou des peptides apparentés pourraient constituer des marqueurs précoces de l'activité des cathepsines D et plus en amont des marqueurs de pathologies où l'action des cathepsines est suspectée. Il a pu être appliqué au dosage des fluides biologiques et testé en tant qu'outil de diagnostic dans le cas de tumeurs mammaires. C'est à partir de ces résultats que l'idée d'utiliser ces peptides comme marqueurs de pathologies est apparue et a conduit à appliquer cette mesure des taux sériques d'hémorphines à d'autres pathologies et notamment au diabète. Ainsi sur la période 2003-2004, et grâce au soutien financier de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HP, AORC), une étude clinique a pu être conduite (Bégu, 2005) dont le principal résultat est un taux anormalement abaissé des hémorphines chez les patients diabétiques. Aujourd'hui ce soutien des Hôpitaux de Marseille se poursuit sous la forme d'un Projet Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) mis en place entre le service de Nutrition, Maladies Métaboliques et Endocrinologie de CHU de La Timone à Marseille et notre laboratoire. Il vise à expliciter les raisons biochimiques et physiopathologiques de cette diminution des hémorphines 7 observée chez les diabétiques qui constituent une grande partie des objectifs des travaux de recherche conduits au cours de cette thèse.

Ces travaux de thèse ont été menés sur la base de ces objectifs et s'articulent autour de trois chapitres. Un premier chapitre qui s'appuie totalement sur les objectifs du PHRC à savoir :

1) la confirmation de la diminution des taux sériques d'hémorphines de type 7 dans une cohorte de patients diabétiques beaucoup plus élargie,

2) la recherche des raisons biochimiques de cette anomalie par le test de deux hypothèses : une possible modification du métabolisme des hémorphines, notamment par un catabolisme accru ; et une modification des attaques protéolytiques du précurseur des hémorphines, l'hémoglobine, glyquée de façon exacerbée dans le cas du diabète,

3) l'étude des conséquences fonctionnelles de la diminution des hémorphines de type 7 dans le diabète. Ces peptides ont la particularité d'être multifonctionnels et ont notamment la capacité d'interagir avec les récepteurs opioïdes (Nyberg, 1997), de l'angiotensine IV

(Moeller *et al.*, 1997) et d'inhiber de façon compétitive l'activité de certaines enzymes (aminopeptidase, ECA). De plus, LVVH7, tout comme l'angiotensine IV, est ligand du récepteur AT_4. Ce récepteur est identique à l'Insulin Regulated Aminopeptidase (IRAP), métallopeptidase zinc-dépendante insérée dans la membrane plus particulièrement des adipocytes et des cellules musculaires squelettiques (Keller *et al.*, 1995). Il est couplé au transporteur GLUT4 dans les adipocytes (Waters *et al.*, 1997) mais aussi dans l'hippocampe et le cortex cérébral (Fernando *et al.*, 2008). Il a tout d'abord été étudié pour marquer les vésicules contenant GLUT4, en accompagnant le transporteur à la membrane suite à une stimulation insulinique (Bryant *et al.*, 2002). L'insuline est impliquée dans de nombreuses pathologies et particulièrement dans le diabète. Ces données suggèrent que LVVH7 pourrait jouer un rôle dans la translocation du transporteur GLUT4 par l'intermédiaire d'une interaction avec IRAP. Le modèle cellulaire choisi pour étudier l'interaction et les effets de LVVH7 sur l'IRAP est l'adipocyte humain. Nous nous sommes d'abord intéressés à identifier le récepteur GLUT4 dans la cellule après une stimulation des adipocytes par le peptide LVVH7. Puis, notre recherche s'est orientée sur la caractérisation de l'action de LVVH7 sur l'activité enzymatique d'IRAP mesurée à la surface des adipocytes.

Toujours dans l'optique d'apporter de nouveaux arguments en faveur de la possible utilisation de ces peptides comme biomarqueurs de dysfonctionnements, ces travaux de recherche se sont poursuivis dans l'environnement pathologique des tumeurs et font l'objet du deuxième chapitre de thèse.

Ce deuxième chapitre vise à comprendre le rôle de ces peptides dans le microenvironnement tumoral de cancers pulmonaires. Comme nous l'avons précédemment décrit, LVVH7 a pu être mis en évidence dans des fluides de lavages bronchoalvéolaires de patients atteints de cancers du poumon (Duethman *et al.*, 2000). De plus, le microenvironnement tumoral constitue un réservoir de signaux qui régule la progression tumorale. Parmi les multiples composants de la matrice péricellulaire, les protéines plasmatiques recrutées dans les zones tumorales peuvent jouer un rôle central lorsqu'elles sont clivées par des protéases. Le microenvironnement tumoral est plus acide qu'un

environnement cellulaire sain (Jullien P., 1989). Cette acidité favorise l'expression de protéases. La forme inactive de la cathepsine D est sur-sécrétée dans le cas de cancers du sein et des poumons (Fusek M., 2007). L'acidification du microenvironnement pourrait faciliter le clivage de la proenzyme cathepsine D et ainsi accroître la dégradation des protéines telles que l'hémoglobine. Enfin, la présence de la cathepsine D dans les cellules du microenvironnement semble favoriser l'activité angiogénique (Gonzalez-Vela, 1999). Ces données bibliographiques nous ont permis d'entreprendre des recherches sur le rôle de ces peptides dans les cancers pulmonaires. En effet, les hémorphines proviennent de la dégradation de l'hémoglobine par la cathepsine D. Le clivage de cette protéine peut être modifié dans un microenvironnement tumoral, ce qui peut par la suite moduler la présence des hémorphines de type 7. Cette étude s'inscrit dans un projet intitulé MatriGO, regroupant quatre équipes de recherche (Orléans, Tours, Rennes et notre laboratoire) et financé par l'Institut National contre le Cancer (INCA) depuis 2008.

Enfin, ces travaux se sont finalisés par la mise en place d'une collaboration avec l'équipe de recherche INSERM U698 de l'Hôpital Bichat à Paris qui conduit des recherches visant à l'identification de biomarqueurs pertinents permettant de prévenir la rupture d'anévrismes lors d'athérothrombose. Sur ce projet, nous avons eu la charge de doser la concentration des hémorphines de type 7 dans des sécrétomes provenant de thrombus de l'aorte abdominale ainsi que plus d'une centaine de sera de patients souffrant d'anévrisme de l'aorte abdominale.

Chapitre 1 : Etude des hémorphines de type 7 dans le diabète

Partie A : *Signification et conséquences pronostiques de la baisse des hémorphines de type 7 dans le diabète*

Cette partie de nos travaux a fait l'objet de deux publications dans le journal « Peptides »:

1 - *Significant lower VVH7-like immunoreactivity serum level in diabetic patients: evidence for independence from metabolic control and three key enzymes in hemorphin metabolism, cathepsin D, ACE and DPP-IV*. Feron D, Begu-Le Corroller A., Piot JM., Fruitier-Arnaudin I. Peptides 30 (**2009**) 256–261.

2 - *Proteolytic degradation by cathepsin D of glycated hemoglobin from diabetes patients gives rise to hemorphin-7 peptides.* Feron D, Piot JM., Fruitier-Arnaudin I. Peptides (**2010**) (*sous-presse)*

La première partie de nos travaux porte sur l'étude des hémorphines de type 7 dans le contexte pathologique particulier du diabète. Suite à l'obtention de résultats préliminaires montrant une diminution significative de la concentration en hémorphines de type 7 dans les sera de patients diabétiques, un Projet Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) a été mis en place entre le service de nutrition et de maladies métaboliques du CHU La Timone de Marseille et notre laboratoire. C'est dans le cadre de ce projet que s'inscrivent les objectifs scientifiques de ce chapitre qui visent à expliciter biochimiquement les raisons de cette anomalie.

Ce travail se divise en trois parties. Tout d'abord, dans un premier objectif, et sur une cohorte élargie de patients diabétiques, les taux circulants d'hémorphines ont été de nouveau évalués. Parallèlement, et pour répondre aux questionnements relatifs à cette anomalie des taux, une étude détaillée du métabolisme de ces peptides a été entreprise dans le sérum des patients. Enfin, l'hypothèse de l'hypoproduction des hémorphines a été testée par la mesure de l'impact de la modification covalente par glycation de l'hémoglobine, leur précurseur, sur les concentrations d'hémorphines produites.

1 - Matériels et méthodes

1.1 - Les patients

Le PHRC a reçu un accord du Comité de protection des personnes se prêtant à la recherche biomédicale (CCPPRB) associé au CHU La Timone de Marseille. Le service de Nutrition, Maladies métaboliques et Endocrinologie, CHU Timone (Pr. B. Vialettes) a assuré la sélection des patients, leur information, le recueil des consentements, les prélèvements sanguins, la préparation et le conditionnement des sera, ainsi que les autres investigations relatives aux dosages des différentes variables biologiques. Il assure enfin le suivi annuel des patients inclus dans l'étude. Les échantillons prélevés ont été conditionnés pour des envois réguliers du CHU de la Timone vers le laboratoire LIENSs de La Rochelle (envoi à -80°C sous carboglace). Ces échantillons étant des sera humains, l'application des bonnes pratiques de manipulation au laboratoire ont été respectées dès leur réception Un cahier des charges précis a été élaboré énumérant les différentes étapes de leur manipulation, et de leur stockage.

1.1.1 - Descriptif du cahier des charges mis en place pour le dosage immunoenzymatique

- Origine des échantillons

Les échantillons proviennent du « Service de Nutrition, Maladies métaboliques, Endocrinologie » du Pr Bernard Vialettes du Centre Hospitalier Universitaire de La Timone et ont été obtenus sur des patients diabétiques de type 1 et 2 au cours d'une hospitalisation de jour. Un consentement éclairé a été obtenu de chaque patient préalablement validé par le Comité Consultatif de Protection de Personnes (CCPPRB de Marseille 2).

- Préparation des sera

Elle a été conduite à Marseille dans le service du Pr Vialettes. Le prélèvement sanguin effectué sur un tube sec est aussitôt centrifugé à 4°C puis le sérum est récupéré par prélèvement du surnageant de centrifugation et stocké dans des cryotubes pour être placé à -70°C avant conditionnement pour envoi à La Rochelle.

- Conditionnement des sera pour leur transport vers La Rochelle

Les cryotubes sont placés dans une pochette biohazard double compartiment puis dans une valise biohazard placée dans un colis contenant de la carboglace. Le colis est accompagné d'un document de transport sur lequel figure le matériel transporté, le volume par tube et le nombre de tubes ainsi que nom et adresse de l'expéditeur.

- Réception et conditionnement à La Rochelle

L'ouverture se fait dans le laboratoire de niveau de confinement L2 du laboratoire de l'Université de La Rochelle. La valise est ouverte sous le Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) de type II et les cryotubes contenant les échantillons sont stockés dans des boîtes adaptées au stockage à -80°C.

- Manipulation des sera pour le dosage ELISA (CH Saint-Louis de La Rochelle)

Les tubes contenant le sérum sont ouverts sous le PSM de type II du Centre Hospitalier de La Rochelle. En effet, afin d'éviter toute contamination et faciliter l'évacuation des déchets liquides, toutes les manipulations concernant le dosage ELISA des hémorphines de type 7 se font dans la salle de biologie moléculaire de l'hôpital, à savoir l'ouverture des tubes, le pipetage et les lavages. Après un séjour dans la javel, les résidus sont éliminés.

1.1.2 Caractéristiques de la cohorte de patients diabétiques

Les sera proviennent de patients comportant des caractéristiques cliniques différentes, répertoriées dans le tableau 10, en terme de sexe, d'âge définissant les variables qualitatives et de fructosamine, créatinine, haptoglobine, lactate déshydrogénase et HbA1c pour les variables qualitatives.

Tableau 10 : Caractéristiques des patients dont les sera ont été dosés (moyenne ± σ)

	Contrôles (N=15)	Type 1 (N=64)	Type 2 (N=56)
Genre (M/F)	6/9	40/24	36/20
Age moyen (ans)	45,6 ± 11,2	55 ± 9,4	63 ± 7,7
Durée moyenne du diabète (année)	/	27	/
IMC* (kg/m^2)	22,7 ± 1,86	24,3 ± 2,7	29,6 ± 3,57
Hypertension (%)	/	33	78
Fructosamine (µmol/L)	/	327,9 ± 54,6	/
Créatinine (mg/dl)	/	100,9 ± 25,6	82,8 ± 10,1
Haptoglobine (g/L)	/	1,16 ± 0,45	1,38 ± 0,35
Lactate déshydrogénase (UI/L)	/	302,9 ± 43,2	307,4 ± 37,9
HbA1c (%)	/	7,8 ± 0,97	7,37 ± 0,84

/ : information non disponible

* IMC : Indice de Masse Corporelle

D'autres patients de type 1 ont été prélevés pour lesquels l'extraction de leur hémoglobine a été réalisée dans le but de comparer la sensibilité de ces différentes hémoglobines à l'action d'une protéase particulière, la cathepsine D. Les échantillons ont été prélevés au CHU de La Timone et l'extraction de l'hémoglobine a été réalisée dans le laboratoire de Chimie Analytique du Pr Portugal à la Faculté de Pharmacie de Marseille. Les taux d'HbA1c mesuré sont répertoriés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Taux d'HbA1c des patients étudiés

Taux HbA1c (%)	Nombre de patients
≤ 7%	4
>7%	12

Deux échantillons ont été prélevés sur des contrôles, soit des personnes ne présentant pas de pathologies relatives au diabète.

1.2 - Dosage immunoenzymatique des hémorphines de type 7

La première étape a consisté en l'étude d'une cohorte plus importante de patients afin de confirmer la baisse de la concentration en hémorphines de type 7 contenues dans des sera pour les deux types de diabète (type 1 et type 2). Un dosage de type ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) a été appliqué.

1.2.1 - Principe du dosage

La technique de dosage immunoenzymatique utilisée est celle de l'ELISA par compétition. Des molécules antigéniques diluées s'adsorbent sur la paroi des puits d'une plaque de microtitration ou microplaque. Le sérum des patients diabétiques est incubé avec l'anticorps anti-VVH7 ou anticorps 1. Le complexe antigène-anticorps ainsi formé est détecté

par une réaction enzymatique colorimétrique grâce à un anticorps secondaire lié à une enzyme, et dont l'activité enzymatique est estimée par la transformation du substrat chromogène. Le substrat d'abord incolore se colore après l'action de l'enzyme. Après l'arrêt de la réaction, l'absorbance de chacun des puits est lue par l'intermédiaire d'un lecteur de microplaques.

1.2.2 - Caractéristiques des anticorps utilisés

Les anticorps polyclonaux anti-VVH7 utilisés ont été obtenus et caractérisés par la société Eurogentec sur la base d'un protocole établi au laboratoire (Garreau et coll, 1997). L'immunogène est constitué de VVH7 couplé à l'hémocyanine (KLH) par son extrémité N-terminale.

KLH - Val - Val - Tyr - Pro - Trp - Thr - Gln - Arg – Phe

L'immunogène est alors émulsifié dans de l'adjuvant de Freund et injecté par voie sous-cutanée à des lapins selon le protocole établi avec la société prestataire.

Le second anticorps utilisé est un anticorps commercialisé par Beckman Coulter, c'est un fragment $F(ab')_2$ d'IgG anti-lapin produit chez la chèvre, il est conjugué à la peroxydase. Cet anticorps réagit avec la chaîne lourde des IgG de lapin et la plupart des chaînes légères d'immunoglobulines de lapin.

1.2.3 - Protocole du dosage ELISA

Le protocole du dosage ELISA, mis en place par Cohen et coll.(2002), a été suivi à l'exception de quelques paramètres (concentration en immunogène, concentration des anticorps 1 et 2) qui ont fait l'objet d'optimisations. Ces procédures d'optimisation touchent toutes les étapes du protocole, de la fixation de l'antigène à la dilution de travail de l'anticorps secondaire.

1.2.3.a - Fixation de l'antigène BSA-VVH7

Afin de faciliter l'adsorption du peptide VVH7 dans les différents puits, le peptide est conjugué à l'albumine sérique (BSA, Bovin Serum Albumin Sigma, A7888). 1mL de solution

de VVH7 (synthétisé par Altergen, Strasbourg) à 3mg/ml (dans eau distillée) est additionné à 1mL d'une solution de BSA à 4mg/mL (dans eau distillée). Pour permettre la liaison covalente entre le peptide et l'albumine, le *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (ECDI, Sigma E6383) est additionné goutte à goutte sur 2,5 minutes à une concentration de $2{,}5.10^{-5}$M (dans eau distillée).

Le mélange est laissé à température ambiante, sous agitation pendant deux heures. Le conjugué ou immunogène-like BSA-VVH7 ainsi obtenu est ensuite placé à 4°C toute la nuit, puis aliquoté et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Dans le conjugué, on a une concentration en VVH7 estimée à $2{,}6^{E}$-4M. En effet, le peptide est lié à la BSA, protéine globulaire qui contient 40 lysines sur l'extérieur de sa structure et qui permet de fixer de façon covalente le peptide VVH7. Pour une molécule de BSA, on estime pouvoir fixer 40 fois plus de peptide. Les microplaques (MaxiSorp™ 442404, Nunc Danemark) sont préparées en additionnant 50µL/puits du conjugué dilué à la concentration voulue dans un tampon phosphate 10mM à pH 7,3 sauf dans les puits les plus extérieurs. Les plaques sont placées à 37°C pendant toute la nuit pour favoriser l'absorption de l'antigène.

Pour chaque immunogène fabriqué, la concentration optimale d'utilisation de celui-ci dans le dosage ELISA est déterminée en incubant les différents puits avec des concentrations en immunogènes variables.

1.2.3.b - Etape de saturation des puits

Après l'incubation à 37°C du conjugué dans les puits, chaque puits est rincé quatre fois par une solution tampon PBS-Tween20 à 0,1% (v/v) (tampon PBS : 136mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 6,5mM de Na_2HPO_4, 1,5mM de KH_2PO_4 ajusté à pH 7,3). Ensuite, 300µL d'une solution de PBS-BSA 1% (p/v) sont additionnés dans chaque puits et incubés pendant 2h à température ambiante. Cette étape permet de saturer les puits et d'éviter la fixation de protéines ou de peptides non spécifiques.

1.2.3.c - Etape de liaison de l'anticorps 1 à l'antigène BSA-VVH7

Après l'étape de saturation, les puits sont rincés quatre fois par une solution tampon PBS-Tween20 à 0,1%. 25 µL de solutions de VVH7 standard pour l'établissement d'une courbe standard ou 25 µL de solutions à doser (sera de patients diabétiques purs ou dilués) sont incubés dans chacun des puits selon un ordre préalablement établi. 25µL d'anticorps anti-VVH7 dilués 10,000 fois avec une solution de PBS-BSA 1% sont ensuite ajoutés. Le mélange est mis à agiter 18h à 4°C.

1.2.3.d - Etape de liaison de l'anticorps secondaire à l'antisérum

Suite à l'incubation avec l'anticorps primaire, les puits sont rincés avec la solution de lavage PBS-T20 0,1%. L'anticorps 2, fourni par la société Beckman Coulter, est conjugué à la peroxydase. Il est dilué 20,000 fois dans le tampon PBS-BSA 1%, 50 µL de cet anticorps sont ensuite déposés dans chacun des puits. Le mélange est mis à incuber deux heures à température ambiante sous agitation. De même que pour l'anticorps 1, l'utilisation de cet anticorps a nécessité une étape d'optimisation afin de déterminer la dilution la plus efficace pour obtenir un signal convenable.

1.2.3.e - Etape de révélation

Après rinçage par une solution de PBS-T20 0,1% à cinq reprises, 200µL de 3-3'-5-5'-tétraméthylbenzydine (SIGMA, réf T0565) sont additionnés dans chaque puits et incubés 30 minutes à température ambiante sous agitation. La réaction enzymatique développe une coloration bleue plus ou moins intense en fonction de la quantité en anticorps 2 fixée dans le puits. Afin de stopper la réaction, on ajoute 100µL d'une solution d'H_2S0_4 à 0,5M. La coloration jaune qui apparaît alors est lue à 450 nm grâce à un lecteur de microplaque de type Thermomax (Molecular Devices, modèle MWG-Biotech).

1.2.4 – Traitement des résultats

1.2.4.a – Etablissement d'une courbe de calibration

Dans le but d'obtenir une courbe de calibration standard, une gamme de concentrations en peptide VVH7 synthétique de 1^{E-12} à 1^{E-5} M est incubée avec les deux anticorps selon le protocole ELISA précédemment décrit. La quantité d'anticorps liée au conjugué BSA-VVH7 est inversement proportionnelle à la concentration en VVH7 libre dans l'échantillon et est détectée grâce au second anticorps conjugué à la peroxydase. L'incubation de la gamme en VVH7 avec l'anticorps primaire permet l'établissement d'une courbe de calibration typique, obtenue en dessinant le ratio entre l'absorbance à 450 nm en présence (B) ou en absence de VVH7 (Bmax) en fonction du logarithme de la concentration en VVH7. Sur chaque microplaque, il est donc nécessaire de consacrer une colonne aux valeurs Bmax, et deux colonnes aux valeurs de la gamme VVH7.

1.2.4.b - Traitement statistique des résultats

Etant donné le nombre d'échantillons étudiés soit au total 125, les caractéristiques des patients et des contrôles ont été soumis à des tests statistiques sur la médiane par un test Mann-Whitney. Le test de Mann-Whitney est un test non paramétrique d'identité portant sur deux échantillons indépendants issus de variables numériques. L'égalité entre deux médianes est calculée sur un intervalle de confiance (IC) de 95%. Si $p > 0,05$ alors les médianes ne sont pas égales pour un IC de 95%. La différence est considérée comme significative si $p < 0,05$. De plus, le coefficient de Pearson a été utilisé afin d'étudier les corrélations entre les valeurs des concentrations en hémorphines de type 7 et les différentes caractéristiques des patients. Le coefficient de Pearson est un indice statistique qui exprime l'intensité et le sens (positif ou négatif) de la relation linéaire entre deux variables quantitatives . Ses valeurs sont situées dans l'intervalle qui va de -1 à +1. Une valeur égale à -1 ou à +1 indique l'existence d'une relation linéaire parfaite (fonctionnelle) entre les deux variables. En revanche, ce coefficient est nul ($r = 0$) lorsqu'il n'y a pas de relation linéaire entre les variables.

1.3 - Dosage de l'activité de trois enzymes impliquées dans le métabolisme des hémorphines de type 7

Il existe au moins trois enzymes décrites comme étant impliquées dans le métabolisme des hémorphines de type 7 :

- La cathepsine D (3.4.23.5) est une aspartyl protéase lysosomale caractérisée par deux résidus aspartate constituant le site actif. Cette enzyme est décrite comme une des premières à être impliquée dans la biogenèse des hémorphines. Elle reconnaît l'hémoglobine comme substrat et libère dès les premières minutes d'incubation les peptides LVV- et VVH7 (Fruitier *et al.*, 1998).

- La Dipeptidyl Peptidase IV (DPPIV, EC 3.4.14.5) est une sérine protéase extracellulaire décrite comme une enzyme impliquée dans le catabolisme de peptides régulateurs divers et notamment les hémorphines. Les hémorphines de type 7 sont des substrats potentiels de cette enzyme (Cohen *et al.*, 2003a).

- L'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine (ECA 3.4.15.1) est également une dipeptidyl peptidase décrite principalement pour le rôle important qu'elle joue dans le contrôle de la pression artérielle et dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle. Cette enzyme a un rôle clé dans le traitement du diabète et fait l'objet de développements thérapeutiques importants visant à inhiber son action vasopressive. C'est dans ce contexte que les hémorphines ont été caractérisés comme peptides inhibiteurs de cette enzyme (Lantz *et al.*, 1991). Le mode d'action compétitif de leur inhibition suggère donc une possible action de l'ECA dans leur catabolisme.

1.3.1 – Dosage de l'activité cathepsine D

1.3.1.a - Principe

L'activité est déterminée selon la procédure Sigma SSHEMO02 basée sur la méthode de Smith et al. (Smith & Turk, 1974).

Le dosage est fondé sur la réaction suivante catalysée par la cathepsine D :

Hémoglobine + H_2O ⟶ Peptides solubles au TCA

Il consiste en la détermination de l'activité cathepsine D avec le suivi de l'absorbance des peptides solubles au TCA (acide trichloroacétique) absorbant à 280 nm.

1.3.1.b - Protocole

La réaction est réalisée dans un tube à essai. La solution d'hémoglobine bovine (2,5% p/v) est dissoute dans un tampon citrate (400mM ; pH 2,8). La solution est équilibrée à 37°C et incubée 10 mn avec 40µL d'échantillon de sérum. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution d'acide trichloroacétique de façon à obtenir une solution dont la concentration finale est de 5%. Le mélange final est filtré sur un filtre de porosité 0,45µm afin d'éliminer les précipités formés par le TCA et l'hémoglobine non hydrolysée. L'absorbance à 280 nm est mesurée pour chaque échantillon. Un blanc et un contrôle positif avec de la cathepsine D commerciale (Sigma C3138) sont effectués dans les mêmes conditions. La réaction est effectuée en triplicat pour chaque échantillon.

1.3.1.c - Traitement des résultats

L'activité enzymatique par millilitre est calculée pour chaque échantillon selon l'équation suivante :

$$\text{U/mL enzyme} = \frac{(A_{280}\,\text{Test} - A_{280}\,\text{Blank}) * 4.51}{t * \text{Venz} * 1\ \text{uDO}}$$

t = durée de l'essai (min)

Venz = volume d'enzyme utilisé (ml)

1 uDO = 1 unité DO à 280 nm par minute

1.3.2 – Dosage de l'activité DPPIV

1.3.2.a – Principe

L'activité de la dipeptidyl peptidase IV a été déterminée par une méthode spectrophotométrique mise au point par Hino et Fuyamada (1976) utilisant des microplaques 96 puits (Jarmolowska *et al.*, 2007). Afin de connaître l'activité DPPIV des différents échantillons, les sera sont mis en contact avec un substrat libérant de la p-nitroanilide. La quantité de p-nitroanilide libérée rend compte de l'activité sérique de la DPPIV.

1.3.2.b – Protocole

Le cocktail réactionnel contient :

- 100µL de Gly-Pro-p-nitroanilide (G2901) 3mM (substrat),
- 50µL de tampon Gly/NaOH 0,3M pH 8,3,
- 50 µL d'eau distillée,
- 10µL d'échantillon de sérum.

Les blancs contiennent 10µL d'échantillon mais les 100µL de substrat sont remplacés par 100µL d'eau distillée. Un blanc pour chaque échantillon est réalisé. L'incubation dure 30 minutes à 37°C et la réaction est arrêtée par ajout de 50µL de tampon acétate pH 4,2 à 4°C. Une gamme standard de p-nitroanilide (Sigma N2128) est réalisée couvrant les concentrations 10µM à 1mM. L'absorbance du produit de réaction soit la molécule de p-nitroanilide est mesurée à 405 nm avec un lecteur de microplaques (Molecular Devices, MWG Biotech). Pour obtenir l'absorbance de chaque échantillon, l'absorbance du blanc doit être soustraite pour chaque sérum. Une unité est définie comme la quantité d'enzyme libérant 1 µmol de p-nitroanilide par minute et par litre de sérum à 37°C.

1.3.3 - Dosage de l'activité de l'ECA

1.3.3.a - Principe

L'activité de l'ECA a été déterminée par une méthode mise au point pat Cushman et Cheung en 1971. Afin de connaître l'activité enzymatique des échantillons, ceux-ci sont mis en présence d'un substrat spécifique N-Hippuryl-His-Leu hydrate (HHL, Sigma 859052). Le produit de réaction est l'acide hippurique (AH, Sigma 53280) dont on mesure la quantité par chromatographie liquide équipée d'un détecteur à 228 nm.

1.3.3.b - Protocole

L'hydrolyse de HHL en AH est conduite pendant 30 minutes à 37°C dans un volume réactionnel final de 450 µL contenant 50µL d'échantillon sérique supposé contenir l'activité enzymatique ainsi qu'HHL concentré à 5 mM. La réaction est stoppée par ajout de 250 µL d'HCl 1M. Le captopril (C4042), inhibiteur spécifique de l'ECA, est utilisé à 9,2E-7 M et ajouté au cocktail réactionnel deux minutes avant le début de la réaction. Afin de comparer les quantités d'AH libérées par les différents sera, une gamme standard d'AH est réalisée 1 à 100 nmoles repris dans un tampon borate 100 mM (pH 8,3). Les analyses en chromatographie liquide haute performance (CLHP) ont été menées avec un système chromatographique (WATERS Milford USA, Alliance) comprenant un module de séparation 2690, équipé d'un détecteur 996 à barrette de diodes. Le principe de la séparation par chromatographie liquide est expliqué de façon plus détaillée dans la partie 1.4.3.b. Chaque produit de réaction est filtré sur 0,22µ avant injection sur une colonne Luna C_{18} (2) (250 mm * 4,6 mm, 5µm, Phénomenex, France). L'analyse est conduite à 228 nm. La phase mobile contient deux éluants, A : eau mQ / 1% acide trifluoroacétique et B : acétonitrile / 1% acide trifluoroacétique ; le débit est constant à 1mL/min pendant 48 minutes. L'HHL et l'AH sont élués par le gradient suivant : 13-42,5% de B en 25 minutes, puis 42,5 à 100% pendant 10 minutes et pour finir, 5 minutes jusqu'à 13% de B.

1.3.3.c – Traitement des résultats

La courbe de calibration est réalisée avec neuf quantités différentes d'AH. Les courbes sont construites en reliant la quantité d'AH (nmoles) avec l'aire du pic. L'activité enzymatique est exprimée en U.L-1. Une unité est définie comme la quantité d'enzyme capable de libérer 1µmol/min d'AH.

1.4 - Hydrolyse de l'hémoglobine glyquée par la cathepsine D

1.4.1 - Extraction de l'hémoglobine à partir de globules rouges

Les culots de sang ont été centrifugés pendant 15 minutes à 25°C et 4600g. Après cette première centrifugation, seuls les globules rouges sont retenus. Ils sont ensuite lavés trois fois avec 7 volumes de solution saline (NaCl à 0.9%). Afin de casser les membranes cellulaires, les culots de globules rouges sont ensuite resuspendus dans 20 fois leur volume d'eau distillée (eau distillée). Afin d'éliminer l'eau, chaque échantillon est concentré grâce à un SpeedVac (Maxi Dry Plus, Fisher Scientific, 1994). La manipulation est faite à 50°C, 3mL d'eau sont évaporés en 6h. La poudre d'hémoglobine est ensuite stockée à -20°C.

1.4.2 - Conditions d'hydrolyse de l'hémoglobine par la cathepsine D

Les conditions d'hydrolyse sont celles décrites dans la publication de Fruitier I. et coll (1998). La poudre d'hémoglobine obtenue comme décrit en 1.4.1 est dissoute dans une solution d'HCl à 4 mM pH 3. Quatre états de glycation ont été étudiés :

- 6% (glycation d'une hémoglobine provenant d'un contrôle),
- 9,1%,
- 10,7%,
- 12,1%.

Le rapport enzyme substrat fixé pour une hydrolyse optimale à pH 3 est 1/182 (p/p). L'hydrolyse est réalisée dans un pH-stat maintenant le pH à 3 par addition d'une solution

d'HCl 4mM. L'hydrolyse dure 3 h et débute dès l'addition de l'enzyme, la cathepsine D (Sigma C-3138). Des aliquots de 450µL sont prélevés à des intervalles réguliers, soit toutes les 5 minutes jusqu'à 30 minutes et toutes les 30 minutes ensuite. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution d'acide trichloroacétique à 50% en concentration finale.

Afin d'étudier la corrélation entre le degré de glycation de l'hémoglobine et la quantité de peptides générés par l'action de la cathepsine D, quatre rapports enzyme/substrat supplémentaires ont été étudiés pour chaque degré de glycation précédemment sélectionné :

- 1/50
- 1/200
- 1/225
- 1/250

1.4.3 - Caractérisation des produits de glycation obtenus

1.4.3.a - Instrument

Une fois la réaction arrêtée, les échantillons sont filtrés sur 0.22µ. La caractérisation s'effectue grâce à un système chromatographique (WATERS, Alliance) comprenant un module de séparation 2690 et un détecteur 996 à barrette de diodes. Le logiciel Millenium (WATERS) permet l'acquisition des données chromatographiques.

1.4.3.b - Principe et conditions d'élution

La séparation est basée sur la différence d'affinité des molécules vis-à-vis de la phase stationnaire hydrophobe et de la phase mobile plus ou moins hydrophile selon le gradient utilisé. La phase stationnaire est constituée de particules de silice de 5 µm de diamètre sur lesquelles sont greffées des chaînes aliphatiques de 18 atomes de carbone responsables de l'hydrophobicité. Le diamètre des pores de cette phase est de 100Å. Les peptides sont injectés sur la colonne Phénomenex Luna C18 (250 x 4,6mm, 100 Å).

Un gradient permettant d'identifier les hémorphines de type 7 a été mis en place au laboratoire. Les peptides sont élués par un gradient linéaire d'acétonitrile (éluant B) précédé d'une phase isocratique comme détaillé sur le tableau suivant :

<u>Tableau 12</u> : Conditions d'élution appliquées à la séparation des échantillons et témoins d'hydrolyse sur une colonne C18 en phase inverse.

Gradient d'élution (minutes)	Eluant A (acétate d'ammonium 10mM, pH 6)	Eluant B (acétonitrile)
0	**85**	**15**
5	**85**	**15**
35	**60**	**40**
40	**0**	**100**
50	**0**	**100**
55	**85**	**15**

Entre chaque injection, la colonne est rééquilibrée pendant 15 minutes avec 15% de solvant B. Le débit utilisé est de 1 ml/min. L'absorbance est enregistrée à 280 nm.

1.4.3.c - Identification des peptides hémorphine-7 dans l'hydrolysat

Au préalable des gammes de concentrations variant de 20 pmoles à 1 nmole ont été réalisées dans de l'eau distillée pour chaque peptide hémorphine-7 (LVVH7, VVH7 et H7). Ces peptides ont été synthétisés par Altergen (Strasbourg, France). Ces gammes ont été injectées sur la colonne afin de déterminer les temps de rétention dans ces conditions, ainsi que pour pouvoir établir une corrélation entre la surface du pic et la concentration de ce

peptide. Les spectres UV sont également enregistrés et stockés dans une librairie de spectres qui permettra l'application directe de la méthode de comparaison spectrale décrite par Zhao et coll (1996).

Cette méthode d'analyse consiste à déterminer un pourcentage d'homologie entre le spectre pris au sommet du pic de peptide inconnu et celui, préenregistré dans la base de données, d'un peptide synthétique. Les résultats de comparaison des spectres sont exprimés par deux variables :

- Le « match angle » (MA) qui correspond à la mesure de l'angle vectoriel entre le spectre du peptide synthétique et le spectre du peptide inconnu. Ces calculs d'angle effectués par le logiciel Millenium, compris entre 0 et 90°, correspondent à un pourcentage d'homologie, respectivement de 100 à 0%. Plus la valeur de cet angle est élevée, plus le pourcentage d'homologie entre les deux spectres est faible, et inversement.

- Le « match treshold » (MT) décrit la sensibilité de la mesure. Elle correspond au bruit de fond (absorbance de la phase mobile) et ses valeurs sont comprises entre 0 et 180°.

Deux spectres sont considérés identiques si la valeur MA est inférieure à 1,5 et si MA<MT.

1.4.3 - Quantification des peptides hémorphine-7 libérés par CL/SM

1.4.3.a – Instrument

Le système utilisé est un système chromatographique couplé à la spectrométrie de masse (CL/SM, Agilent, série 1100, piège MSD, Waldbrom, Allemagne) équipé d'une colonne analytique Phénomenex Luna C18 (250 mm long, 4.6 mm diamètre) directement couplée au détecteur UV. L'appareil est équipé d'une source d'ionisation electrospray (ESI), d'un spectromètre de masse en chambre simple quadripolaire.

1.4.3.b – Conditions d'analyse

La source comprend un nébuliseur électrostatique dont la tension est maintenue à 5000V. Un jet d'air chaud température de 200°C est utilisé pour faciliter l'évaporation de l'affluent compte tenu des débits relativement élevés (0,3ml/min). La spectrométrie de masse permet de transformer des molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux et d'obtenir leur masse moléculaire en analysant leur rapport m/z où m est la masse du composé et z sa charge. Une séparation par chromatographie liquide, utilisée en amont du spectromètre de masse, a permis de différencier les peptides.

La phase mobile utilisée lors de l'analyse est un mélange binaire Eau mQ/0,1% acide acétique (éluant A) et acétonitrile/0,1% acide acétique (éluant B). Le gradient d'élution est présenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau 13 : **Gradient d'élution appliqué à l'analyse des peptides hémorphine-7 par LC/MS**

Gradient d'élution (minutes)	Eluant A (Eau mQ/ 0,1% acide acétique)	Eluant B (acétonitrile/ 0,1% acide acétique)
0	85	15
5	85	15
35	60	40
40	0	100
50	0	100
55	85	15

L'acquisition des données est faite par le logiciel Analyst Software 6.0. Le spectre de masse enregistre sur un balayage de 600 à 1800 m/z en mode positif d'ion, permettant de cibler les peptides d'intérêt soit LVVH7 (MH^+ = 1308,7), VVH7 (MH^+=1195,4) et H7 (MH^+=997,3). Le CIT (Chromatogramme d'Ions Totaux) permet d'obtenir les chromatogrammes de masse des ions moléculaires protonés des peptides présents dans l'échantillon.

1.4.3.c – Méthode de quantification

Au préalable, des gammes de concentration des peptides synthétiques LVVH7, VVH7 et H7 ont été préparées dans de l'eau distillée. Ces gammes varient de 0,01 à 100nmoles. Elles permettent de relier une quantité de peptide à une intensité de pic. Grâce à ces gammes, les différents peptides hémorphine-7 présents dans les hydrolysats pourront être quantifiés.

2 - Résultats – Discussion

Les hémorphines de type 7 ont été isolées dans le sérum humain et notamment en quantité moindre chez des patients atteints de diabète (Fruiter-Arnaudin *et al.*, 2003). Cette étude financée par un projet AORC de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille a été réalisée sur 31 patients diabétiques et 25 sujets contrôles appariés sur l'âge et a montré que les patients diabétiques présentaient des taux sériques d'hémorphines 7 significativement abaissés par rapport aux sujets contrôles (0,8 +/- 0,94 µmol/l vs 4,09 +/- 1,05 µmol/l, $p< 0,0001$). Suite à ces premiers résultats, un deuxième projet de recherche clinique a été mis en place sous la forme d'un PHRC. Dans un premier temps, nous avons étudié les concentrations en hémorphines de type 7 sur une cohorte de patients plus importante pour confirmer les résultats précédemment obtenus. Ensuite, deux hypothèses pouvant expliciter cette hypoproduction des peptides ont été émises et testées.

Nous avons d'abord étudié le métabolisme des hémorphines de type 7. Un hypercatabolisme de ces peptides pourrait expliciter leur diminution dans le sérum. L'activité des enzymes responsables du catabolisme de ces peptides a été étudiée dans le même compartiment cellulaire.

Nous avons orienté notre deuxième hypothèse sur le précurseur des hémorphines : l'hémoglobine. L'augmentation du degré de glycation de l'hémoglobine chez des patients diabétiques pourrait influencer son processus de dégradation. Il nous a semblé intéressant de comparer l'action de la principale enzyme impliquée dans la production des hémorphines, la cathepsine D, sur des hémoglobines glyquées à des degrés différents.

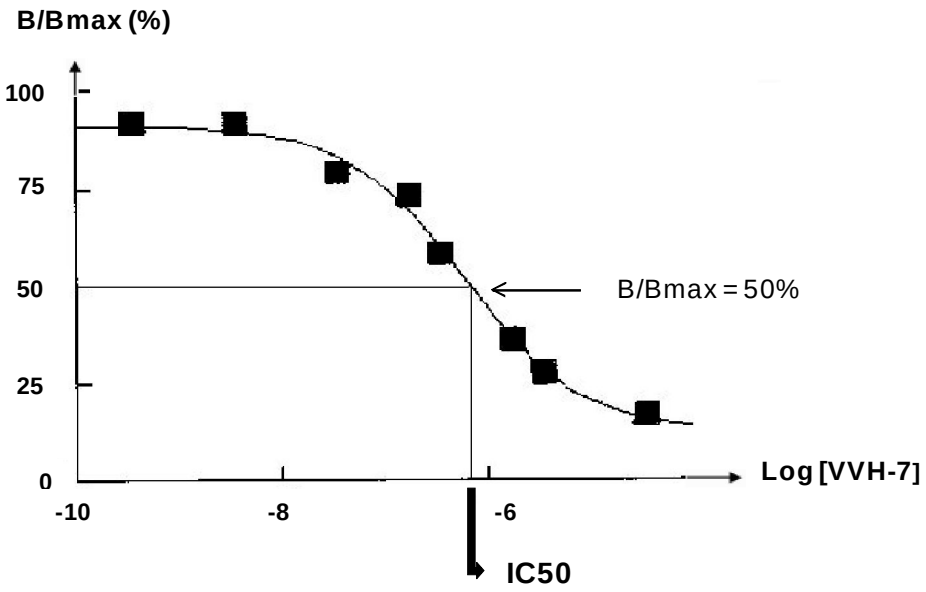
2.1 - Concentration en hémorphines de type 7 sériques : application au diabète

2.1.1 – Etablissement d'une courbe standard

Afin de pouvoir calculer la concentration en hémorphines de type 7 contenue dans les sera de patients diabétiques, une courbe standard à partir du peptide VVH7 synthétique a été

établie. La courbe réalisée relie l'absorbance à 450 nm en présence (B) ou en absence de VVH7 (Bmax) en fonction de la concentration en VVH7 (Figure 11).

Figure 12 : Courbe de calibration typique de VVH7 en ELISA



Cette courbe permet d'estimer l'IC50 (c'est-à-dire la concentration de peptides capable d'inhiber 50% de la liaison de l'anticorps primaire au conjugué BSA-VVH7) à $6{,}86^{E}$-7M.

2.1.2 - Dosage de la concentration en hémorphine-7 dans les sera de patients diabétiques

Afin de confirmer les premiers résultats obtenus montrant une diminution de la concentration en hémorphines de type 7 chez les patients diabétiques, la cohorte de patients a été élargie. Les dosages ont été réalisés sur 56 patients diabétiques de type 2, 64 patients diabétiques de type 2 et 15 contrôles.

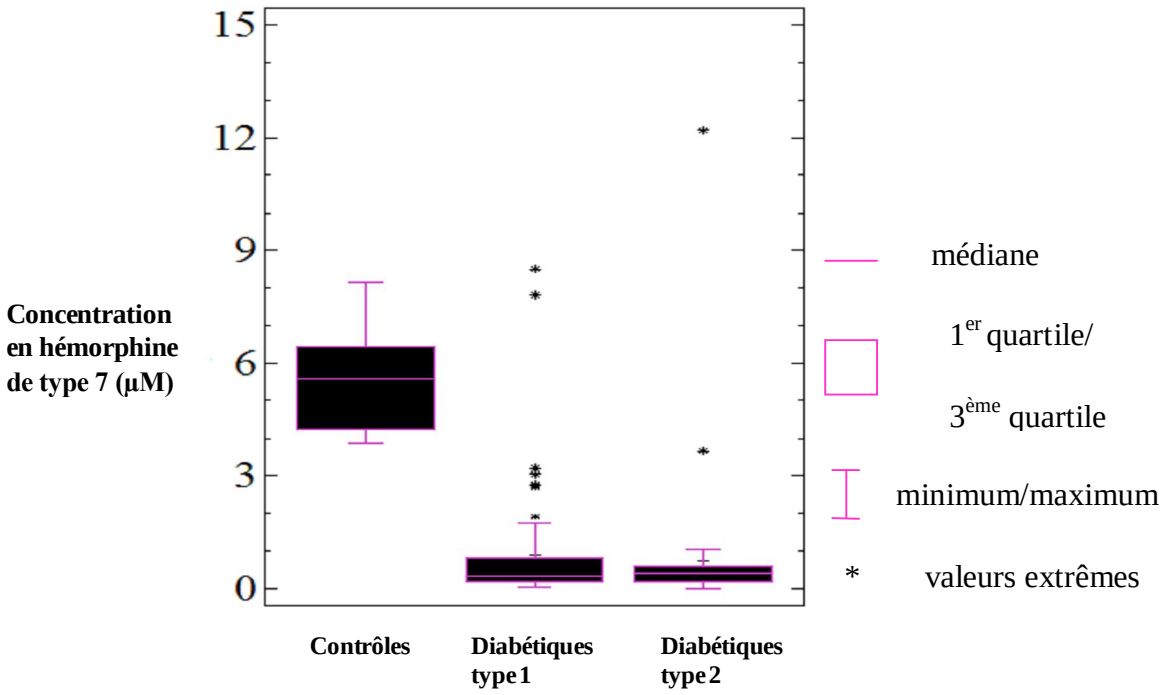
La moyenne en µM des hémorphines est calculée pour les contrôles, les diabétiques tous types confondus, les diabétiques de type 1 et les diabétiques de type 2 (Tableau 14). Nous avons montré que la concentration sérique en hémorphines de type 7 est diminuée chez les patients diabétiques 0,907 µM (0,01-12,20/min-max) par rapport aux contrôles 5,63 µM (3,86-8,13/min-max).

Tableau 14 : Concentration sérique et écart-type en hémorphines de type 7 (H7) des contrôles, patients diabétiques de type 1 et de type 2

	Contrôles (N=15)	**Tous types (N=120)**	**Type 1 (N=64)**	**Type 2 (N=56)**
H7 (µM)	5,635 ± 1,11	0,907 ± 0,093	1,037 ± 0,985	0,388 ± 0,130

La figure 12 montre la répartition des concentrations en hémorphines de type 7 pour chaque catégorie de patients (contrôles, diabétiques de type 1 et diabétiques de type 2).

Figure 13 : Répartition des concentrations en hémorphines de type 7 pour chaque catégorie de patients.



On peut noter de façon marquée une différence de concentrations entre les contrôles et les patients de type 1, de type 2 et des deux types confondus. La diminution semble plus marquée chez les patients diabétiques de type 2. Une étude statistique a été mise en place pour déterminer si cette différence pouvait être considéré comme significative.

2.1.3 - Etude statistique de la concentration en hémorphines de type 7

Afin d'établir si la différence entre les concentrations en hémorphines de type 7 est significative, un test mathématique a été réalisé sur les médianes des différents groupes (Tableau 15).

<u>Tableau 15</u> : Comparaison de la concentration en hémorphine de type 7 pour chaque catégorie de patients (C : contrôle, T1 : type 1, T2 : type 2, T1/T2 : tous types confondus) par un test de Mann-Whitney.

		Médiane (min-max)	**Valeur de p**
Hémorphine-7 (µM)	C	5,56 (3,86-8,13)	**< 0,001**
	T1	0,322 (0,027-8,5)	
	C	5,56 (3,86-8,13)	**< 0,001**
	T2	0,411 (0,014-18,5)	
	C	5,56 (3,86-8,13)	**< 0,001**
	T1/T2	0,394 (0,014-18,5)	
	T1	0,322 (0,027-8,5)	0,8606
	T2	0,411 (0,014-18,5)	

(*) pour un intervalle de confiance à 95%

Ce tableau montre que la différence des concentrations en hémorphines de type 7 est significative entre les contrôles et les patients diabétiques de type 2, ainsi qu'entre les contrôles et les patients diabétiques de type 2 et enfin entre les contrôles et les patients diabétiques tous types confondus. Cette différence est significative pour un intervalle de confiance à 95%. En revanche, la même étude a été réalisée sur la différence entre les deux types de diabète. En effet, comme précédemment montré par la figure 12, il apparaît que les concentrations en hémorphines de type 7 sont diminuées de façon plus importante chez les patients diabétiques de type 2 (0,388 µM) par rapport aux patients diabétiques de type 1 (1,037 µM). D'après le test de Mann-Whitney, cette différence n'est pas significative ($p > 0,001$ soit $p = 0,8606$) pour un intervalle de confiance à 95%.

Afin de compléter cette étude sur les concentrations sériques en hémorphines de type 7, nous avons cherché à corréler ce taux en hémorphines de type 7 chez les patients diabétiques avec d'autres paramètres cliniques qui nous ont été fournis par le service de diabétologie du Dr Vialettes. Ces paramètres sont définis dans le tableau 10.

La concentration en hémorphines de type 7 a été corrélée aux différents paramètres cliniques :

- *IMC* ou *Indice de Masse Corporelle*, paramètre mesurant le rapport entre le poids et la taille. Cet indice est couramment utilisé pour estimer le surpoids et l'obésité chez les populations et les individus adultes. Il correspond au poids divisé par le carré de la taille, exprimé en kg/m^2. L'OMS définit le surpoids comme un IMC égal ou supérieur à 25 et l'obésité comme un IMC égal ou supérieur à 30.

- *HbA1c*, représentant le taux de glycation de l'hémoglobine au cours des deux derniers mois, exprimé en %.

- *Fructosamine*, désigne l'ensemble des protéines glyquées présentes dans le sérum mais l'albumine glyquée représente 80 % de la fructosamine et le renouvellement des ces protéines est beaucoup plus rapide que le renouvellement de l'HbA1C. Cette donnée a un intérêt lorsque la valeur de l'HbA1c est ininterprétable. Elle est exprimée en mol/L.

- *Créatinine*, substance constituée d'azote qui provient de la dégradation de la créatine. Elle est normalement éliminée par les reins dans les urines.

- *Microalbuminurie* mesure la présence d'albumine dans les urines, protéine qui doit normalement être retenue dans le sang par les reins. Ce dosage permet de déterminer le risque de développer une maladie cardiovasculaire.

- *Haptoglobine* est une protéine de la réaction inflammatoire. Sa concentration augmente tardivement lors d'une inflammation mais permet de suivre l'évolution de la réaction inflammatoire. Elle permet également de suspecter un phénomène d'hémolyse intra-vasculaire en récupérant le fer de l'hémoglobine lorsqu'il y a destruction des globules rouges. C'est une protéine dont le dosage a un intérêt dans le suivi du traitement des maladies inflammatoires chroniques.

- *Lactate déshydrogénase* ou *LDH* est une enzyme qui catalyse la conversion du pyruvate en lactate, elle est exprimée en UI/L. Elle est souvent utilisée comme marqueur de dommage tissulaire. Comme la LDH est abondante dans les globules rouges, elle peut servir de marqueur de l'hémolyse.

Les différents résultats de coefficients de corrélation sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 16 : Mesure des corrélations entre les concentrations en hémorphines de type-7 et divers paramètres cliniques.

Correlations	*IMC*	*HbA1c*	*Créatinine*	*Microalbuminurie*	*Haptoglobin*	*LDH*	*Fructosamine*	*H7*
IMC	1							
HbA1C	X (*)	1						
	0,296 (**)							
Créatinine	X	-0,266	1					
	-0,423	-0,276						
Microalbuminurie	X	0,198	0,076	1				
	0,221	**0,058**	**0,192**					
Haptoglobine	X	0,229	-0,163	0,032	1			
	0,183	**0,251**	**-0,142**	**0,166**				
LDH	X	0,144	-0,026	0,004	-0,075	1		
	-0,031	**-0,099**	**-0,052**	**0,110**	**0,065**			
Fructosamine	X	0,705	-0,252	0,118	-0,053	0,118	1	
	X	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**		
Hémophines-7	X	0,028	0,129	-0,006	0,066	-0,009	-0,080	1
	-0,350	**-0,089**	**0,324**	**0,170**	**0,118**	**-0,084**	X	

(*) Valeurs des *r* obtenues avec les paramètres cliniques des patients diabétiques de type 1

(**) Valeurs des *r* obtenues avec les paramètres cliniques des patients diabétiques de type 2

Comme décrit en 1.2.4.b, lorsque r = -1 ou r = 1, il existe une corrélation négative ou positive entre les deux paramètres étudiés. Selon le tableau 16, aucune corrélation positive ou négative n'a pu être relevée entre les concentrations en hémorphines de type 7 et les différents paramètres cliniques quel que soit le type de diabète étudié. De plus, il est important de noter qu'aucune corrélation n'a été relevée entre le taux de glycation et les hémorphines de type 7 (r= -0,089) pour des patients diabétiques de type 2. Il en est de même pour le diabète de type 1, il n'existe aucune corrélation entre le taux de glycation et la concentration en hémorphines de type 7 (r = 0,028). Ces résultats semblent signifier qu'il n'existe pas de relation entre la

diminution de la concentration plasmatiques des hémorphines de type 7 et le degré de glycation de l'hémoglobine. Les coefficients les plus importants se situent entre l'IMC et les hémorphines de type 7 (r = -0,350) ainsi qu'entre la créatinine et les hémorphines de type 7 (r = 0,324).

Une étude entre les hémorphines de type 7 et la tension artérielle été menée à l'hôpital *La Timone* de Marseille (Bégu, 2005). Elle montre que la concentration sérique de ces peptides est reliée négativement à la pression artérielle diastolique (valeur de la pression artérielle au moment de la diastole cardiaque, c'est à dire durant la relaxation ventriculaire) et la pression artérielle moyenne chez des patients souffrant d'un diabète de type 1.

2.2 - Etude de l'activité sérique des enzymes impliquées dans le métabolisme des hémorphines de type 7

Différentes activités intervenant dans le métabolisme des hémorphines ont été étudiées :

- La cathepsine D
- La DPPIV
- L'ECA

Comme décrit dans le matériel et la méthode du chapitre 1, chaque activité a été testée dans les échantillons sériques. L'objectif de cette manipulation est de comprendre la diminution de la concentration en hémorphines de type 7 dans les sera de patients diabétiques. Ces peptides, produits par la protéolyse cellulaire de l'hémoglobine, peuvent être sous-produits, clivés dès leur apparition ou alors utilisés comme substrat par un système de régulation.

<u>Tableau 17</u> : Activité enzymatique sérique de la cathepsine D, de la DPPIV et de l'eca pour chaque catégorie de patients (C : contrôle, T1 : type 1, T2 : type 2, TT : type 1 et type 2).

	C	TT	T1	T2
Activité sérique cathepsine D (U/L)	153,0 +/- 19,1	470,0 +/- 30.2	491,0 +/- 109	450,0 +/- 40,7
Activité sérique DPP-IV (U/L)	282,1 +/- 22,4	50,81 +/- 1,05	46,22 +/- 2,00	57,49 +/- 2,12
Activité sérique ECA (U/L)	30,01 +/-16,8	33,10 +/- 10,8	34,16 +/- 14,1	29,20 +/- 10,5

Ces trois enzymes ont été choisies pour leur implication à la fois dans le métabolisme des hémorphines de type 7 et dans la pathologie étudiée.

La cathepsine D est à l'heure actuelle la principale enzyme impliquée dans la protéolyse cellulaire de l'hémoglobine humaine avec comme résultat la génération d'hémorphines de type 7 (Fruitier *et al.*, 1998). Nous nous sommes intéressés à l'activité cathepsine D dans les sera de patients afin de vérifier s'il existait une différence d'activité dans les sera des patients diabétiques par rapport aux sera des contrôles. Sur la base de l'observation d'une diminution de la concentration en hémorphines de type 7 chez les patients diabétiques de type 1 et 2, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle une hypoproduction des hémorphines pouvait être la conséquence d'une diminution de l'activité sérique cathepsine D. Comme le montre le tableau 17, l'activité cathepsine D est 3 fois moins importante dans les sera des contrôles (153,0 vs 470,0 U/L) que dans le sérum des patients diabétiques invalidant ainsi l'hypothèse de l'hypoproduction. L'hypothèse de l'hypoproduction ne pouvant être retenue, nous nous sommes intéressés aux processus impliqués dans la dégradation des hémorphines de type 7. Dans la littérature, les hémorphines

ont été décrites comme substrats de la DPPIV (Cohen *et al.*, 2004). Cette enzyme est principalement connue pour agir sur l'activation ou l'inactivation des peptides. De plus, cette enzyme est connue pour être une cible thérapeutique privilégiée dans le traitement du diabète. En 2002, Kvist Reimer et coll ont montré que l'inhibition de l'enzyme DPPIV augmenterait la tolérance au glucose notamment en augmentant l'expression de Glut 2, récepteur au glucose sécrété par les hépatocytes et les cellules B des îlots de Langerhans. Nous avons donc émis une deuxième hypothèse selon laquelle les hémorphines de type 7 pourraient être substrats d'une activité sérique de DPPIV, ce qui diminuerait leur concentration sérique. Le dosage de l'activité de la DPPIV montre une activité plus importante dans les sera des contrôles que ceux des patients diabétiques (282,1 vs 50,81 U/L, cf. : Tableau 17).

Enfin, une troisième enzyme, l'ECA a été étudiée. Les hémorphines ont été décrites par Lantz and coll (1991) comme ayant une activité inhibitrice sur cette enzyme. De plus, Fruitier et coll (2002) ont montré que LVVH7 et VVH7 exerçaient une action inhibitrice sur l'ECA. Comme le montre le tableau 18, les valeurs de l'activité sérique de l'ECA sont proches quelque soit la provenance du sérum. Il faut préciser que dans la cohorte de patients diabétiques de type 1, certains patients sont traités par un inhibiteur de l'ECA (*Sartans*, ARAII). Dans la cohorte de patients atteints de diabète de type 2, tous les sujets sont traités par cet inhibiteur et n'ont donc pas été inclus dans cette étude. Le tableau suivant répertorie les activités sériques de l'ECA en fonction du traitement pour des patients diabétiques de type 1.

<u>Tableau 18</u> : Activité enzymatique de l'ECA en fonction du traitement pour des patients diabétiques de type 1

	Traité par IECA	**Sans traitement**
Activité sérique ECA (U/L)	38,2 +/-9,9	34,8+/-11,4

Nous pouvons conclure que le traitement par inhibiteur suivi par les patients atteints de diabète de type 1 n'a pas d'effet sur l'activité sérique de l'ECA. En ce qui concerne les patients diabétiques de type 2, nous pouvons remarquer que l'activité sérique est légèrement diminuée par rapport aux contrôles (30,10 vs 29,20 U/L) mais l'écart type aux environs de 10 (U/L) est trop élevé pour que la différence soit significative.

<u>Tableau 19</u> : Coefficient de corrélation entre les activités sériques des trois enzymes testées et les hémorphines de type 7 (H7)

	ECA	**CD**	**DPPIV**	**H7**
ECA	1			
CD	-0,00546267	1		
DPPIV	-0,12578301	-0,18805037	1	
H7	-0,15107312	-0,26832247	0,61289888	1

L'analyse de ces coefficients de corrélation montrent aucune liaison forte entre la concentration en hémorphine de type 7 et les activités sériques cathepsine D et ECA. Par contre, une corrélation positive (r= 0,61) entre la concentration en hémorphines et l'activité sérique de la DPPIV est à noter.

En conclusion, nous avons confirmé la diminution de la concentration en hémorphines de type 7 chez des patients atteints de diabète de type 1 et de type 2. Cette diminution est plus importante chez les patients diabétiques de type 2. Nous avons émis une première hypothèse sur une modification du catabolisme des hémorphines. Nous avons étudié trois enzymes intervenant dans le métabolisme des hémorphines de type7 : la cathepsine D, la DPPIV et l'ECA. Aucune des trois activités enzymatiques ne permet d'expliquer ce taux en hémorphines. En effet, l'activité enzymatique cathepsine D libérant les hémorphines à partir de l'hémoglobine, n'est pas diminuée. De même, les résultats des activités sériques de la DPPIV et de l'ECA ne vont pas dans le sens d'un hypercatabolisme. L'activité DPPIV est augmentée dans les sera des contrôles alors que l'on s'attendait à une diminution. L'activité de l'ECA ne permet pas non plus d'expliciter la diminution des hémorphines de type 7 dans les sera des patients diabétiques. L'activité ECA est sensiblement la même chez les contrôles et les patients, quelque soit le type de diabète.

Nous avons donc poursuivi nos recherches en nous intéressant maintenant au précurseur des hémorphines, l'hémoglobine, ceci afin de vérifier l'hypothèse d'une hypoproduction consécutive à sa modification covalente par glycation.

2.3 - Etude du rôle de la glycation de l'hémoglobine sur la libération des hémorphines de type 7

Afin de compléter les résultats obtenus précédemment, nous avons testé une autre hypothèse pouvant expliquer ces anomalies de taux circulants d'hémorphines : l'impact d'une glycation plus importante du précurseur des hémorphines, l'hémoglobine. L'hémoglobine glyquée, connue sous l'abréviation HbA1c, mais aussi appelée glycohémoglobine, est une valeur biologique permettant de déterminer la concentration de glucose dans le sang, la glycémie, sur une longue période de temps (Larsen *et al.*, 1990). Elle s'exprime en pourcentage et reflète la concentration de glucose dans le sang au cours des deux derniers mois (Weykamp *et al.*, 1994). Elle est particulièrement utile, et constitue le paramètre de référence dans la surveillance de l'équilibre glycémique des patients diabétiques. Selon l'Afsaaps en 2006, l'objectif du traitement d'un patient diabétique est la normalisation glycémique qui est définie par une hémoglobine glyquée (HbA1c) inférieure à 6,5 %.

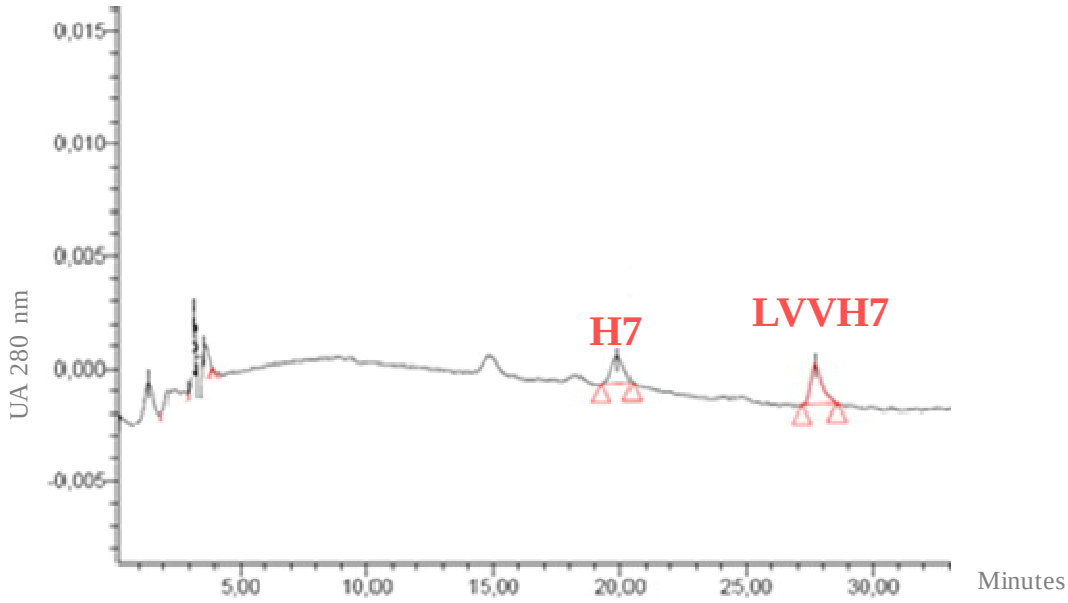
La modification des protéines par glycosylation peut affecter leurs propriétés fonctionnelles : modification des sites protéolytiques, inhibition de la capacité des protéines à être un ligand (Brownlee, 1994). De plus, il a été montré que la glycosylation de l'hémoglobine pouvait réduire sa capacité à être dégradée par protéolyse (Pollak *et al.*, 1982). Les hémorphines sont des produits spécifiques de la dégradation de l'hémoglobine par la cathepsine D (Fruitier *et al.*, 1998). Une étude réalisée en 2003 dans notre laboratoire (Fruiter-Arnaudin *et al.*) a montré que de l'hémoglobine bovine glyquée *in vitro* libérait 3 à 5 fois moins d'hémorphines de type 7 comparée à une hémoglobine bovine non glyquée.

Nous avons décidé de comparer la potentialité de la cathepsine D à libérer les hémorphines de type 7 à partir d'hémoglobine humaine glyquée extraites directement des patients. Différents degrés de glycation ont été retenus pour cette étude : 6% pour des contrôles et de 9 à 12% pour des patients diabétiques de type 1. Les peptides issus de l'hydrolyse de ces différentes glycohémoglobines par de la cathepsine D commerciale ont été identifiés puis quantifiés.

2.3.1 - Caractérisation des peptides obtenus après hydrolyse de l'HbA1c par la cathepsine D

Quatre type de glycohémoglobines (6 ; 9,1 ; 10,7 et 12,1%) ont été incubées avec la cathepsine D pendant 3h. Les produits de ces incubations ont été analysés par CLHP et l'identification des hémorphines de type 7 a été réalisée par la méthode de comparaison des spectres (Zhao *et al.*, 1996). La figure ci-dessous est un exemple des chromatogrammes obtenus après hydrolyse des hémoglobines glyquées par la cathepsine D. Grâce à la méthode de comparaison des spectres, nous avons pu identifier notre population peptidique. Sur le chromatogramme figure 14, LVVH7 (tr = 27,7 min) et H7 (tr = 19,9 min) ont été identifiés; l'hémoglobine utilisée provient d'un patient diabétique de type 1 glyquée à 10,7%.

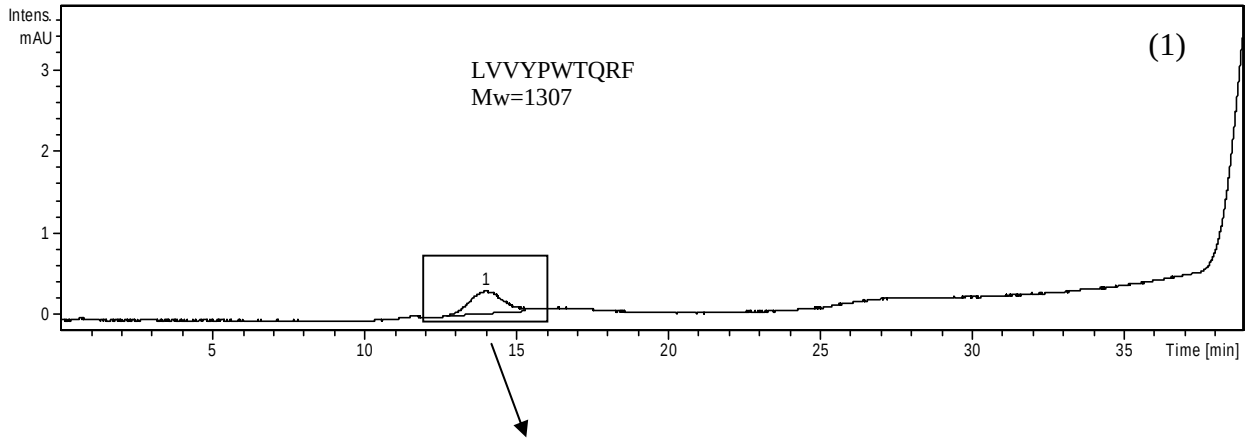
<u>Figure 14 :</u> Analyse par CLHP de l'hydrolyse d'une hémoglobine glyquée à 10,7% par la cathepsine D après 30 minutes.

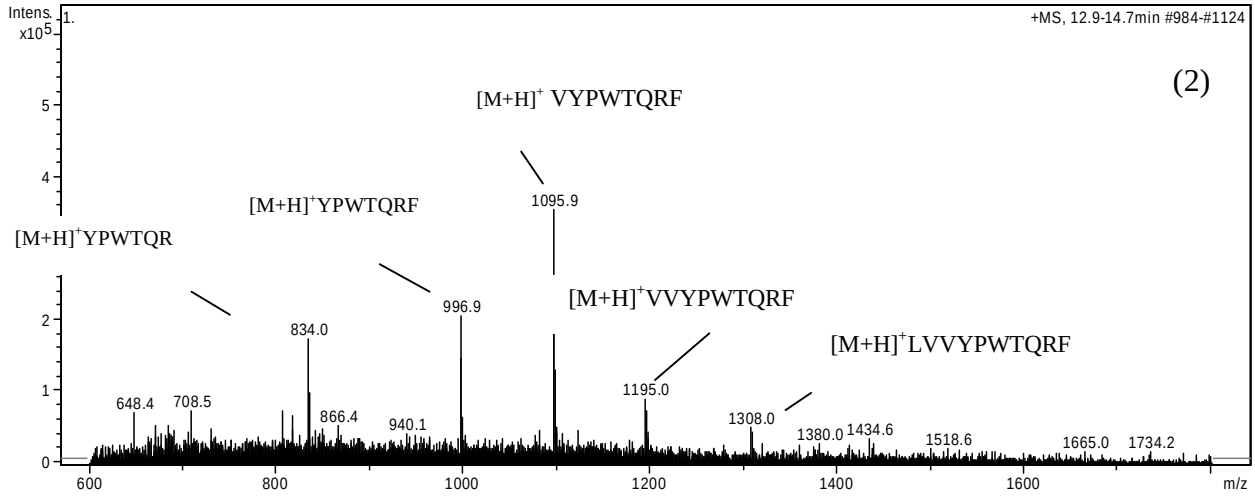


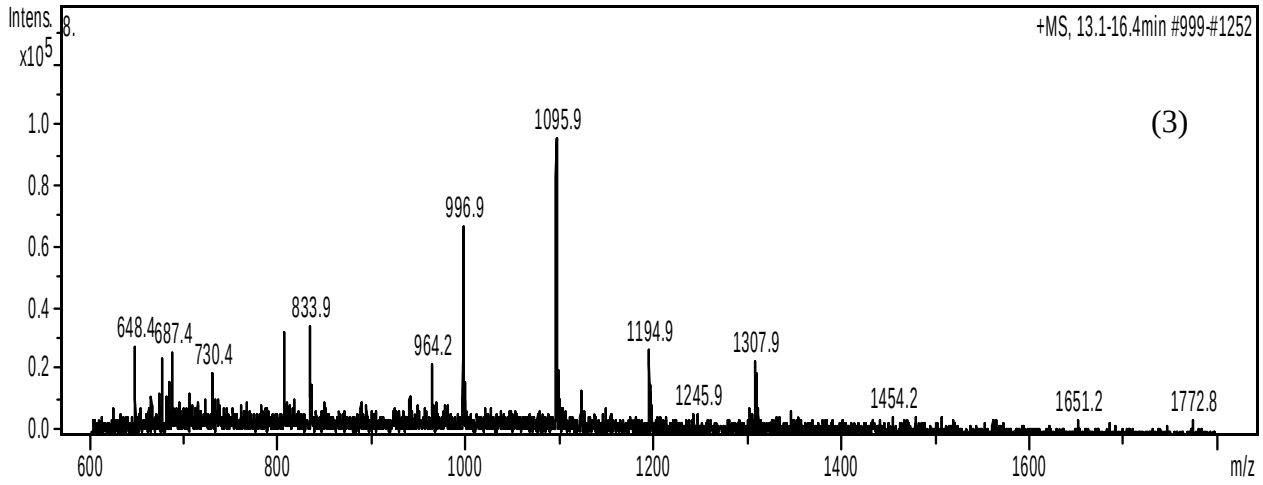
L'analyse des hydrolysats des sept autres glycohémoglobines a montré la présence des hémorphines de type 7. Les trois peptides LVVH7, VVH7 et H7 ne sont jamais présents ensembles dans le même hydrolysat. Le peptide VVH7 a été identifié dans un hydrolysat provenant d'une hémoglobine à 12,1%.

Afin de confirmer que les peptides présents dans les hydrolysats sont des hémorphines de type 7, nous les avons analysés en CL/SM. Nous avons préalablement réalisé des gammes de nos 3 peptides d'intérêt par CL/SM et vérifié l'identité des peptides produits par comparaison avec les spectres de masse des peptides synthétiques. La figure 15 montre un exemple d'analyse LC/SM d'un hydrolysat de glycohémoglobine par la cathepsine D. Après 10 minutes d'incubation, c'est le peptide LVVH7 qui est le produit majoritaire.

<u>Figure 15</u> : 1) Analyse LC/MS à 280nm de l'hydrolyse d'une glycohémoglobine (10,7%) par la cathepsine D pendant 10 minutes 2) Spectre de masse entre 12,9 et 14,7 minutes 3) Spectre de masse du peptide LVVH7 synthétique entre 13,1 et 16,4 minutes.







L'analyse CL/MS confirme que les peptides présents dans les hydrolysats sont bien des hémorphines de type 7. L'apparition des trois peptides LVVH7, VVH7 et H7 a été suivie en fonction de la durée d'hydrolyse. Quelque soit le degré de glycation, LVVH7 est toujours présent à partir de 10 minutes d'hydrolyse de l'hémoglobine avec la cathepsine D. VVH7 et H7 apparaissent respectivement à 20 minutes pour des HbA1c à 6 et 9,1% et à 30 minutes d'hydrolyse pour des HbA1c à 10,7 et 12,1%. LVVH7 est le peptide dont la présence est la plus fréquente lors de l'analyse de la population peptidique issue de l'hydrolyse des quatre hémoglobines. La suite de cette étude s'est donc focalisée sur la quantification du seul peptide LVVH7 mesurée en fonction du degré de glycation de l'hémoglobine.

2.3.2 - Quantification du peptide LVVH7 dans l'hydrolysat de glycohémoglobine

LVVH7 est le peptide qui est libéré de la façon la plus régulière et le plus abondamment lorsque nous avons identifié nos peptides d'intérêt dans les hydrolysats des huit hémoglobines glyquées. Nous avons conduit la quantification de LVVH7 par LC/MS. Comme nous avons pu l'observer dans la figure précédente (figure 14-3), le spectre de masse du peptide synthétique LVVH7 montre cinq rapports *m/z* des ions détectés : 1307,9, 1194,9, 1095,9, 996,9 and 833,9. Ces fragments correspondent à l'ion moléculaire LVVH7 protonée (1307,9), ainsi qu'au peptide fragmenté dans les formes tronquées suivantes (figure 14-2) :

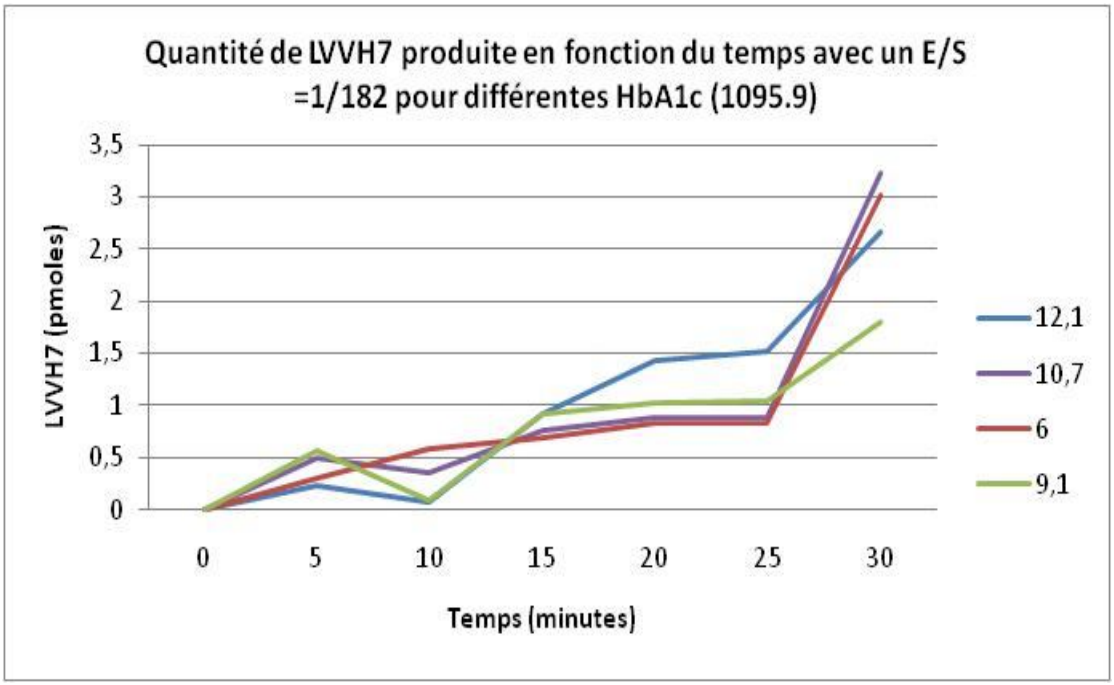
- VVH7, m/z = 1194,9
- VH7, m/z = 1095,9
- H7, m/z = 996,9
- H6, m/z = 833,9

La quantification de LVVH7 a été réalisée sur quatre hydrolyses d'hémoglobines glyquées à différents pourcentages :

- 6%
- 9,1 %
- 10,7 %
- 12,1 %

Nous avons établi des courbes de calibration sur chaque ion, soit cinq courbes de calibration au total. Nous avons retenu celle de l'ion 1095,9 pour lequel nous avons obtenu la meilleure linéarité et calculé la quantité de LVVH7 libéré. Nous avons étudié la quantité de LVVH7 libérée sur 30 minutes avec des mesures toutes les cinq minutes. La figure suivante représente l'évolution de la quantité de LVHH7 libérée en pmoles en fonction du temps pour les quatre glycohémoglobines étudiées.

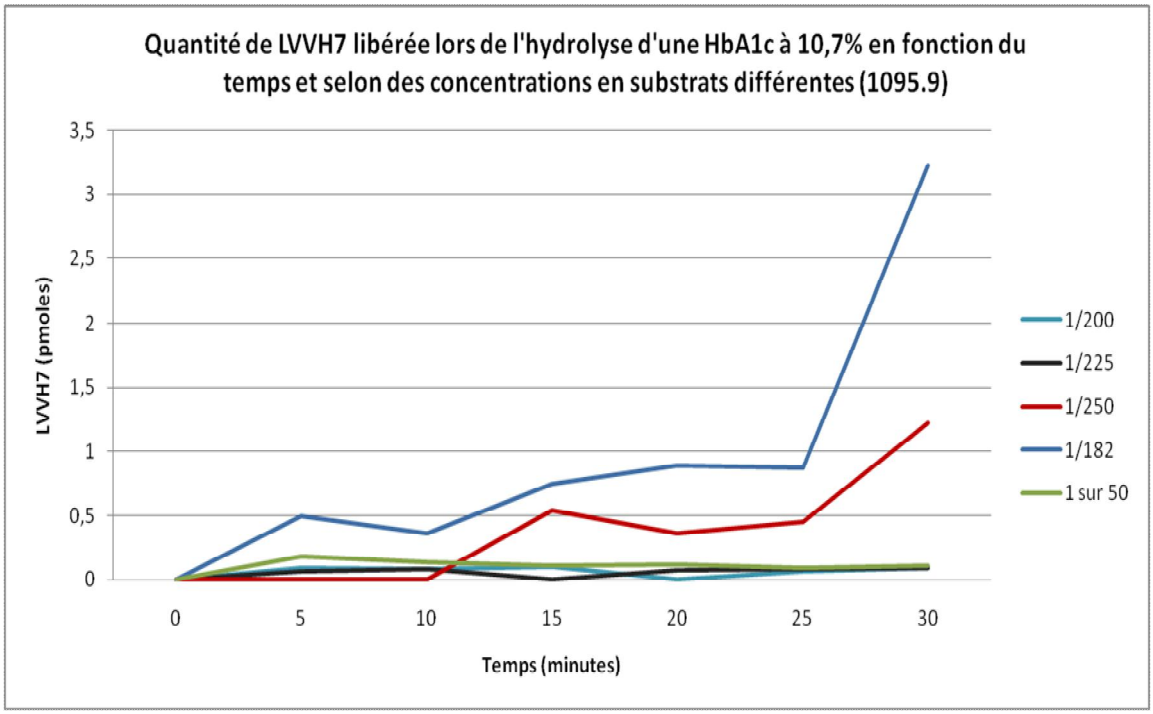
<u>Figure 16 :</u> Effet de la glycation de l'hémoglobine sur la libération de LVVH7



Sur ce graphique (figure 16), nous pouvons observer que le degré de glycation n'a pas de réel impact sur la libération de LVVH7 lorsque l'hémoglobine clivée par la cathepsine D. La libération de LVVH7 n'est pas linéaire non plus. A 10 minutes d'hydrolyse, l'HbA1c à 6% libère le maximum de LVVH7 (0,6 pmoles). A 30 minutes d'hydrolyse, la plus grande quantité de LVVH7 est libérée par l'HbA1c à 10,7%. La quantité de LVVH7 libérée est indépendante du taux de glycation quelque soit le temps d'hydrolyse.

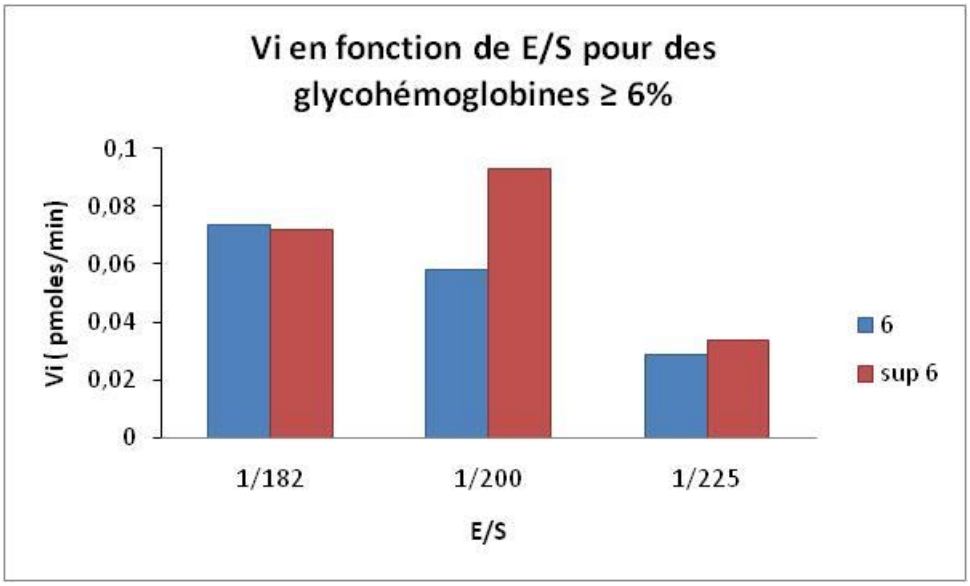
Les expériences ont été précédemment réalisées avec un rapport (Enzyme/Substrat) E/S = 1/182, ce rapport a été mis en place au laboratoire car il correspond au ratio le plus favorable à la libération d'hémorphines de type 7 à partir d'hémoglobine par action de la cathepsine D. Nous avons complété nos investigations en étudiant des rapports inférieurs et supérieurs à 1/182 afin de savoir si ces résultats étaient valables pour d'autres rapports enzyme/substrat. Pour ce faire, nous avons tout d'abord étudié les quantités de LVVH7 libérées pour chacune des quatre glycohémoglobines. La figure 17 montre les quantités de LVVH7 libérées en fonction de 5 rapports E/S pour une HbA1c à 10,7%.

<u>Figure 17 :</u> Effet du rapport E/S sur la libération de LVVH7.



Les vitesses initiales ont ensuite été calculées pour chaque type d'hémoglobine. La figure 18 représente les vitesses initiales calculées pour trois rapports E/S (1/182, 1/200 et 1/225).

<u>Figure 18 :</u> Vitesses initiales de l'hydrolyse de glycohémoglobines par la cathepsine D à différents rapports E/S



Les vitesses initiales sont augmentées pour un rapport 1/200 et 1/225 pour des glycohémoglobines supérieures à 6%, soit les hémoglobines provenant de patients diabétiques.

L'influence de la glycation de l'hémoglobine sur la libération des hémorphines de type 7 a été étudiée. Une première étude réalisée au laboratoire avait montré que la glycation *in vitro* de l'hémoglobine bovine libérait une quantité moindre en hémorphines après action de la cathepsine D. Comme peu d'études jusqu'alors n'avaient été réalisées à partir d'hémoglobine glyquée artificiellement ou non, nous avons donc décidé d'extraire cette hémoglobine directement dans le sang de patients atteints de diabète. Les hémorphines sont des peptides provenant de la dégradation cellulaire de l'hémoglobine par la cathepsine D. Si l'hémoglobine est modifiée, glycosylée dans notre

étude, nous pouvions supposer que l'enzyme pouvait agir de façon différente sur son substrat. Les résultats de cette étude n'ont montré aucune corrélation entre le taux de glycation de l'hémoglobine de patients et la libération des hémorphines de type 7 par la cathepsine D. Notre hypothèse, selon laquelle la glycation de l'hémoglobine pourrait diminuer la libération des hémorphines de type 7 et donc expliciter la diminution sérique de ces peptides chez les patients diabétiques, n'est donc pas celle à retenir. Nous pouvons dire aujourd'hui que la diminution sérique observée des hémorphines de type 7 n'est pas reliée à une dégradation altérée de l'hémoglobine par la cathepsine D.

3 – Conclusions

Cette étude fait partie du PHRC établi en 2006 entre le service de nutrition, maladies métaboliques et endocrinologie du CHU de la Timone et notre laboratoire. Plusieurs hypothèses de travail ont été émises et nous avons répondu à la plupart d'entre elles.

Nous avons confirmé la diminution des hémorphines de type 7 chez les patients diabétiques et nous avons noté une baisse plus importante chez les patients atteints de diabète de type 2. Afin de comprendre le statut sérique des hémorphines dans ce contexte pathologique, nous avons étudié les enzymes responsables du métabolisme des hémorphines de type 7 dans le même compartiment cellulaire. Cette diminution pouvait s'expliquer soit par une diminution de l'activité de l'enzyme responsable de la libération des hémorphines, la cathepsine D, soit par un hypercatabolisme, c'est-à-dire une augmentation de l'activité sérique de DDPIV et de l'ECA. Les résultats obtenus ne sont pas ceux attendus puisque l'activité de la cathepsine D est diminuée et celle de la DPPIV augmentée.

Dans une deuxième hypothèse, nous avons étudié le précurseur des hémorphines de type 7, l'hémoglobine. Les hémorphines sont des peptides libérés suite à l'action de la cathepsine D sur la chaîne β de l'hémoglobine humaine et bovine. La glycation implique un changement de structure ainsi que de fonction, et peut notamment modifier la capacité des glycoprotéines à être hydrolysées (Ahmed *et al.*, 2005). L'étude de la population peptidique libérée lors de l'hydrolyse d'hémoglobine glyquée de 6 à 12,1% a mis en évidence la présence de LVVH7, VVH7 et H7. De plus, nous avons étudié la quantité de LVVH7 libérée en

fonction du temps et du degré de glycation. Aucune corrélation n'a été relevée entre l'augmentation du taux de glycation quelque soit le temps d'hydrolyse (0 à 30 minutes).

La diminution des hémorphines de type 7 dans le sérum des patients diabétiques n'est donc pas une conséquence de la modification dans la dégradation de la glycohémoglobine par la cathepsine D. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous mesurons la concentration sérique des hémorphines. Une fois que l'hémoglobine a été dégradée par la cathepsine D, de nombreuses autres enzymes tissulaires peuvent agir sur les peptides libérés. La concentration sérique ne reflète pas forcément la concentration tissulaire des peptides. Cette constatation est appuyée par les résultats des activités enzymatiques (cathepsine D, DPPIV et ECA) qui ne corroborent pas la valeur des hémorphines de type 7 dans le sérum.

D'autres expérimentations sont nécessaires afin de comprendre par quels mécanismes la concentration en hémorphines de type 7 est diminuée chez les patients atteints de diabète. Nous avons travaillé sur une des modifications possibles de l'hémoglobine, la glycation, nous devons maintenant nous intéresser à d'autres modifications des protéines notamment celle de la nitration. En effet, l'hyperglycémie est souvent associée à un stress oxydatif mais aussi nitrosatif (Ahmed *et al.*, 2005). La génération des hémorphines peut être altérée par ces modifications. De même, l'étude pourra être complétée par la recherche des hémorphines de type 7 elles-mêmes modifiées. Nous savons que l'HbA1c provient de la liaison du glucose sur la valine en position N-terminale de la chaîne β de l'hémoglobine A. LVVH7 et VVH7 contiennent deux valines susceptibles d'être glycosylées. Une étude en masse de LVVH7 ou VVH7 associé à un glucose est donc nécessaire pour le confirmer. Dans cette même optique, il est important de souligner que la reconnaissance de notre peptide par l'anticorps 1 utilisé en ELISA peut être perturbée si les peptides sont eux-mêmes glycocylés ou nitrosylés. Enfin, afin de valider la diminution de la concentration en hémorphines de type 7 dans le sérum des patients diabétiques, il est important de rechercher si cette anomalie ne se retrouve pas dans des pathologies associées (obésité, hypertension).

Cette constatation de la diminution des hémorphines de type 7 dans le diabète nous a amenés à nous poser la question de leur rôle dans la cellule. En effet, LVVH7 est un ligand d'IRAP (Insulin-Regulated Aminopeptidase) impliqué dans la translocation du transporteur de glucose GLUT 4 dans les adipocytes. La deuxième partie de ce chapitre est consacrée à

l'étude du rôle des hémorphine de type 7 dans la signalisation insulinique et le transport du glucose.

Partie B : Etude du rôle des hémorphines de type 7 dans la translocation du récepteur GLUT4 à la membrane des adipocytes.

Les hémorphines sont multifonctionnelles et exercent leurs effets au travers de leur capacité à interagir avec des cibles biologiques variées comme l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Lantz *et al.*, 1991) ou bien le récepteur à l'angiotensine IV (Lee *et al.*, 2001) aujourd'hui reconnu comme étant un récepteur-enzyme régulé par l'insuline (IRAP) (Lew *et al.*, 2003). Parmi tous les membres de la famille des hémorphines, c'est le peptide LVVH7 qui est décrit comme le plus actif dans la littérature. Il aurait particulièrement une action inhibitrice de l'IRAP au même titre que l'Ang IV. Il a été démontré récemment que l'injection centrale de LVVH7 renforçait la mémoire spatiale et il est maintenant connu que LVVH7 est présent en grande concentration dans le système nerveux central (Moeller *et al.*, 1997). En effet, chez le rat, la stimulation des récepteurs AT4, par les peptides angiotensine IV ou LVVH7, entraîne la libération d'acétylcholine par l'hippocampe. C'est un mécanisme important par lequel l'activation de récepteurs AT4 conduit à améliorer le rendement cognitif. Les rats qui se sont vus injecter de fortes doses de LVVH7 par voie injection intracérébroventriculaire ont obtenu les meilleurs résultats dans les tests de mémoire de type labyrinthe (Lee *et al.*, 2004).

IRAP est aussi impliqué dans la réponse de la cellule à l'insuline. En effet, Waters S.B. et coll (1997) ont identifié IRAP en tant que constituant de la vésicule contenant le transporteur GLUT4. Comme ce récepteur, il est transloqué à la membrane en réponse à une stimulation insulinique.

Le lien entre GLUT4 et LVVH7 serait donc le récepteur IRAP. L'interruption de l'expression cellulaire d'IRAP chez des souris IRAP -/- provoque une baisse de 40 à 80% du taux de GLUT 4 dans les cellules des muscles squelettiques accompagnant une diminution de l'absorption de glucose stimulé par l'insuline (Keller *et al.*, 2002). Mais l'étroite association d'IRAP avec GLUT4 et son rôle dans les réponses biologiques des tissus à l'insuline ne sont pas clairement définis. Ces résultats reliant GLUT4 à IRAP et LVVH7 à IRAP, nous ont

incités à rechercher si LVVH7 pouvait influencer la translocation de GLUT 4 à la membrane. Nos études ont été réalisées sur des adipocytes humains, en raison de la présence en majorité du récepteur GLUT4 dans ces cellules.

1 - Matériels et méthodes

1.1 - Culture des adipocytes humains

La croissance du tissu adipeux résulte à la fois de la croissance des adipocytes matures et de la formation de nouveaux adipocytes à partir de cellules précurseurs d'adipocytes (préadipocytes). Le processus de différenciation des cellules précurseurs d'adipocytes est contrôlé par de nombreuses hormones. Les cultures primaires de préadipocytes permettent une bonne approche dans l'étude des mécanismes physiologiques qui contrôlent la prolifération, la différenciation et le maintien de la fonction du tissu adipeux. Afin d'obtenir des cellules au stade adipocyte, il faut passer par un stade de différenciation où les cellules cessent de se multiplier. Ensuite, les cellules sont des adipocytes matures.

Les cellules sont mises en culture à partir d'un cryotube Préadipocytes humains HWP C1P3 (30/10/2006) contenant 10^6 cellules/ml. Les préadipocytes sont cultivés dans un milieu de croissance (Preadipocyte Growth Medium C-27410 Promocell) avec 1% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Le milieu de culture est changé tous les trois jours, et les cellules sont laissées à pousser en étuve à 37°C et dans une atmosphère à 5% de CO_2 jusqu'à confluence. Dix jours après, les cellules sont cultivées dans un milieu de différenciation (Preadipocyte differentiation Medium C-27436 Promocell) avec 1% d'antibiotiques pendant 72 heures dans les mêmes conditions de développement (37°C, 5% CO_2). Enfin, les cellules sont cultivées 10 jours dans un milieu de nutrition (Adipocyte Nutrition Medium C-27438 Promocell) avec 1% d'antibiotiques. Les cellules sont cultivées en grande flasque 75 cm^2 ou en microplaques 24 puits.

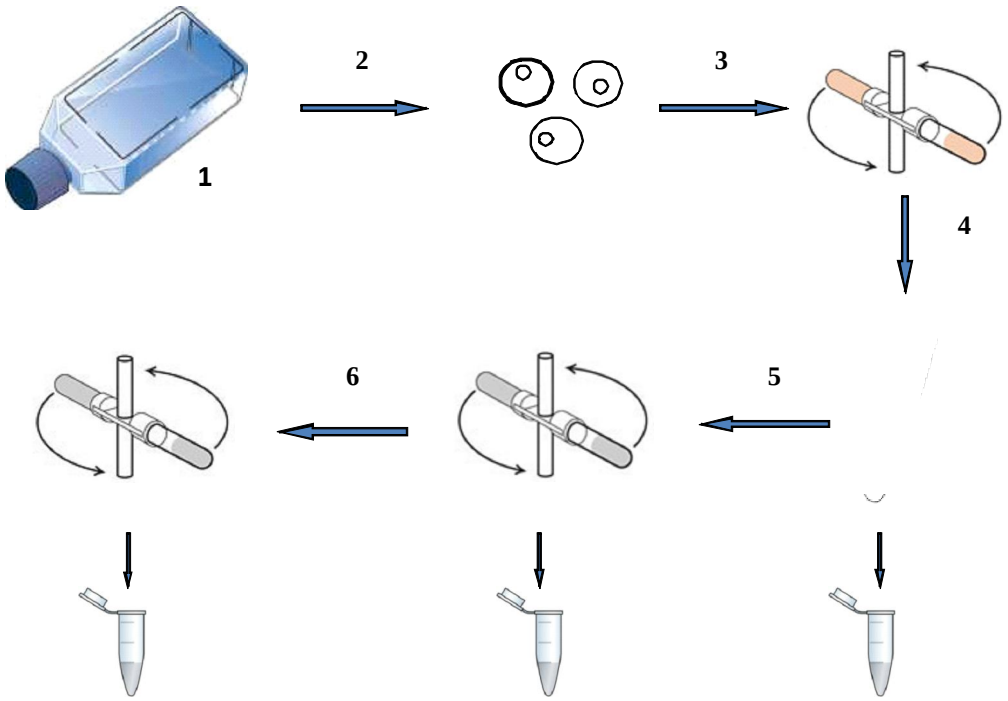
1.2 - Préparation des fractions cytosoliques et membranaires

Un protocole a été mis en place, inspiré des travaux de Demaegt et coll. (2004), afin de séparer la partie cytosolique et membranaire des cellules. Les fractions cytosoliques, membranaires et totales sont obtenues par le protocole illustré figure 19.

Les adipocytes humains sont cultivés en milieu de nutrition. Différentes conditions de culture sont mises en place afin d'étudier le rôle de LVVH7 et/ou de l'insuline. Quatre types de culture sont réalisés :

- Témoins adipocytes cultivés en milieu de nutrition,
- Insuline, ajout d'insuline humaine (1µg/ml) pendant 2h,
- LVVH7 à 10^{E}-6M pendant 2h,
- LVVH7 (10^{E}-6M) et insuline 1µg/ml pendant 2h.

Figure 19 : Représentation schématique de la méthode de séparation des fractions cellulaires



1 : Culture d'adipocytes humains (8 flasques par condition)

2 : Décollement des cellules au grattoir

3 : Centrifugation à 500g, 5min, 20°C

4 : Broyage des culots cellulaires au potter (480 rpm, 5 minutes, 20°C)

5 : centrifugation à 30000 g (séparation FC et FM), resuspension des culots dans du Tris HCl

6 : centrifugation à 30000 g (lavage FM)

L'homogénat total et les différentes fractions sont aliquotés en tubes de 1mL et stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

.

1.3 - Analyse des fractions cellulaires

1.3.1 - Dosage des protéines

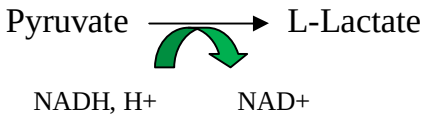
Le test s'effectue en microplaques 96 puits. Dans chaque puits, 25µl d'échantillons ont été mis en contact avec 200 µl de kit réactif (50 :1 acide bicinchoninique : Cu^{2+}).

Chaque échantillon est dosé 3 fois. Un blanc a été mesuré en remplaçant les 25µl d'échantillons par 25µl d'eau distillée. L'absorbance a été mesurée à 562nm en lecteur microplaque (VersaMax Reader tunable), après une incubation à 60°C pendant 30 min. Le blanc est retiré de la mesure des échantillons pour obtenir l'absorbance des échantillons.

1.3.2 - Caractérisation des fractions par tests enzymatiques

Cette étape a été réalisée afin de valider le fractionnement cellulaire que nous avons préalablement entrepris. La LDH (Lactase déshydrogénase) est une enzyme exclusivement cytosolique :

La LDH catalyse la réaction suivante :



Le dosage consiste en la détermination cinétique de l'activité de la LDH avec suivi de l'absorbance du NADH à la longueur d'onde de 340 nm.

La réaction est réalisée dans une cuve en quartz de 3 ml dans cet ordre :

- 1ml de tampon phosphate 0,1M pH=7
- 100 µl de Pyruvate à 0,74 mM
- 5 µl de Pent-2-one
- 200 µl d'extrait cellulaire.

Le blanc est fait à 340 nm sous agitation constante dans une enceinte thermostatée à 30°C. Une fois le blanc effectué, on ajoute à la cuve 150 µl de NADH, H+ à 2mg/ml et le milieu est homogénéisé par une série de trois agitations. Puis une cinétique est effectuée à 340 nm en prenant les mesures toutes les 30 secondes pendant 30 minutes (U Perkin Meyer 620).

1.3.3 - Détection de GLUT4 par Western Blot dans les fractions

Une électrophorèse de type SDS-Page est effectuée ; le gel de concentration est à 5%, et le gel de séparation est à 10%. Les échantillons sont dilués dans le tampon de charge (glycérol, SDS, bleu de bromophénol) avant d'être déposés dans les puits. La migration se fait à 50 volts jusqu'au gel de séparation pour tasser les protéines, puis à 150 volts dans le gel de séparation. Une fois la migration terminée, le gel est trempé 30 minutes dans le tampon de transfert (25mM Tris pH=8,3, 192 mM glycine, 20% méthanol), ainsi que les deux éponges, les deux papiers Wattman et la membrane en nitrocellulose (Ready gel blotting Sandwiches 0,45µm Nitrocellulose BIO-RAD).

Ensuite les éponges, le gel, les papiers Wattman et la membrane sont superposés dans la cellule (Mini trans-blot Electrophoretic transfer cell BIO-RAD) dans cet ordre : une éponge, un papier Wattman, la membrane, le gel, un papier Wattman et une éponge.

La cellule est plongée dans la cuve remplie de tampon de transfert et la migration est lancée à 100 V (ou 350mA) pendant 1h. Les protéines chargées - vont migrer vers la borne + et donc passer du gel à la membrane. Une fois la migration effectuée, la membrane est rincée 3 fois 5 minutes au PBS-Tween 20 0,1%, et saturée 1h avec du PBS-Tween 20 0,1%/0,5% BSA. La membrane est de nouveau rincée 2x5min au PBS-Tween 20 0,1% et incubée 16h

avec le premier anticorps Anti-Glucose Transporter-4 Rabbit pAb (Calbiochem Cat. N° 400064) dilué à 1/100 dans du PBS-Tween 20 0,1% à 4°C

Après l'incubation, la membrane est rincée 3x5min au PBS-Tween 20 0,1 %, saturée 2x10min au PBS-Tween 0,1%/5% BSA puis rincée une nouvelle fois 2x5min au PBS-Tween20 0,1%. Elle est ensuite incubée avec le deuxième anticorps pendant 1h anticorps anti IgG de lapin couplé à la peroxydase (Beckman Coulter, PN IM0831) dilué au 1/1000 dans du PBS-Tween20 0,1%. La membrane est rincée 3 x 5min au PBS-Tween20 0,1% puis incubée dans un dernier bain de TMB (3,3', 5,5' Tetramethylbenzidine SIGMA) le temps nécessaire pour que des bandes bleues apparaissent. Une deuxième révélation est utilisée, la chimioluminescence (kit ECL reaction, Amersham). La peroxydase marquant l'anticorps secondaire oxyde le luminol en présence de peroxyde d'hydrogène. Le luminol excité revient à son état initial en émettant une lumière à 428 nm détectée par un film photographique (Hyperfilm ECL, Amersham). La membrane est mise au contact du luminol pendant une minute, puis avec le film photographique pour une durée de 30 minutes.

1.4 - Etudes conduites sur cultures de cellules adipocytaires

1.4.1 - Suivi de l'activité membranaire d'IRAP

Pour mesurer l'activité de cette enzyme, un substrat chromogène est utilisé, la L-Leucine-nitroaniline. La partie extracellulaire d'IRAP va cliver ce substrat et libérer ainsi de la p-nitroaniline qui va colorer le milieu. Plus l'absorbance est élevée, plus l'activité de l'enzyme est importante.

$$\text{L-Leucine p-nitroaniline} + H_2O \xrightarrow{\text{IRAP}} \text{L-Leucine} + \text{p-nitroaniline}$$

Ce test, inspiré des travaux de Lausten et coll (2001), est effectué sur une culture d'adipocytes humains en microplaque 24 puits. L'influence de l'insuline et de LVV7 est étudiée.

- ***Influence de la concentration en insuline sur l'activité IRAP***

Ce test est effectué dans une plaque 24 puits où des adipocytes sont cultivés en milieu de nutrition depuis une semaine environ. Sur ces 24 puits, 8 contiennent 100 µl de milieu de nutrition, ce sont les puits témoins, 8 sont incubés 3 heures avec 100 µl d'insuline à 10µg/ml diluée dans du milieu de nutrition, et les 8 derniers sont incubés 3 heures avec 100 µl d'insuline à 1 µg/ml diluée dans du milieu de nutrition.

Après 3 h d'incubation à 37°C et 5% CO_2, chaque catégorie de puits est incubée avec le substrat L-Leu-pNA (25µM et 1,5mM préparé dans de l'eau distillée).

Un blanc est effectué en mélangeant 50 µl de milieu de nutrition et 50 µl de solution de substrat (soit à 25 µM, soit à 1,5 mM).

Les mesures d'absorbance se font à 405 nm par lecteur microplaque aux temps t = 15, 30, 60, 90 minutes, en prélevant 100µl du milieu de la plaque 24 puits qui sont placés dans les puits d'une plaque 96 puits. La plaque 24 puits contenant les cellules est replacée dans l'incubateur CO_2 entre chaque mesure. Les mesures se font 3 fois pour chaque condition, en prélevant à chaque fois dans un puits différent.

Influence de l'insuline et de LVVH7 sur l'activité IRAP

Ce test est effectué dans une microplaque 24 puits où des adipocytes sont cultivés en milieu de nutrition depuis une semaine environ.

Sur ces 24 puits :

- 6 sont des puits Témoin (900 µl milieu de nutrition)
- 6 sont mis en présence d'insuline (800µl milieu de nutrition + 100 µl insuline 1µg/ml)
- 6 sont incubés avec LVVH-7 (800 µl milieu de nutrition + 100 µl LVVH7 à 10^{-6} M)
- 6 sont mis en présence à la fois d'insuline et de LVVH-7 (700µl milieu de nutrition + 100µl insuline 1 µg/ml + 100 µl LVVH-7 10^{-6}M)

La microplaque est incubée 2h à 37°C dans une atmosphère à 5% CO_2. Ensuite le substrat est ajouté dans chaque puits (100 µl de L-Leucine Nitroanilide 1,5mM).

Les mesures d'absorbance se font à 405 nm par un lecteur de microplaque de type Thermomax (Molecular Devices, modèle MWG-Biotech) aux temps t = 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90 minutes, en prélevant 100µl du milieu de la plaque 24 puits placés dans une plaque 96 puits. La plaque 24 puits contenant les cellules est remise à l'incubateur entre chaque mesure.

1.4.2 - Immunodétection du récepteur GLUT4

Nous avons cherché à identifier le récepteur GLUT4 sur une culture d'adipocytes humains. Les adipocytes matures sont cultivés dans des chambres 4 puits en milieu de nutrition pendant une semaine. Chaque chambre est incubée 2h à 37°C/ 5% CO_2 soit avec de l'insuline (1 µg/ml), soit avec le peptide LVVH-7 (10^{-6} M), soit avec les deux combinés, dilués dans du milieu de nutrition. Une fois l'incubation terminée, le milieu est retiré et les cellules sont rincées avec du TBS (PBS+ Tris HCl 0,05M) et laissées à sécher sous PSM, le couvercle enlevé, pendant 20h. Les cellules subissent différents traitements décrits dans le tableau20. Une fois les plaques séchées, elles sont observées au microscope (Nikon Eclipse TS 100).

<u>Tableau 20</u> : Etapes permettant de révéler la présence du récepteur GLUT4 à la surface des adipocytes humains.

Acétone	200 µL	incubation	5 min
Eau distillée	200 µL	réhydratation	5 min
TBS-BSA 1%	200 µL	saturation	5 min
TBS	200 µL	réhydratation	5min
Ac Anti-Glucose Transporter-4 Rabbit pAb Dilution 1/100 à 1/200 dans du TBS-BSA 1%	200 µL	incubation	30 min
Tampon de lavage (Wash Buffer 3X ref S3006 (Carpinteria)	200 µL	incubation	5 min
TBS-BSA 1%	200 µL	saturation	5 min
Biotynylated anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulins dans du PBS	200 µL	incubation	10 min
Tampon de lavage 3X	200 µL	rinçage	5 min
TBS	200 µL	incubation	5 min
Sraptavidine conjuguée avec horseradish peroxidase dans PBS contenant carrier protéine et agent antimicrobien (Carpinteria, USA)	200 µL	incubation	10 min
TBS	200 µL	rinçage	5 min
Liquid DAB + Substrate Chromogen System réf K3467 (Carpinteria, USA)	200 µL	incubation	30 min
Eau distillée	200 µL	rinçage	5 min
Solution d'hématoxyline réf S3301	200 µL	incubation	5 min

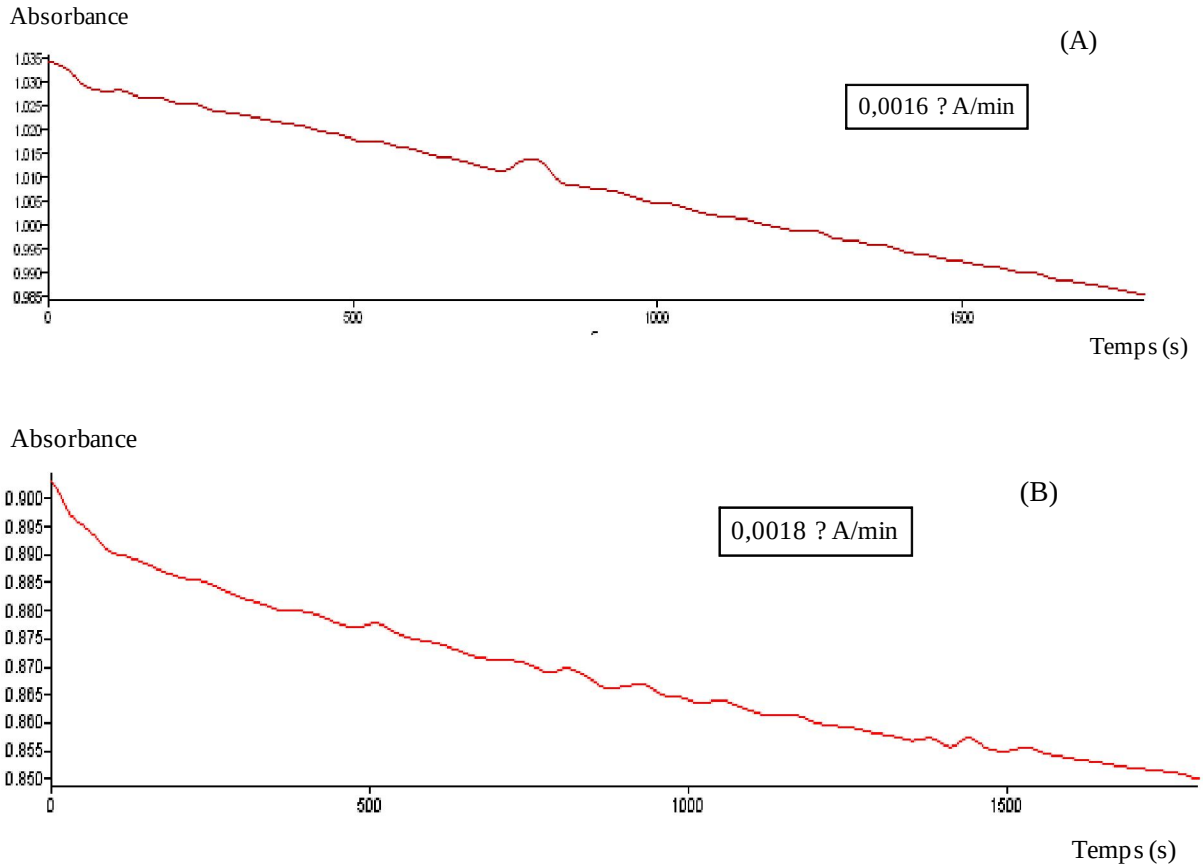
2 - Résultats et discussion

2.1 - Validation du protocole de fractionnement mis en place

Nous cherchons à mettre en évidence la présence des récepteurs GLUT4 à la surface des adipocytes et à déterminer si le peptide LVVH7 joue un rôle sur la translocation de ce récepteur à leur surface membranaire. Nous avons donc testé deux des trois fractions récupérées : FT et FC.

Afin de confirmer la FC, nous avons testé l'activité enzymatique de la LDH, enzyme exclusivement cytosolique, et nous l'avons comparée à l'activité contenue dans la FT. La figure 20 montre l'évolution de l'absorbance à 340 nm pour la FC et la FT. Ainsi, nous avons pu constater que l'absorbance, représentant la présence de NADH dans la fraction, diminue. La LDH est donc bien active dans les deux fractions.

<u>Figure 20:</u> Evolution de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps pour la FC (A) et la FT (B)



Ces deux courbes ont permis de calculer la valeur de l'activité enzymatique de la LDH dans chacune des fractions, d'après la formule suivante :

$$AE = \frac{\left(\frac{\Delta A}{\min} . fd . Vreac . 10^6\right)}{(\varepsilon . Vech. l)}$$

AE est l'activité enzymatique par millilitre en UI/ml ($\mu mol.min^{-1}.ml^{-1}$)

ΔA/min est la différence entre $\Delta A_{échantillon}$/min et ΔA_{blanc}/min

Fd est le facteur de dilution de l'échantillon

L est la distance parcourue par le rayon dans la solution en cm

V_{ech} est le volume de l'échantillon (ml)

ε correspond au coefficient d'extinction molaire en $cm^{-1} \cdot M^{-1}$ du substrat

V_{reac} est le volume réactionnel (ml)

La caractérisation des fractions membranaires et cytosoliques par la mesure de l'activité LDH/ADH a permis de valider le protocole appliqué pour la séparation des fractions cytosoliques des fractions membranaires. Comme le montre le tableau 21, la fraction cytosolique est pure à 88% (rapport FC/FT). Il permet d'obtenir des pools de protéines caractéristiques de chaque fraction.

<u>Tableau 21</u> : Activité enzymatique de LDH dans la FC et la FT

Type de fraction	Activité enzymatique (UI/ml)
FC	11,704
FT	13,167

.

D'après ces résultats, il semble que l'utilisation du grattoir pour décoller les cellules suivi de celle du Potter pour les broyer, évitant ainsi l'usage de protéases et de détergent, sont efficaces pour récupérer et lyser totalement les cellules. L'utilisation de condition de centrifugation à 30 000 g semble également suffisante, permettant de se passer d'une ultracentrifugation. Les différentes fractions récupérées sont conservées afin de procéder à l'identification du récepteur GLUT4 par Western Blot.

2.2. - Identification du récepteur GLUT4 à la surface des adipocytes

Afin de comprendre l'influence de LVVH7 sur la translocation de GLUT4 à la surface membranaire, nous avons choisi de réaliser deux types d'expérimentation :

- Détection du récepteur par Western Blot à partir de fractions cellulaires
- Mise en évidence par immunocytochimie.

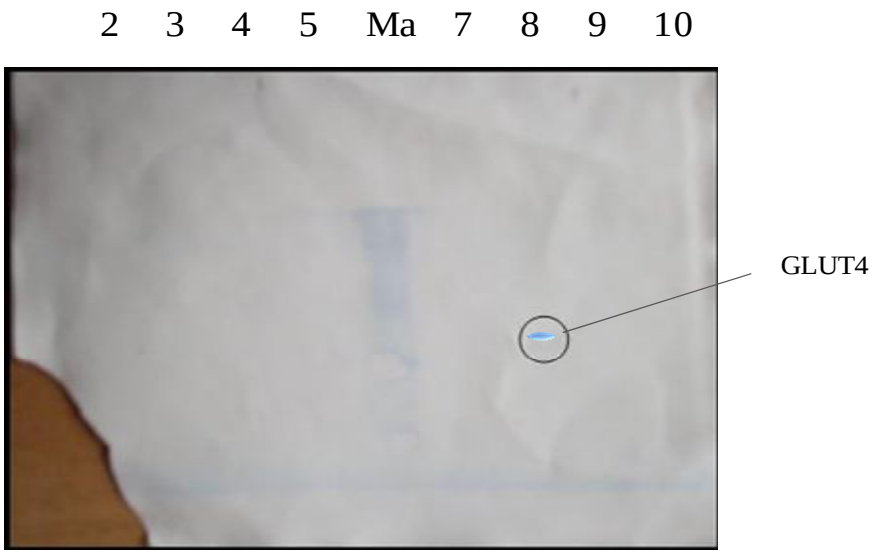
2.2.1 - Détection de GLUT4 par Western Blot

De nombreux Western Blot ont été réalisés avec les différents échantillons de fractions cellulaires. Nous avons cherché à repérer GLUT4 dans la FT et la FM et à regarder l'influence de l'incubation de LVVH7 et/ou de l'insuline sur sa translocation. Au cours de ces manipulations, plusieurs dilutions d'anticorps ont été testées : (1/500), (1/400) pour l'anticorps 1 (Ig G de lapin anti GLUT4 humain) et (1/25000), (1/10000), (1/1000) pour

l'anticorps 2 (Ig de souris anti IgG de lapin couplé à la HRP). La révélation a été réalisée soit par coloration au TMB soit par chimioluminescence. La limite de cette méthode est la quantité de protéines. En effet, nous recherchons un récepteur parmi une grande quantité de protéines. Finalement, GLUT4 a pu être visualisé dans la fraction cytosolique de la condition « Insuline + LVVH7 ». Les protéines GLUT4 ont pu être visualisées avec une dilution d'anticorps 1 anti-GLUT4 de d1/200 et de 1/10000 en anticorps secondaire avec révélation au TMB (figure 21).

<u>Figure 21:</u> Plan de charge des protéines transférées sur une membrane de nitrocellulose (anticorps 1 : 1/200 et anticorps 2 : 1/10000)

Echantillon	TEMOIN mb	TEMOIN cyt	INSULINE mb	INSULINE cyt	M	INSULINE + LVVH7 mb	INSULINE + LVVH7 cyt	LVVH7 mb	LVVH7 cyt
N°de puits	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Quantité en protéines totale en µg	22,8	22,08	31,84	31,68		5,76	14,72	19,68	18,72



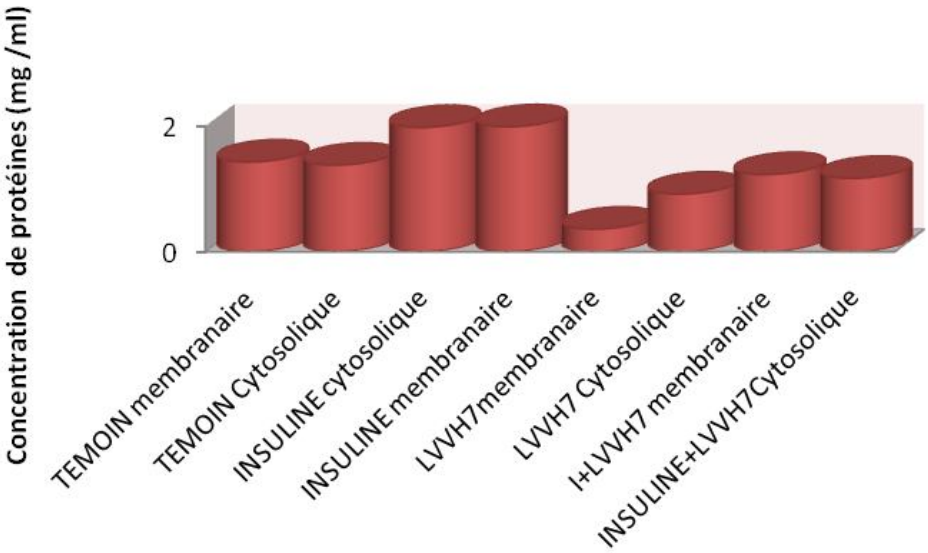
Ma : Marqueur protéique de masse moléculaire
(Broad Range Markers : sc-2361, Santa Cruz Biotechnology)

Les protéines sont visualisées sous forme de bandes colorant en bleu la membrane de nitrocellulose. La bande centrale est celle correspondant au marqueur. La tache cerclée représente le transporteur GLUT4 repéré dans la FC d'adipocytes cultivés avec LVVH7 et l'insuline humaine. Aucune bande n'est visible dans la FC des adipocytes témoins alors que la quantité en protéines est supérieure à celle de la FC des adipocytes mis en contact avec de l'insuline et de LVVH7.

Afin de connaître le rôle de LVHH7, nous avons étudié son influence seul à une concentration de 1 µM, concentration physiologique où l'on retrouve les hémorphines (cf. : concentration sérique de contrôles, C = 5,635 µM, lors de notre étude partie A du chapitre 1). Au vu des résultats précédents, la présence de LVVH7 dans le milieu ne semble pas influer sur la présence de GLUT4 dans les adipocytes. En revanche, lorsque les cellules sont incubées avec LVVH7 et de l'insuline à 1µg/ml, une révélation de GLUT4 est observée par western blot. Dans ce contexte, étant donné que le milieu des adipocytes en nutrition contient déjà de l'insuline à 0,5 µg / ml milieu, les cellules sont donc cultivées avec une concentration en insuline égale à 1,5 µg/ml. De même, lorsque les adipocytes sont cultivés en milieu de nutrition avec ajout d'insuline à 1µg/ml, aucune bande n'est révélée sur la membrane de nitrocellulose. Pourtant, la quantité de protéines est plus élevée dans cette fraction par rapport à la FC. D'après ces résultats préliminaires, il semble qu'un effet synergique existe entre LVVH7 et l'insuline qui permettrait une augmentation de l'expression de GLUT4 dans la fraction cytosolique. En revanche, nous n'avons pas montré que la présence de LVVH7 dans le milieu de culture augmentait la translocation de GLUT4 à la membrane.

La principale limite de cette étude se situe dans la quantité de matière nécessaire afin de détecter la présence du récepteur dans les adipocytes. En effet, la culture de cette lignée est longue, au total 23 jours de culture. De plus, nous avons réalisé les cultures en flasques de 75 cm^2, et nous avons amplifié les adipocytes au maximum jusqu'à 8 flasques par condition (soit 32 flasques au total). La figure 22 représente les quantités de protéines des différentes fractions après lyophilisation.

<u>Figure 22:</u> Histogramme représentant les quantités de protéines finales présentes au niveau des fractions protéiques lyophilisées issues des adipocytes dans différentes conditions de culture.



Les concentrations en protéines dans chacun des échantillons varient entre 0,4 et 2,5 mg/ml après lyophilisation. Le volume maximum de dépôt dans un puits pour une électrophorèse réalisée selon notre protocole est de 20µL (15µL d''échantillon et 5µL de tampon de charge). Comme le montre la figure 20, nous avons déposé au maximum de 31,84 µg. Afin de se libérer de cette limite concernant la quantité de matière à utiliser, nous pourrions envisager de faire de la culture primaire d'adipocytes de rat, ce type de culture nous permettrait d'obtenir des cellules en plus grande quantité.

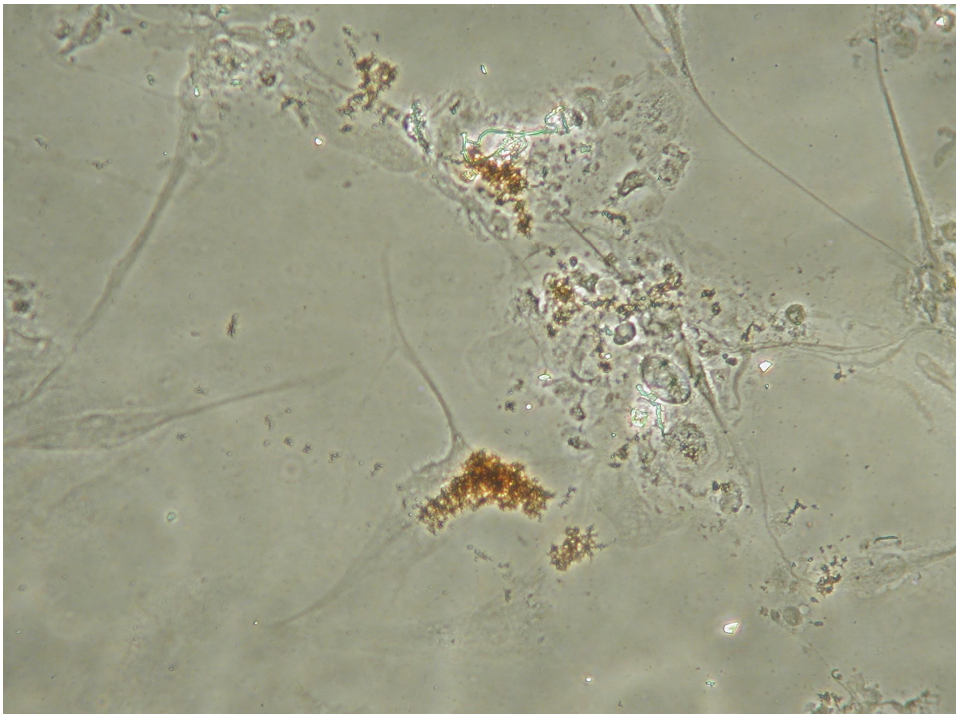
2.2.2 – Détection par immunocytochimie

L'immunocytochimie permet de révéler et de cibler une molécule biologique à l'échelle cellulaire grâce à des anticorps spécifiques. Nous avons réalisé ce test sur les adipocytes matures, dans les quatre conditions de culture initialement présentées (témoin, insuline, LVVH7 et insuline/LVVH7), dans le but de visualiser les différences de distribution de GLUT4 entre le cytosol et la membrane.

Nous avons pu mettre en évidence la présence du récepteur GLUT4 dans les quatre conditions. En revanche, aucune différence notable n'a pu être établie entre les différentes

conditions de culture. En effet, comme le montre la figure suivante, le récepteur GLUT4 est bien présent dans les adipocytes. Il est présent à la fois sur la membrane mais aussi dans le cytosol (figure 23).

<u>Figure 23:</u> Marquages immunocytochimiques de GLUT4 dans les adipocytes humains en condition témoin, grossissement x400.



GLUT4 est marqué par l'anticorps Anti-Glucose Transporter-4 Rabbit, d100.

GLUT4 est présent dans les adipocytes humains lorsqu'ils sont différenciés, le marquage ne nous permet pas de discuter du rôle de LVVH7 dans la translocation de GLUT4 à la membrane.

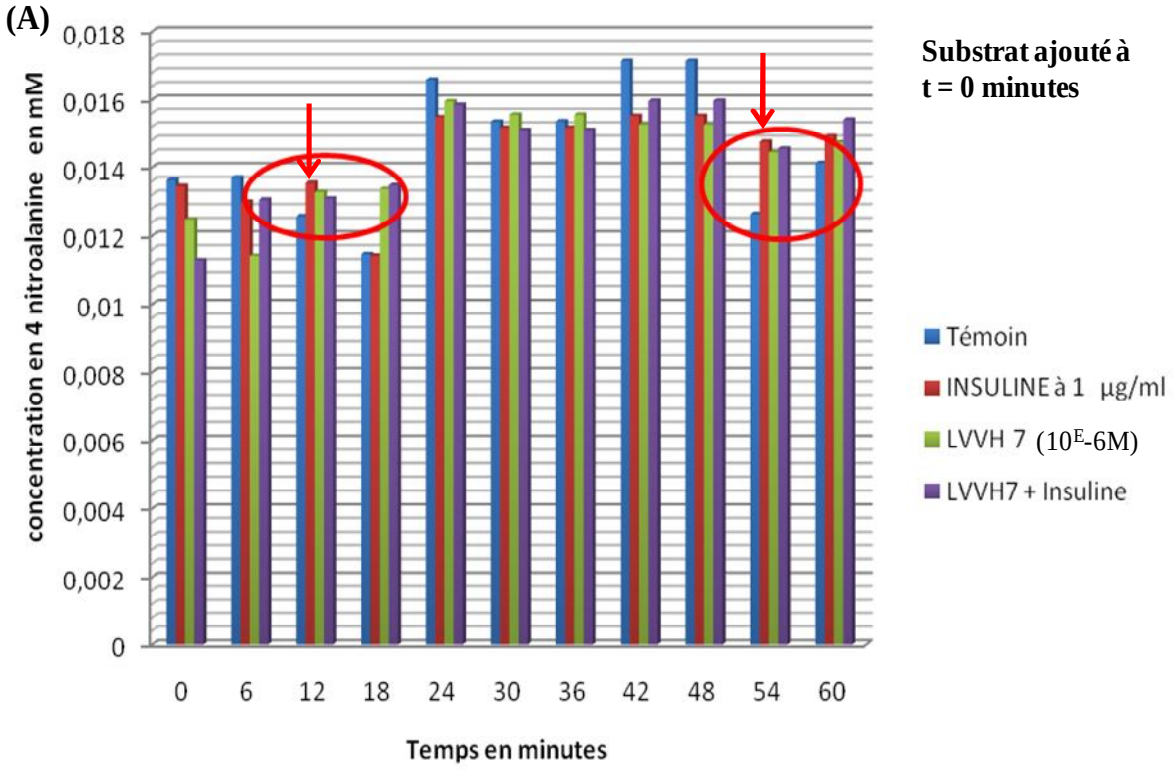
Dans la continuité de ces travaux, nous avons décidé d'étudier l'activité enzymatique extracellulaire d'IRAP dans différentes conditions de culture.

2.3 – Etude de l'activité du récepteur IRAP à la membrane des adipocytes

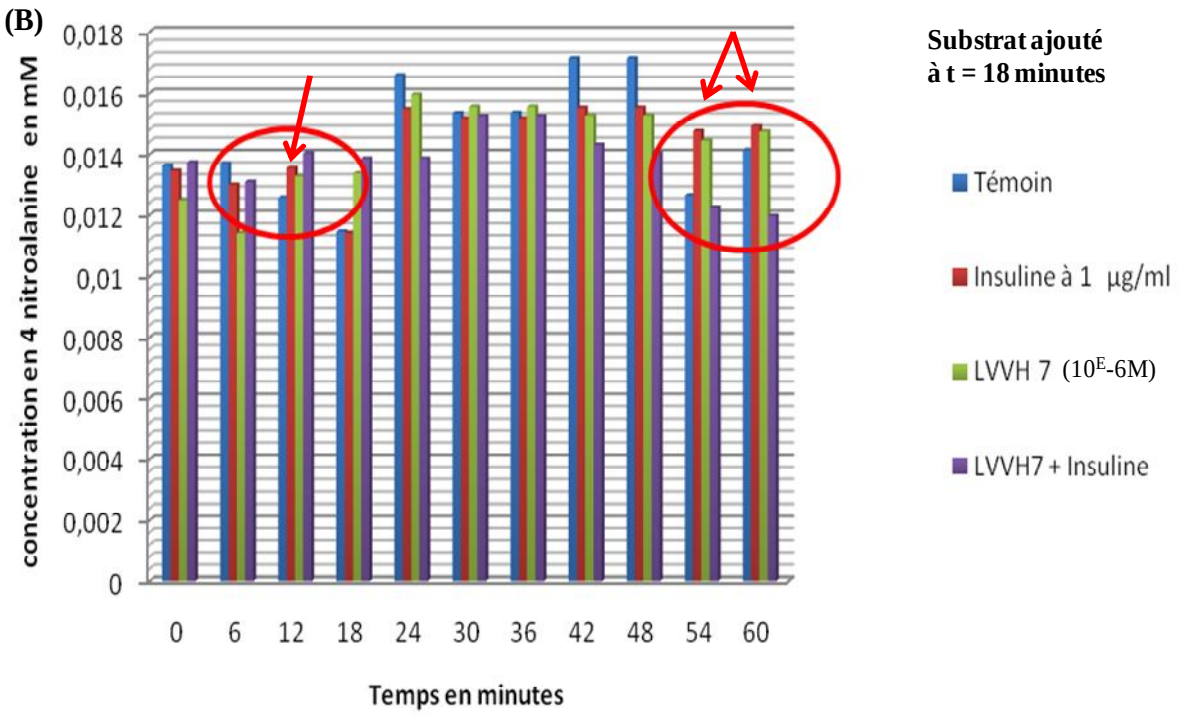
L'insuline assure la translocation simultanée à la membrane de GLUT4 et de l'IRAP. Nous avons suivi l'évolution de l'activité IRAP en fonction des différentes conditions de culture. Ce test a pour but de déterminer si le peptide LVVH7 a un effet sur l'activité extracellulaire d'IRAP, avec ou sans insuline. Nous avons utilisé le substrat L-Leu-pNA, substrat le plus adapté selon Laustsen PG et coll (2001), qui est clivé par la partie extracellulaire de l'aminopeptidase. L'activité de l'enzyme est suivie en fonction de la concentration en p-nitroaniline libérée.

Un suivi de l'activité, en présence d'insuline et de LVVH7, a été établi sur une heure. Durant ce test, le substrat a été incorporé à différents temps (T= 0, 18, 60 minutes) afin d'avoir une indication sur la cinétique d'action des hémorphines. La figure 24 montre la libération de 4 - nitroaniline sur 60 minutes pour l'incorporation de L-Leu-pNA à trois temps différents.

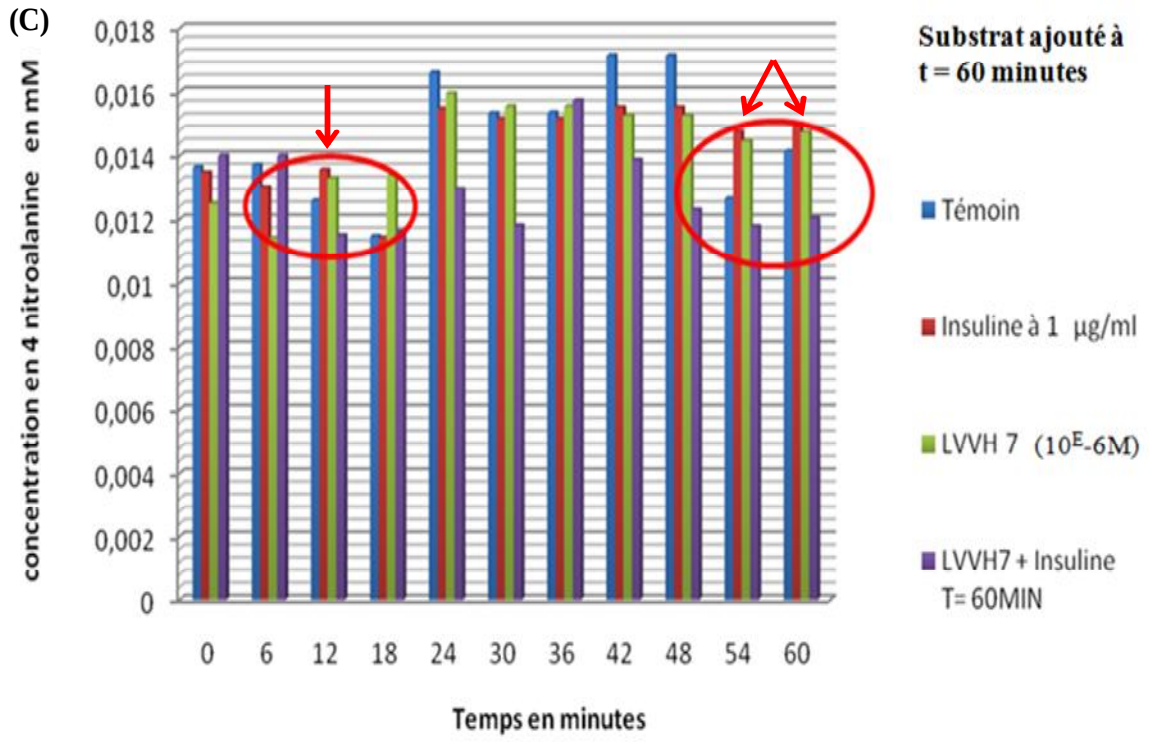
<u>Figure 24:</u> Histogrammes représentant de l'évolution de la concentration en nitroalanine pour les quatre conditions de culture à différents temps d'incubation du substrat (A) t = 0 minutes (B) t = 18 minutes et (C) t= 60 minutes.



A t = 12 min, le substrat est hydrolysé de façon plus importante lorsque les adipocytes sont stimulés par de l'insuline à 1µg/ml comparé à des conditions témoins de culture. On remarque que le même phénomène est présent à t=54 min. La condition insuline seule libère du 4-nitroaniline en plus grande quantité lorsque le substrat est ajouté à t=0 min.



A t = 12min, l'ajout de LVVH7, insuline ou les deux libèrent plus de 4-nitroaniline. A t= 54 et 60 min, le même constat est fait pour des cultures contenant de l'insuline à 1µg/ml ou LVVH7 à 10^{E}-6M.



Lorsque le substrat est ajouté à t = 60 minutes, l'évolution de la libération du 4-nitroaniline est la même. A 12 min, la condition d'incubation avec l'insuline ou avec LVVH7 montre une hydrolyse supérieure du substrat. A 54 et 60 minutes de réaction, les résultats montrent la même évolution.

Cette série de graphiques montrent l'influence de l'ajout d'insuline ou de LVHH7 dans le milieu de culture sur l'hydrolyse du substrat L-Leu-pNA. L'effet synergique de l'insuline et de LVVH7 existe lorsque le substrat est ajouté à t = 0 min (Figure 24-A), il peut être considéré comme supérieure ou celui de l'insuline ou de LVVH7. En revanche, à l'ajout du substrat à t = 18 et 60 min, cet effet synergique disparaît (figure 24- B et C).

Ces expériences visaient à préciser l'influence du peptide LVVH7 sur l'activité enzymatique d'IRAP. IRAP a été identifié en premier lieu dans les adipocytes et les cellules musculaires squelettiques (Keller *et al.*, 1995). De plus, IRAP et GLUT4 sont colocalisés dans une même vésicule intracellulaire et sont transloqués à la membrane à l'issue de la stimulation insulinique (Bryant *et al.*, 2002). Si LVVH7 agit sur l'activité extracellulaire

d'IRAP, alors le peptide pourrait avoir une action sur la translocation d'IRAP à la membrane et donc indirectement sur la translocation du récepteur GLUT4. Les résultats obtenus montrent que LVVH7 a une action sur l'activité d'IRAP à la membrane lorsqu'il est ajouté au milieu de culture à l'insuline. En revanche, l'action synergique de LVVH7 et de l'insuline diminue l'activité d'IRAP à la membrane. LVVH7 a un effet sur l'activité extracellulaire d'IRAP, les résultats tendent à montrer qu'il augmente son activité mais de façon moins prononcé que l'insuline (figure 24-C).

3 - Conclusions

Cette deuxième partie est consacrée à l'étude de l'influence du peptide LVVH7 sur le mécanisme de translocation de GLUT4. Nous avons recherché ce rôle des hémorphines dans la cellule adipocytaire connue pour exprimer à sa surface le récepteur au glucose GLUT4. En effet, des études précédentes conduites sur cellules cérébelleuses de mouton ont montré que LVVH7 est un ligand endogène d'IRAP (Moeller *et al.*, 1997).

Le diabète est une maladie dans laquelle un trouble de l'utilisation du glucose par l'organisme est observé, consécutif à un manque d'insuline ou d'une résistance des tissus à l'insuline. Nous avons émis l'hypothèse que LVVH7 pourrait avoir un rôle sur la translocation de GLUT4 à la membrane par l'intermédiaire d'IRAP. En effet, étant donné le taux sérique anormal des hémorphines de type 7 chez les diabétiques et du rôle de ce récepteur dans la régulation des taux de glucose, nous avons cherché à savoir si ces peptides pouvaient être impliqués dans la régulation de l'entrée de l'insuline dans les cellules.

Les tests enzymatiques sur les cultures cellulaires indiquent que l'activité extracellulaire d'IRAP est augmentée en présence d'insuline et fortement diminuée en présence à la fois d'insuline (1µg/ml) et de LVVH7 (10^{-6}M). De plus, en présence de LVVH7 seul à 10^{-6}M, la quantité de 4-nitroaniline libérée est supérieure à celle du témoin. Les résultats ne montrent pas qu'il existe une activité combinée permettant d'augmenter significativement l'activité extracellulaire de l'aminopeptidase. Les concentrations utilisées en LVVH7 (10^{-6}M) sont les mêmes que celles détectées dans le sérum humain, on peut donc penser que cette activité détectée pendant le test est celle qui existe réellement dans l'organisme.

Le lien entre l'activité aminopeptidase d'IRAP et l'expression de GLUT4 n'est pas encore complètement élucidé. Au vu des résultats préalablement discuté, il est possible de penser que LVVH7 pourrait avoir un effet sur l'expression de GLUT4 (soit en augmentant la translocation, soit en augmentant l'effet de l'insuline sur IRAP). Malheureusement, notre test enzymatique ne permet pas de savoir si cette évolution dans l'activité d'IRAP est due à une diminution de la vitesse de catalyse des récepteurs IRAP déjà présents au niveau de la membrane, ou à une évolution de la translocation cytosol/membrane des vésicules contenant IRAP. Pour ce faire, il faudrait mesurer l'expression d'IRAP au niveau membranaire et au niveau cytosolique, soit en analysant les fractions cellulaires, soit par immunodétection, et pouvoir quantifier la transcription d'IRAP par RT-PCR quantitative, ce qui techniquement n'est pas encore réalisable dans notre laboratoire.

L'immunodétection des récepteurs GLUT4 en présence d'insuline et de LVVH7 ne donnant pas des résultats satisfaisants avec le protocole actuel, il est impossible de conclure sur l'éventuel influence de LVVH7 sur la translocation de GLUT4. Afin de connaître l'évolution des récepteurs, d'autres méthodes plus précises doivent être mises en place. Il est intéressant d'envisager un marquage radioactif des récepteurs GLUT4 dans des cultures mises en présence d'insuline, de LVVH7 et des deux molécules qui permettrait de visualiser les différences de distribution de GLUT4 en fonction de ces conditions et de déterminer l'effet de ces peptides sur les transporteurs GLUT4. Un marquage radioactif du glucose permettrait de connaître l'utilisation du glucose par les adipocytes.

Toutes ces données ainsi que les dernières données publiées sur IRAP et LVHH7 conduisent à penser que LVVH7 pourrait jouer un rôle important dans la translocation de GLUT4. En effet, Fernando et coll. (2008) ont montré que LVVH7 avait une action sur l'augmentation de la captation du glucose par la les neurones mais seulement dans des types cellulaires où IRAP et GLUT4 sont colocalisés. Ce résultat montre la régio-spécificité de l'action de LVVH7 et l'importance de la colocalisation de GLUT4 et IRAP. De plus, des études récentes ont montré que l'administration de LVVH7 (0,1 nmole) par injection intracérébroventriculaire à des rats de 3 mois augmentait la mémoire et la reconnaissance spatiale (De Bundel *et al.*, 2009). Il semblerait que LVVH7 agissent par l'intermédiaire d'IRAP afin de modifier la libération des neurotransmetteurs dans l'hippocampe (De Bundel *et al.*, 2010). A long terme, si les résultats *in vitro* se confirment, nous pourrions envisager la

transposition de ces tests à une échelle in vivo. Ces tests permettraient surement de mieux comprendre et d'élucider le mécanisme d'action de ces peptides sur les récepteurs IRAP exprimés par les adipocytes.

Selon la bibliographie, trois hypothèses sur le rôle l'Ang IV et de LVVH7 dans le mécanisme de la mémoire ont pu être proposées : 1) ils pourraient agir en tant qu'inhibiteur d'IRAP et empêcher la libération de peptides endogènes (Ye *et al.*, 2007) 2) ils pourraient moduler l'entrée du glucose dans la cellule (Albiston *et al.*, 2007) 3) la liaison de ligand à la partie C-terminale d'IRAP pourrait modifier la partie intracellulaire du récepteur ainsi que les protéines cytoplasmiques qui interagissent avec lui (Chai *et al.*, 2004).

Chapitre 2 : Caractérisation et activité biologique des hémorphines de type 7 dans le microenvironnement du cancer broncho-pulmonaire

Cette partie de la thèse s'inscrit dans le projet collaboratif « MATRIGO » contractualisé en 2008 avec l'Institut National du Cancer (INCa) et trois unités de recherches, l'INSERM U620 (Rennes représentée par Bruno Clément), l'Inserm U618 (Tours représenté par Nathalie Vourch) et l'UPR 4301 du CNRS d'Orléans (représenté par Claudine Kieda).

Les objectifs de ce projet s'inscrivent dans le contexte de caractérisation de nouveaux types de descripteurs moléculaires du microenvironnement tumoral et de leur mode d'action.

En effet, la progression des carcinomes est un processus extrêmement complexe mettant en œuvre, outre les cellules cancéreuses, leur microenvironnement composé de la matrice extracellulaire (MEC), de facteurs solubles et de cellules non néoplasiques (fibroblastes, cellules endothéliales….). Parmi les acteurs du microenvironnement tumoral, les protéines matricielles (collagènes notamment) et les protéines plasmatiques (hémoglobine) recrutées dans les zones tumorales ne sont plus considérées comme inertes. Sous l'influence d'un microenvironnement pathologique caractérisé par de faibles concentrations en glucose, de faibles pressions en oxygène mais aussi un pH plus acide que ceux observés dans les tissus normaux correspondants, ces supports peuvent jouent un rôle central via la biogenèse de modules qui peuvent être cryptiques dans la séquence des molécules parentes. L'exposition de ces cryptides, suite à des changements de conformation de la molécule parente associés à une activité protéolytique, permet des interactions avec des récepteurs membranaires qui activent ou inhibent des voies de signalisation impliquées dans la balance prolifération/apoptose, la migration, l'adhésion et la différenciation des cellules. Parmi les systèmes protéasiques pouvant intervenir dans la progression tumorale via le remodelage de la MEC, celui des métalloprotéases matricielles (MMP) est actuellement le plus connu et étudié. Mais, d'autres familles de protéases, comme celle des cathepsines tissulaires humaines ont émergé dans le contexte du cancer. Elles pourraient avoir un rôle majeur dans le développement tumoral pulmonaire, en interagissant et clivant les protéines du microenvironnement.

Chaque équipe a été désignée pour réaliser une ou plusieurs parties du projet selon ses compétences. Nous avons pris en charge l'identification des protéases impliquées dans la dégradation de l'hémoglobine. Grâce à des méthodes mises au point au laboratoire nous sommes en mesure de tester la capacité digestive des extraits cellulaires issus de cancers broncho-pulmonaires sur l'hémoglobine, et notamment de déterminer si cette activité explique la production d'hémorphines. En effet, de précédentes études menées sur les

hémorphines de type 7 en relation avec le cancer ont permis de démontrer qu'ils pouvaient constituer des marqueurs précoces de l'activité des cathepsines chez des patientes atteintes de cancer du sein (Cohen *et al.*, 2003b). Leur présence dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire de patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires (Duethman *et al.*, 2000) mais aussi dans des carcinomes hépatocellulaires (Zhou *et al.*, 2006) pose la question de leur origine et de leur mode d'action.

C'est donc à ces deux questions que nous nous proposons de répondre dans ce chapitre en nous intéressant à la caractérisation et à l'activité biologique des hémorphines de type 7 dans le microenvironnement tumoral du cancer broncho-pulmonaire.

Dans une première série d'expériences, des cultures issues de lignées de cellules de cancers bronchiques ont été réalisées dans des conditions mimant les conditions pathologiques du microenvironnement. A l'issue de ces différentes conditions, les surnageants de culture mais aussi les culots cellulaires ont été testés pour leur capacité digestive de l'hémoglobine humaine. Des peptides de type hémorphine de type 7 ont été systématiquement recherchés dans les hydrolysats par la mise en place de techniques séparatives associées à la spectrométrie de masse. Enfin le statut protéasique des différents extraits cellulaires a été approché par la mesure de l'activité cathepsine D, protéase acide connue pour être sécrétée et activée dans le milieu extracellulaire des tumeurs acides. Enfin, les effets des produits de clivage de l'hémoglobine ont été testés in vitro sur les cellules cancéreuses et les fibroblastes du microenvironnement tumoral pulmonaire.

1 – Matériels et méthodes

1.1 - Culture de cellules de cancers broncho-pulmonaires

La culture des cellules de cancers pulmonaires a été réalisée à Tours dans l'unité INSERM U618. Deux lignées cellulaires faisant partie du groupe NSCLCs (Non-Small Cell Lung Cancers = Cancer du poumon non à petites cellules) ont été étudiées :

- Les cellules de la lignée A549, dérivées d'un carcinome bronchiolo-alvéolaire humain.

- Les cellules de la lignée H460, dérivées d'un carcinome pulmonaire épidermoïde humain.

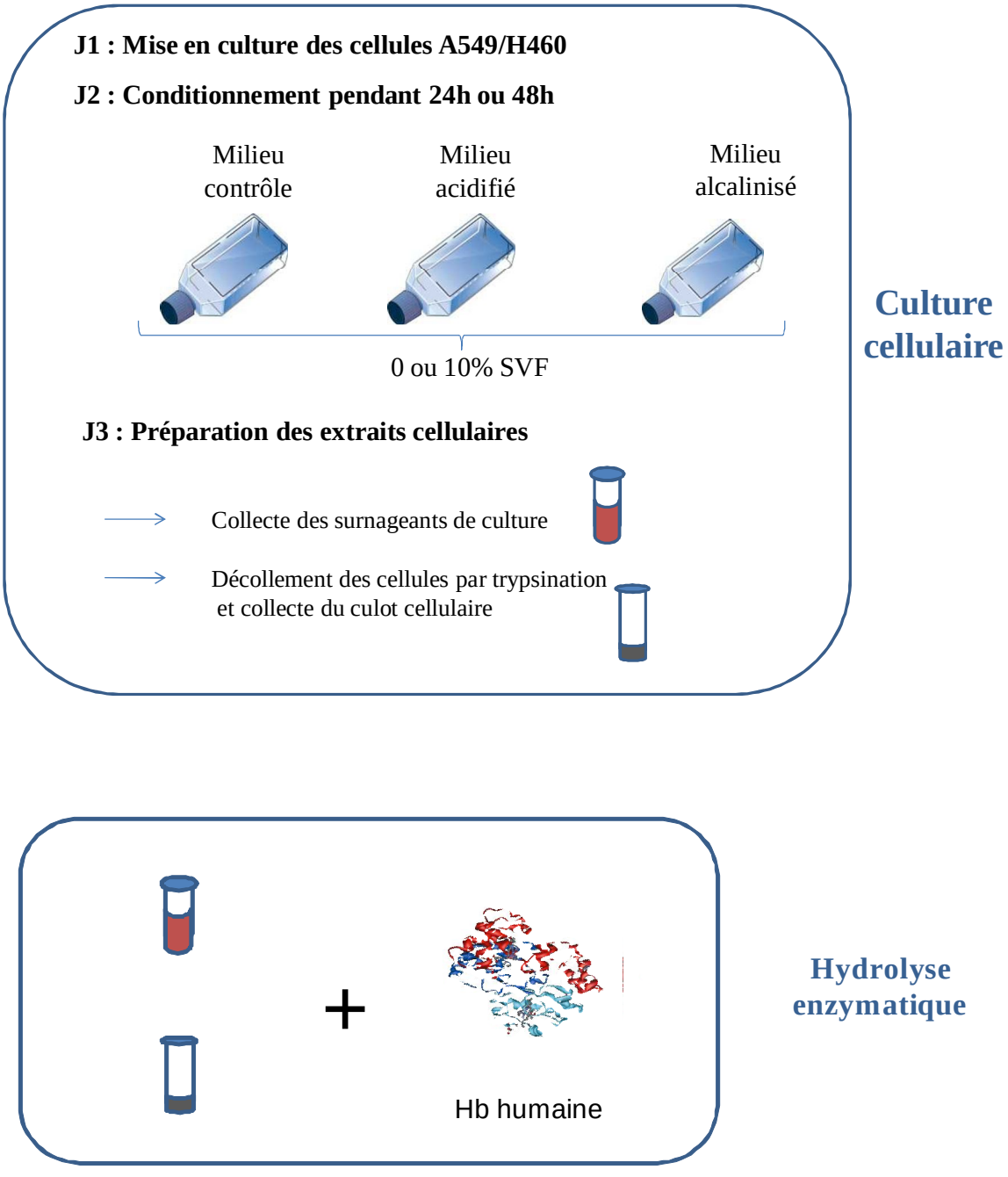
La littérature rapporte que l'acidification pathologique du microenvironnement tumoral favorise l'expression de gènes connus pour promouvoir la dissémination de métastases et l'invasivité des cellules, notamment les gènes codant pour des enzymes dégradant la matrice extracellulaire (MMP et cathepsines). Afin de tester ce paramètre pH sur les cellules en culture, chaque lignée a été cultivée dans quatre conditions de culture impliquant des microvariations de pH et d'apport en facteurs nutritifs :

- Milieu de culture RPMI-1640 contenant du Glutamax I + 1%antibiotique penicilline/streptomycine + 10% SVF décomplémenté
- Milieu de culture dépourvu de Sérum de Veau Fœtal (SVF)
- Milieu de culture acidifié 1 (pH = 6,95) par ajout d'une solution de MOPS à 1,25M pH6,8 et milieu de culture acidifié 2 (pH = 7,22) par ajout d'une solution d'HEPES à 1M pH 7,4.

1.2 - Etude du pouvoir protéolytique d'extraits cellulaires de cancers broncho-pulmonaires

L'objectif de cette manipulation est d'analyser les effets de la variation de conditions de culture sur ces deux types de cancers pulmonaires A549 et H460. L'approche expérimentale utilisée est schématisée dans la figure 25.

<u>Figure 25:</u> Représentation schématique récapitulative de l'approche expérimentale utilisée pour l'étude du pouvoir protéolytique de fractions cellulaires de cancers pulmonaires



Identification des familles peptidiques présents dans l'hydrolysat :
- HPLC
- ELISA

1.2.1 - Dégradation de l'hémoglobine par des extraits cellulaires

Le but de cette expérience est de savoir si les extraits cellulaires de cancers pulmonaires contiennent une ou plusieurs activités enzymatiques susceptibles de dégrader des protéines recrutées par le microenvironnement tumoral. En premier lieu, afin de restreindre les champs d'action des enzymes, les conditions de l'hydrolyse enzymatique ont été fixées à une température et un pH optimum pour les protéases acides, à savoir 37°C et pH = 3. Ces conditions expérimentales sont celles classiquement utilisées pour des enzymes présentant des spécificités d'action proches de celles de la cathepsine D, enzyme connue pour dégrader l'hémoglobine humaine et bovine en hémorphines de type 7. Les hydrolysats sont analysés par chromatographie liquide haute performance suivant les conditions d'analyse mises en place au laboratoire et cribler systématiquement pour la présence de peptides apparentés aux hémorphines de type 7.

a) Conditions d'hydrolyse

Afin de conduire la réaction d'hydrolyse, les extraits cellulaires (surnageant de culture et culot cellulaire) des lignées A549 et H460, ont été mis en contact d'une solution d'hémoglobine humaine à 5% (p/v). L'hydrolyse a été conduite pendant 30 minutes, à une température de 37°C et à un pH de 3. Ces conditions d'hydrolyse sont celles permettant l'action de la cathepsine D sur l'hémoglobine humaine pour libérer les hémorphines. Afin de conduire l'hydrolyse dans des conditions optimales, on fonctionne avec un ratio E/S = 1/182 (p/p). Afin de caractériser l'activité protéolytique, nous avons réalisé des essais avec un inhibiteur spécifique des protéases acides et notamment de la cathepsine D, la pepstatine A (Woessner, 1972). Elle a été rajoutée dans le milieu réactionnel à une concentration de 0,5 µM.

b) Préparation des solutions pour l'hydrolyse

Afin de pouvoir appliquer le ratio Enzyme/Substrat 1/182, la concentration protéique de chacun des échantillons utilisés (surnageant et culot) a été déterminée. Un dosage

protéique utilisant un réactif composé d'acide bicinchoninique (BCA) et de cuivre a été appliqué utilisant la sérum albumine bovine comme protéine standard. La mesure de la densité optique (DO) est réalisée à 562 nm. C'est une méthode sensible et rapide qui résiste aux détergents comme le Triton ou le SDS.

Le volume final de l'hydrolyse est de 3 ml soit 2,5 ml de solution d'hémoglobine et 500µL d'extrait cellulaire. La réaction est initialisée par ajout de 500µL d'extrait. L'hydrolyse est arrêtée pas ajout de 10% du volume réactionnel d'une solution d'acide trichloroacétique à 40%. L'échantillon est ensuite filtré sur un filtre de porosité 0,22µm avant d'être analysé par CLHP.

1.2.2 - Caractérisation des peptides hémorphines-7 présents dans les hydrolysats.

Les produits de clivage de l'hémoglobine sont analysés par un système chromatographique en phase liquide comme décrit dans la partie 1.4.3 de la partie A du chapitre 1. Au préalable des gammes standards variant de 20 pmoles à 1 µmole injectées ont été réalisées pour chaque peptide de type hémorphine-7 soient pour LVVH7, VVH7 et H7 (synthétisé par la société Altergen, Strasbourg) repris dans de l'eau distillée. Ces gammes ont été injectées sur la colonne afin de déterminer les temps de rétention dans ces conditions. Ainsi, il a été possible d'identifier les hémorphines de type 7 dans chaque hydrolysat d'hémoglobine.

1.2.3 - Dosage immunoenzymatique des hémorphines de type 7 présents dans les hydrolysats par ELISA

Les produits d'hydrolyse sont ensuite dosés par ELISA suivant le protocole décrit dans la partie 1.2 du chapitre 1 partie A. Cette manipulation permet de confirmer la présence ou non des hémorphines de type 7 dans les hydrolysats mais aussi d'estimer leur concentration.

1.3 - Caractérisation des protéases acides de l'environnement tumorale pulmonaire : application à la cathepsine D

Une fois la présence d'une activité protéolytique dans les extraits cellulaires confirmée, nous avons décidé d'identifier les enzymes responsables de cette activité. Nous avons mis en place deux types d'expérimentation sur une enzyme bien connue dans notre laboratoire : la cathepsine D, libérant des hémorphines de type-7 à partir d'hémoglobine humaine et bovine. Afin de vérifier et de quantifier la présence d'une activité cathepsine D dans les extraits, deux méthodes ont été utilisées :

→ Détection de la protéine d'intérêt par immuno-blotting

→ Dosage de l'activité enzymatique de la protéine d'intérêt

1.3.1 - Mise au point d'une méthode de détection de la cathepsine D humaine par Western Blot

1.3.1.a - Protocole

Le protocole suivi est celui décrit dans la partie « matériels et méthodes » du chapitre 1 partie B.1.3.2. Seuls les anticorps et leurs dilutions diffèrent :

- anticorps 1 : anti-CD (Santa Cruz Biotechnology sc-10725) dilué à 1/200, anticorps polyclonaux de lapin détectant les résidus aminés 1-75 de la partie N-terminale de la cathepsine D humaine.
- anticorps 2 : anti IgG de lapin couplé à la peroxydase (Beckman Coulter, PN IM0831)

Deux types de révélation sont utilisés :

- coloration au TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), substrat chromogénique stabilisé de la peroxydase; l'apparition d'une bande bleutée valide la présence de la protéine d'intérêt.

- chimioluminescence (kit ECL reaction, Amersham). La peroxydase marquant l'anticorps secondaire oxyde le luminol en présence de peroxyde d'hydrogène. Le luminol excité revient à son état initial en émettant une lumière à 428 nm détectée par un film photographique (Hyperfilm ECL, Amersham). La membrane est mise au contact du luminol pendant une minute, puis avec le film photographique pour une durée de 30 minutes.

1.3.1.b - Préparations préliminaires des extraits cellulaires témoins

Afin d'optimiser les quantités nécessaires en protéines pour obtenir un signal, des extraits cellulaires préparés de cellules MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) ont été préparés. Cette lignée de cellules tumorales mammaires est classiquement utilisée comme témoin dans les expériences d'immunodétection des différentes formes de la cathepsine D.

● Conditions de culture

Les MCF-7 sont décongelées à partir d'un cryotube. Ce dernier contient des cellules dans le milieu de culture DMEM additionné d'un agent protecteur DMSO (qui permet d'éviter une trop grande mortalité lors de la congélation). Après la décongélation on élimine l'agent protecteur par centrifugation (5 minutes à 15000rpm). Les culots sont repris par la suite dans du milieu DMEM additionné par 10%¨SVF et 1% d'antibiotiques (Streptomycine-Pénicilline). Les cellules sont mises en culture dans des flasques 75cm^2.

● Récupération des cellules et fractionnement cellulaire

Le protocole utilisé est celui décrit dans la partie B.1.2 du chapitre 1. Trois fractions sont préparées :

- une fraction totale (FT)
- une fraction cytosolique (FC)
- une fraction membranaire (FM)

1.3.2 - Dosage de l'activité enzymatique dans les extraits cellulaires

Afin de confirmer la présence de la cathepsine D dans les extraits cellulaires, ceux-ci sont soumis à un test enzymatique. Le protocole du test a été décrit dans la partie 1.3.1 du chapitre 1 selon la méthode de Smith et coll (1974). Les échantillons sont mis en présence d'hémoglobine pendant 30 minutes. Les produits de l'hydrolyse sont précipités au TCA puis filtrés sur 0,22µ afin d'éliminer les protéines résiduelles non hydrolysées. L'absorbance des filtrats est mesurée à 280 nm.

2 – Résultats - Discussion

2.1 - Analyse des produits d'hydrolyse de l'hémoglobine par les extraits cellulaires de cancers pulmonaires

Avant de nous intéresser à l'identification d'une protéase spécifique au microenvironnement tumoral, il a d'abord fallu vérifier que les extraits cellulaires tumoraux contenaient une activité protéolytique. Chaque équipe de recherche ayant une spécialité, le travail a été réparti en fonction des compétences de chacun. Le premier axe de recherche défini dans le projet concerne l'étude des molécules connues pour être importantes lors de la progression des tumeurs soit le collagène et l'hémoglobine. L'hémoglobine est une protéine dont la dégradation dépend de son environnement (Karelin *et al.*, 1998). Elle diffère suivant l'organe mais aussi les changements dus à des contextes pathologiques. Notre équipe a tout d'abord été chargée d'identifier une activité protéolytique dans ces extraits en identifiant des peptides bioactifs connus pour être libérés par digestion de l'hémoglobine notamment dans certaines situations pathologiques : les hémorphines.

2.1.1 - Résultats de la digestion *in vitro* de l'hémoglobine par le microenvironnement tumoral

L'analyse par CLHP des hydrolysats provenant de l'action des surnageants de culture cellulaires sur l'hémoglobine a montré que les peptides de type hémorphines-7 pouvait être générés. Les méthodes utilisées pour l'identification sont les mêmes que celles utilisées pour

le chapitre 1 (1.4.3.c). Des gammes ont été réalisées pour chaque peptide de type hémorphine-7 (H7, VVH7 et LVVH7) de 20 pmoles à 1 nmole. Un temps de rétention correspond à un peptide.

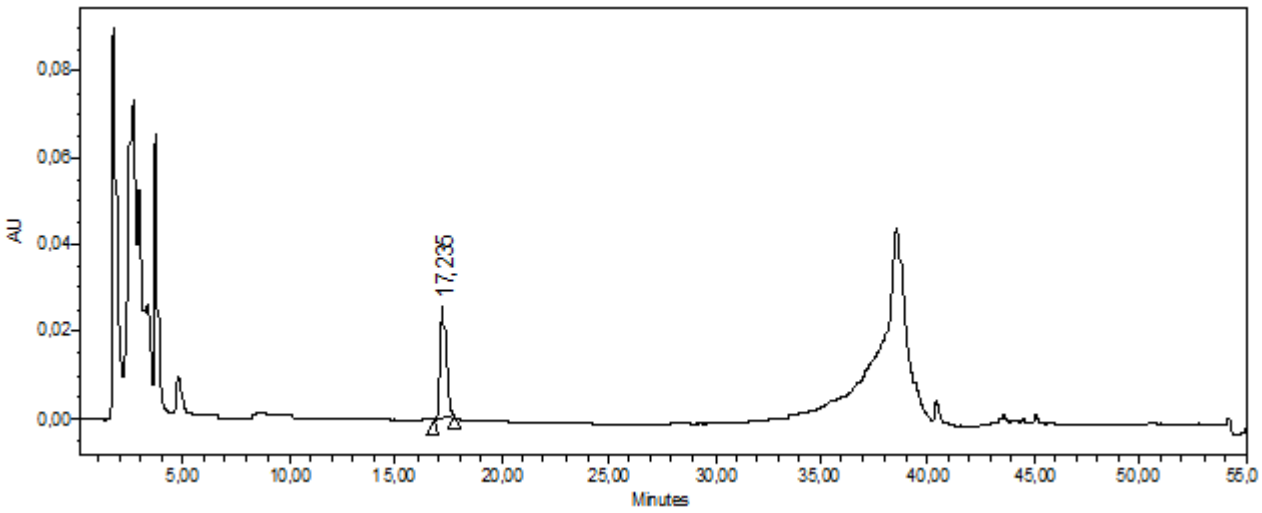
Tableau 22 : Temps de rétention caractéristique pour chaque peptide

Peptide	Temps de rétention (minutes)
H7	**18**
VVH7	**23**
LVVH7	**28**

Ces temps de rétention sont obtenus par identification grâce au Match Angle (MA) et Match Threshold (MT) (cf : 1.4.3.c chapitre 1) et grâce à des gammes de peptides préalablement analysées par CLHP.

Afin de compléter l'étude, des surnageants de culture sans hydrolyse ont été analysés par CLHP. Cette analyse permet de comparer les peptides présents avant et après l'hydrolyse. La figure 26 présente le chromatogramme d'un surnageant de culture de la lignée H460 n'ayant pas subi d'hydrolyse.

<u>Figure 26</u> : Chromatogramme à 280 nm d'un surnageant de culture de la lignée H460 cultivé à 10% de SVF en milieu acidifié (MOPS)



On peut identifier une molécule présente dans le surnageant lorsque l'analyse est effectuée à 280 nm. Elle a un temps de rétention de 17,235 minutes sur cet exemple. Les analyses ont été effectuées sur chaque surnageant de chaque type cellulaire (A549 et H460). Le même composé est présent, son temps de rétention moyen est de 17, 5 minutes.

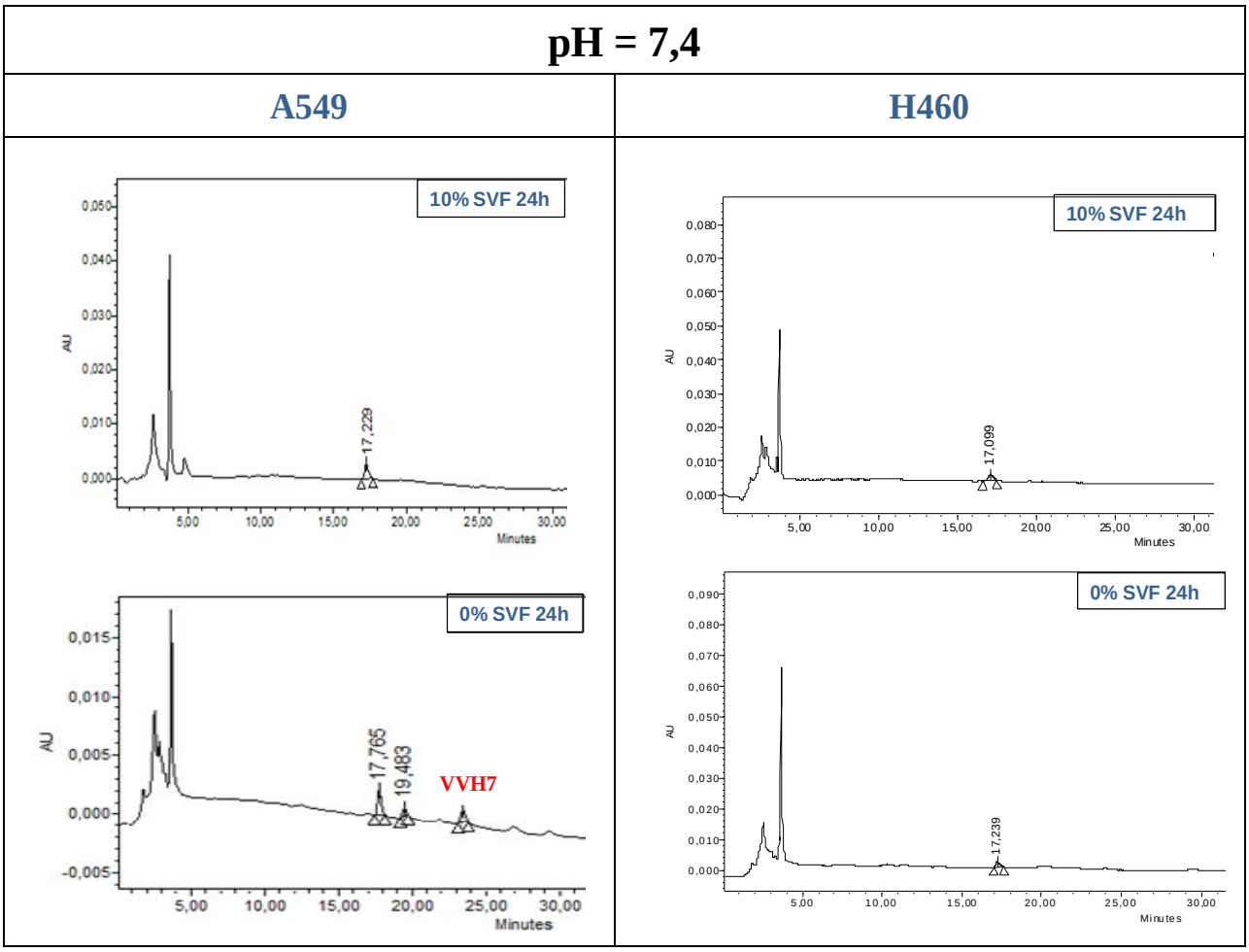
L'identification des peptides présents dans les hydrolysats des surnageants des cultures A549 et H460 a été réalisée en fonction des différents paramètres étudiés lors des cultures de cellules :

- effet du SVF (0 et 10%),
- effet de la variation du pH du milieu de culture (acidification avec le tampon MOPS ou alcalinisation avec le tampon HEPES),
- effet combiné du SVF et de la modification du pH.

2.1.1.a - Effet du SVF

Afin d'étudier l'influence du SVF et du temps de culture sur le clivage de l'hémoglobine, les chromatogrammes les plus représentatifs sont résumés dans la figure 27.

<u>Figure 27 :</u> Analyse par CLHP à 280 nm des hydrolysats résultant de l'action d'un surnageant de culture des lignées A549 et H460 avec ou sans SVF



● <u>Hydrolysats provenant de l'action des surnageants de culture de la lignée A549</u>

Pour ce type cellulaire, le peptide VVH7 a été caractérisé dans un surnageant de culture ne contenant pas de SVF à pH 7,4 (figure 27).

Sur le deuxième chromatogramme, nous avons pu identifier VVH7 (tr = 23,473 min). Le peptide se trouve en très faible quantité puisque l'absorbance du pic est inférieure à 0,002. Ce peptide apparaît lorsque les cellules sont cultivées en l'absence de SVF. Nous pouvons noter que le SVF, contenant de nombreux facteurs de croissance, empêche la formation de

VVH7. En effet, le surnageant de culture des cellules A549 n'est pas capable d'hydrolyser l'hémoglobine et de produire des hémorphines de type 7 lorsque le milieu de culture contient du SVF. Le SVF est donc capable d'inhiber l'action d'une des protéases responsables de la production des hémorphines à partir de l'hémoglobine.

● **Hydrolysats résultant de l'action des surnageants de cultures de la lignée H460**

Selon ces deux chromatogrammes (figure 27), l'effet du SVF ne semble pas modifier la production de peptides de type hémorphines-7. En effet, aucun peptide n'est présent lorsque la culture est réalisée à 10% de SVF. De même, aucun peptide n'est identifié lorsque les cultures sont réalisées sans SVF. Le composé non identifié (tr : 17,239 et 17,099 min) est toujours présent.

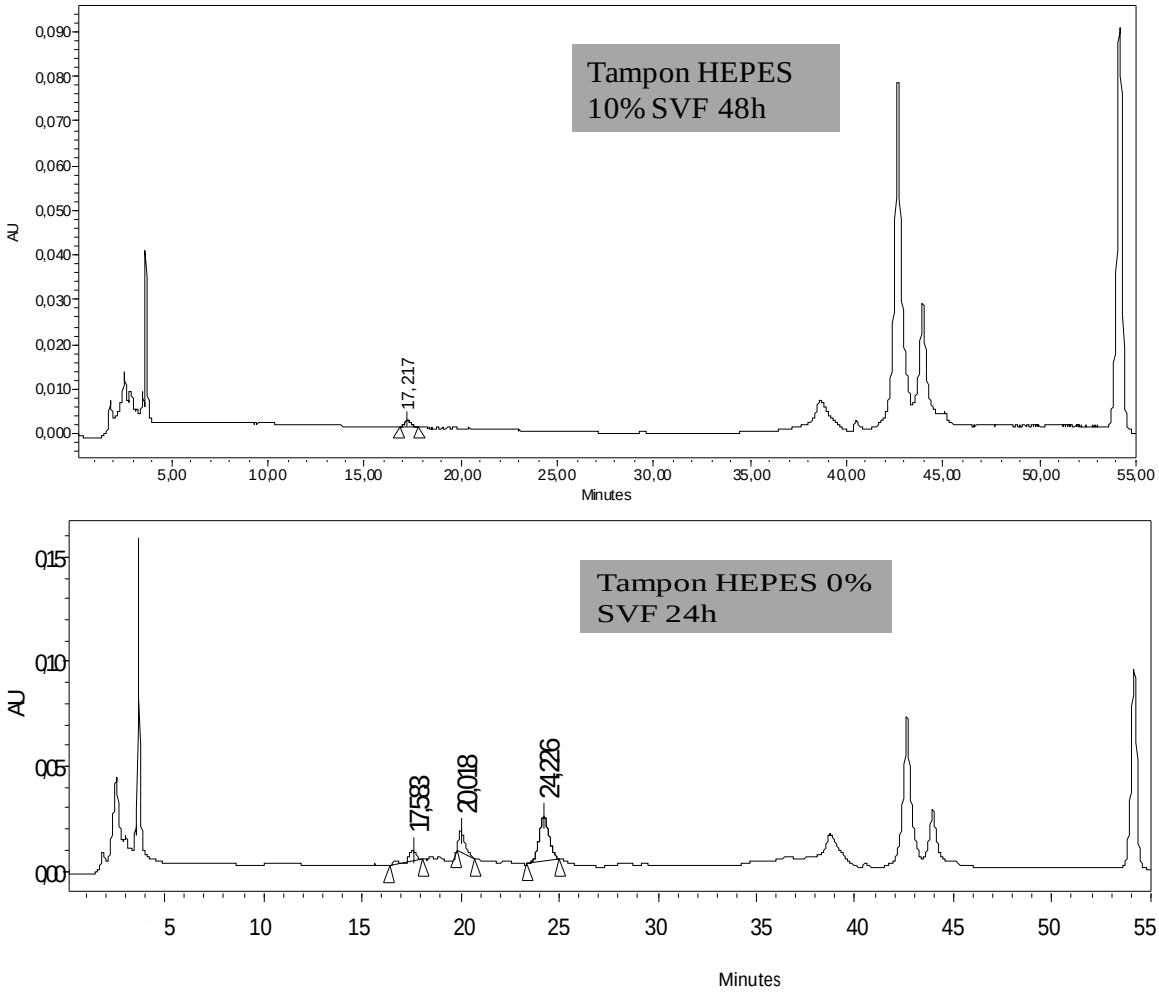
2.1.1.b - Effet de la modification du pH

Les résultats retenus dans ce paragraphe sont ceux montrant la présence d'hémorphines de type 7 dans les hydrolysats. Seule la lignée H460 est présentée.

◊ *Tampon HEPES*

Le tampon HEPES augmente le pH du milieu de culture en le passant à 7,22. La présence de SVF et du tampon HEPES n'ont pas d'effet sur la production de peptides hémorphines-7(figure 27). En revanche, lorsque le tampon HEPES n'est pas associé au SVF, deux composés (tr : 20,018 et 24,226 min) sont présents à 280 nm. Ces peptides ne font pas partie de la famille des hémorphines de type 7 selon les gammes préalablement analysées.

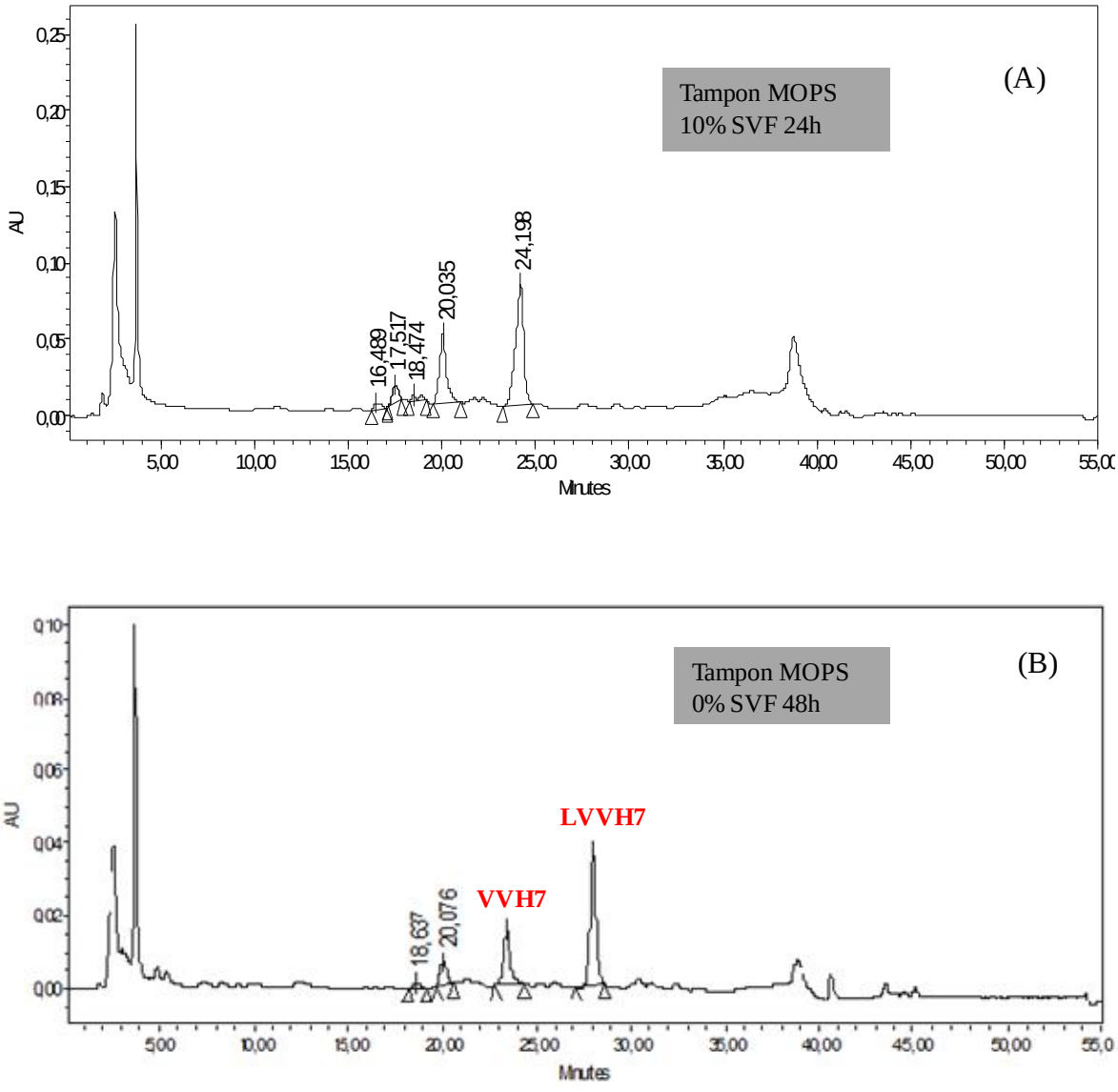
<u>Figure 28</u> : Analyse CLHP à 280 nm de l'hydrolysat résultant de l'action d'un surnageant de culture de la lignée H460 dans du tampon HEPES avec ou sans SVF



◊ *Tampon MOPS*

Le tampon MOPS acidifie le milieu de culture des cellules jusqu'au pH 6,8. L'effet combiné du SVF et du tampon MOPS active des protéases capables de dégrader l'hémoglobine dans les conditions d'hydrolyse décrites précédemment (1.2.1 chapitre 2) soit pH 3 à 37°C. Une population peptidique apparaît à 280nm (tr : 16,489 ; 18,474 ; 20,035 et 24,198) mais aucun de ces pics ne correspond à un peptide de type hémorphine-7 (figure 29).

<u>Figure 29</u> : Chromatogramme à 280 nm de l'hydrolysat résultant de l'action d'un surnageant de culture de la lignée H460 dans du tampon MOPS avec SVF (A) ou sans SVF (B)



En revanche, lorsque les cellules se retrouvent dans un milieu de culture plus acide sans SVF, quatre pics sont présents à 280 nm. Deux d'entre eux ont été identifiés comme des peptides de type hémorphines-7 soit VVH7 (tr = 23,404 min) et LVVH7 (tr = 28,043 min).

La présence ou non de SVF n'a pas d'influence sur la production d'hémorphines après hydrolyse de l'hémoglobine par les surnageants des cellules H460. En revanche, la modification du pH du milieu de culture a une action sur l'activation des protéases du surnageant de culture. En effet, des populations de peptides apparaissent lorsque du tampon HEPES et MOPS est ajouté dans le milieu de culture (figure 28 et 29). L'absence de SVF dans les cultures a permis la production de deux peptides d'intérêt (LVVH7 et VVH7) pour la lignée H460 (figure 29) et la production de VVH7 pour la lignée A549 (figure 27).

Les hémorphines sont des peptides qui sont présents dans le microenvironnement tumoral. Certaines conditions (culture en tampon MOPS) favorisent l'apparition de ces peptides. En effet, l'acidification favorise l'expression de gènes connus pour promouvoir la dissémination de métastases et l'invasivité des cellules, notamment les gènes codant pour des enzymes dégradant la matrice extracellulaire comme les cathepsines (Montcourrier *et al.*, 1994) et les métalloprotéases.

Afin de confirmer la présence des hémorphines de type 7 dans les hydrolysats, nous avons mesuré les concentrations de ces hémorphines par la méthode ELISA qui a été mise en place au laboratoire.

2.1.2 - Quantification des peptides de type hémorphine-7 issus de la digestion de l'hémoglobine par le microenvironnement tumoral

Afin de valider les résultats précédents, nous avons dosé la quantité d'hémorphines de type 7 présents dans les hydrolysats.

<u>Tableau 23</u> : **Concentration en hémorphines de type 7 dans les hydrolysats provenant de l'action des surnageants de culture sur l'hémoglobine**

Echantillon	Concentration (M)
H460 10% Hepes 48h	3,30E-08
H460 0% MOPS 48h	1,05E-07
H460 10% MOPS 24h	1,67E-08
A549 10% SVF 48h	7,24E-08
A549 10% SVF 24h	4,49E-09
A549 0% SVF 48h	2,12E-08
A549 0% SVF 24h	1,67E-08

Nous avons pu mettre en évidence la présence des hémorphines de type 7 dans leur ensemble (LVVH7, VVH7 et H7) dans sept hydrolysats, trois provenant des cultures H460 et quatre des cellules A549.

Ces résultats correspondent à ceux trouvés par HPLC excepté pour un hydrolysat provenant de l'hydrolyse de l'hémoglobine par un surnageant de la culture H60 10% HEPES 48h. Les concentrations repérées sont faibles étant donné qu'elles correspondent aux concentrations des trois peptides (LVVH7, VVH7 et H7).

Cette étude a montré que les hémorphines de type 7 sont présentes dans le microenvironnement tumoral et notamment dans certaines conditions de culture :

- sans SVF,

- en milieu de culture acidifié (tampon MOPS).

Ces peptides montrent là encore qu'ils interviennent dans des contextes pathologiques. Leur production est dépendante de l'action de protéases sur l'hémoglobine humaine, les cathepsines. La suite de notre travail consiste en l'identification des protéases actives dans le microenvironnement tumoral pulmonaire. La première protéase que nous avons étudiée est la

cathepsine D, protéase connue pour la production d'hémorphines de type 7 à partir de l'hémoglobine humaine (Garreau *et al.*, 1997).

2.2 - Caractérisation d'une protéase active dans le microenvironnement tumoral : la cathepsine D

2.2.1 - Analyse des extraits cellulaires de cancers pulmonaires par immunoblotting

2.2.1.a - Mise au point de la méthode de détection

La première partie de ce travail a consisté à déterminer le seuil de détection, en analyse Western blot, de la cathepsine D dans des échantillons où la présence de cette enzyme a été confirmée. Les modèles utilisés pour mettre au point le Western Blot sont les cellules MCF-7, lignée de cancers mammaires. Les cellules ont été cultivées jusqu'à l'obtention d'un nombre suffisant de flasques (8 au final) pour réaliser le fractionnement. La quantité de protéines pour chaque fraction (FT, FC et FM) a été mesurée. De nombreux western blot ont été réalisés avec les différents échantillons de fractions cellulaires issues des cellules MCF-7. Au cours de ces manipulations, plusieurs dilutions d'anticorps ont été testées, la révélation est visualisée soit par coloration soit par chimioluminescence (kit ECL).

> Western blot révélé par coloration au TMB

Quatre essais ont été conduits avec les différents échantillons de fractions cellulaires issues des cellules MCF7. Le premier avec une dilution de 1/200 de l'anticorps dirigé contre la cathepsine D et d'une dilution de 1/25000 pour le deuxième anticorps. Ces dilutions n'ont pas permis de révéler la présence de l'enzyme même au niveau du témoin positif correspondant à la cathepsine D commerciale ce qui amène à penser qu'il s'agit d'un problème relatif aux concentrations d'anticorps utilisés et non de la concentration de la protéine recherchée. Ce qui a été confirmé puisque la révélation des bandes a eu lieu lors du deuxième essai où la dilution du premier anticorps dirigé contre la cathepsine D a été de 1/400, celle du deuxième a été maintenue à la valeur initiale. Les protéines sont visualisées

sous forme de trois bandes correspondant aux trois isoformes de la cathepsine D (immature: 52-60kDa, intermédiaire: 46kDa et mature: 33kDa) pour l'échantillon de cathepsine D commerciale (2,75µg). Aucune bande n'a pu être révélée sur les FC et FM. Les quantités de protéines déposées (tableau 24) ne sont pas suffisantes pour être détectées par une coloration au TMB.

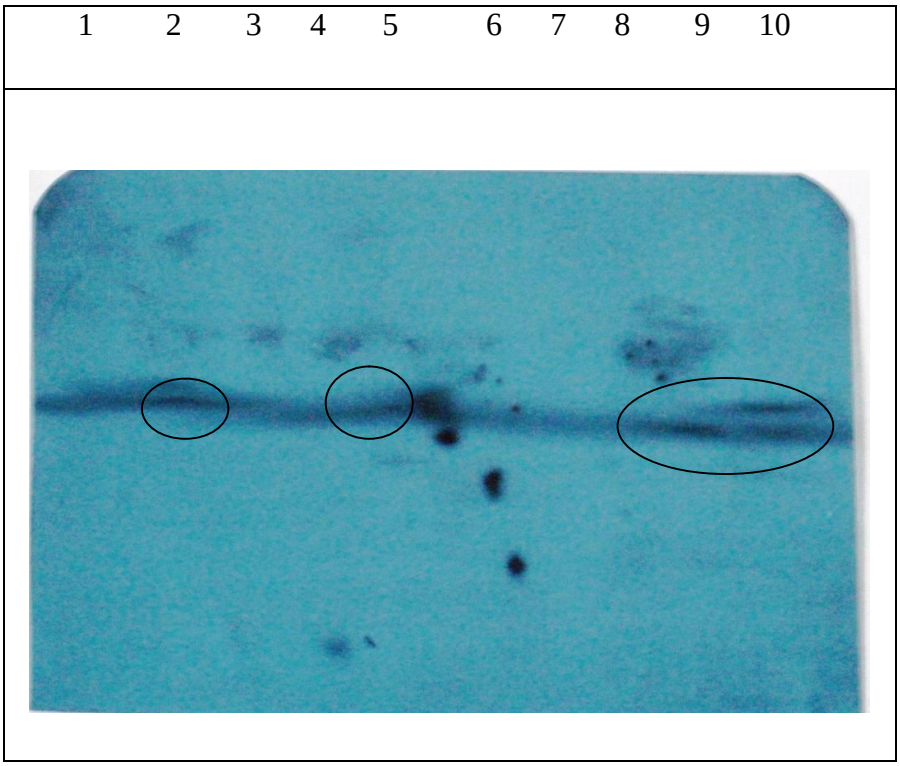
Tableau 24 : Quantité de protéines déposées pour chaque fraction et pour la cathepsine D commerciale sur un même gel d'électrophorèse.

	CD commerciale	FM N°1	FM N°2	FM N°3	FC N°1	FC N°2	FC N°3
Quantité de protéines (µg)	2,75	1, 8	0,9	0,45	0,73	0, 37	0,18

> Western Blot révélé par chimioluminescence

Quatre essais ont été conduits avec les différents échantillons de fractions cellulaires issues des cellules MCF-7. Au cours de ces expériences plusieurs dilutions de l'anticorps dirigé contre la cathepsine D ont été utilisées ; (1/200), (1/400)**,** (1/600), (1/500) et celle du deuxième anticorps a été maintenue à 1/25000. Les protéines ont pu être visualisées avec une dilution de l'anticorps 1 à 1/200. Les protéines sont repérées sous forme de bandes obtenues sur un film photographique. La lumière émise par la présence d'un substrat après exposition au déclencheur présent sur l'anticorps secondaire sert à impressionner le film photographique. Comme montré à la figure 29 ci-dessous, la cathepsine D a pu être détecté à différents niveaux.

<u>Figure 30</u> : Film photographique du Western Blot des surnageants des deux fractions protéiques et du lysat total tissues des cellules MCF 7



- Puits 9 et 10 : FT, la présence des deux formes de cathepsine D (mature : 33kDa et immature : 52kDa) est détectée.
- Puits 5 : cathepsine D commerciale (2,75µg), on remarque la présence de la forme mature (33kDa).
- Puits 2 : fraction cytosolique la moins concentrée (0,18 µg) présente la forme mature de la cathepsine.

La révélation avec un substrat chimioluminescent permet de montrer la présence de la cathepsine D en plus faible quantité. En effet, la cathepsine D est repérée dans la FT et sous deux formes (mature et immature), ces deux formes n'étant pas présentes sur la membrane de nitrocellulose colorée au TMB. Pourtant, les deux dépôts ont été réalisés avec le même échantillon.

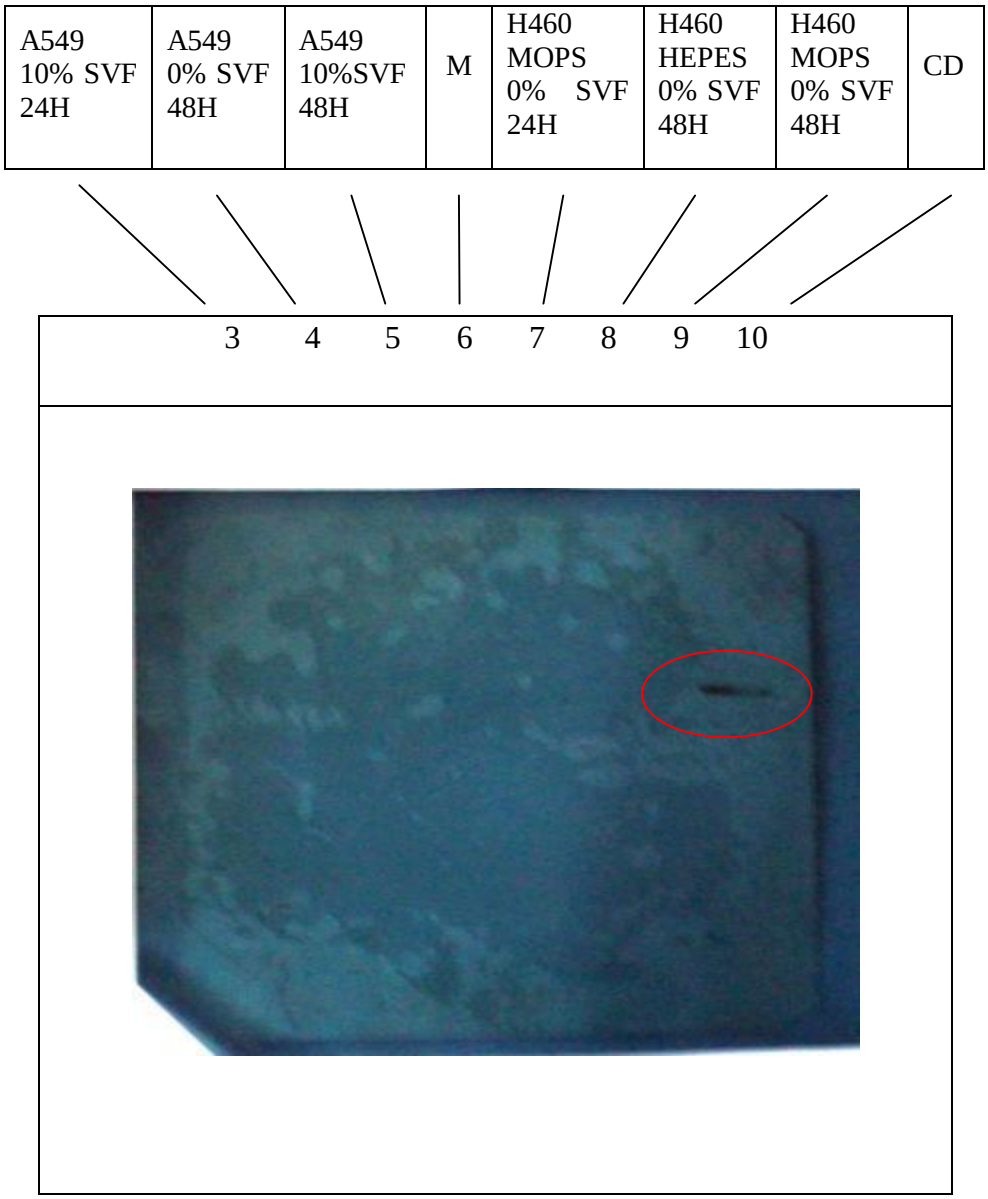
Les conditions de révélation de ce Western Blot ont été retenues pour réaliser l'identification de la cathepsine D dans des extraits cellulaires soit l'anticorps 1 dilué au 1/200 et l'anticorps 2 au 1/25000. Dans ces conditions, il est possible d'identifier la cathepsine D dans la FT pour une quantité de protéine minimum de 0,84 µg et la FC, la quantité de protéine déposée dans le puits est de 0,18µg.

Ce test mis au point sur les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 a été utilisé pour confirmer la présence de la cathepsine D dans les extraits cellulaires des lignées de cancers pulmonaires.

2.2.1.b - Application aux extraits cellulaires des lignées A549 et H460

Les conditions, ayant permis de révéler la présence de cathepsine D dans les extraits cellulaires de cancers pulmonaires, ont été conservées. Nous disposons des surnageants de culture et des culots cellulaires des lignées A549 et H460. Seul ces deux extraits sont analysés par Western Blot, le culot cellulaire est l'équivalent de la fraction totale (FT). Nous avons cherché à confirmer la présence de la cathepsine D dans les surnageants et la FT des lignées A549 et H460. La figure 30 ci-dessous montre les résultats obtenus après révélation par chimioluminescence.

Figure 31 : Film photographique du Western Blot des surnageants des cellules A549 et H460



M : Marqueur protéique (Broad Range Markers : sc-2361, Santa Cruz Biotechnology)

Le témoin positif (puits 10 : CD commerciale, 2,75µg) a été visualisé mais aucune bande n'est apparue pour le reste des échantillons. Les échantillons testés sont ceux qui ont montré la présence des peptides hémorphines de type 7 après hydrolyse de l'hémoglobine :

- Surnageants de culture A549 / 0 ou 10% SVF/ 24 ou 48h,
- Surnageants de culture H460 / Tampon MOPS ou HEPES / 0% SVF / 24 ou 48h.

Les quantités de protéines utilisées sont supérieures à celles déposées lors de la mise au point du Western Blot sur les cellules MCF-7 puisque 12,8µg ont été déposés dans chaque puits. Nous avons réalisé de la même façon d'autres Westerns blot avec la FT des A549 et H460 mais aucune bande ne montrant la présence de la cathepsine D n'a pu être révélée. Nous pouvons conclure au vu de ces résultats que la cathepsine D n'est pas présente dans les surnageants de culture et dans les culots cellulaires des lignées A549 et H460. En revanche, les surnageants de culture sont plus concentrés en protéine totale que les FT des lignées A549 et H460 ainsi que les FT des MCF-7. La proportion de cathepsine D se trouve diminuée si la quantité de protéine totale est plus importante. D'autres Western Blot sont à réaliser sur les surnageants de culture où les peptides de type hémorphine-7 ont été identifiés. Les quantités de protéines déposées doivent augmenter (soit supérieure à 12,8 µg). Afin de compléter la méthode d'identification de la cathepsine D dans les échantillons, un dosage de l'enzyme a été réalisé sur ces mêmes échantillons.

2.2.2 - Analyse par dosage enzymatique

L'activité de la cathepsine D a été mesurée selon la méthode de Smith et coll (1974). Les échantillons répertoriés dans le tableau 25 correspondent à des échantillons où les hémorphines de type 7 ont été identifiés ainsi que dans certains culots cellulaires.

<u>Tableau 25</u> : Résultats du dosage de l'activité cathepsine D dans les surnageants et culots de culture cellulaire des lignée A549 et H460

Echantillon	Surnageant A549 48h 10 % SVF	Surnageant A549 48h 0% SVF	Culots A549 48h 10 % SVF	Surnageant H460 MOPS 24h 0 % SVF	Surnageant H460 HEPES 24h 0 % SVF	Culots H460 48h 10 % SVF
Unités/ml	0	0,541	0	2,8	0,048	0

Trois échantillons ont montré une activité cathepsine D. Si l'on compare avec les résultats obtenus lors de l'analyse en HPLC des hydrolysats, deux des trois surnageants, qui

révèlent une activité de la cathepsine D, ont montré la présence d'hémorphines de type 7 lorsque l'hémoglobine a été hydrolysée (figure 27 et 29). En revanche, un surnageant de culture H60 HEPES 24h 0% SVF montre légère activité. Certains pics ont pu être repérés à 280 nm après hydrolyse de l'hémoglobine (figure 29).

Les résultats présentés dans le tableau suivant montrent la nette influence du microenvironnement tumoral dans les niveaux d'activité de la cathepsine D ou d'enzymes apparentées. Une fois encore, l'acidification du milieu de culture des cellules tumorales semble influencer l'activation des protéases présentes puisqu'une activité 40 fois supérieure (2,8 vs 0,048 U/ml) est mesurée dans le surnageant des cellules H460 dont le pH est de 6,95 par rapport à des conditions témoins de culture.

2.3 - Impact des hémorphines sur la croissance des cellules cancéreuses pulmonaires

Dans la littérature, il a été rapporté que les hémorphines, en particulier VV-H7, pouvaient inhiber la croissance cellulaire. D'autre part, l'hémorphine LVV-H7 a été retrouvée dans du liquide bronchiolo-alvéolaire d'un patient atteint d'un adénocarcinome pulmonaire. Afin de déterminer si les hémorphines générées à partir de l'hémoglobine humaine pouvaient limiter la progression des cancers du poumon, l'équipe de Tours a analysé l'effet de différentes hémorphines sur la croissance de deux lignées de carcinomes pulmonaires A549 et H460. Aucun effet cytotoxique, ni de réduction significative de la de la croissance des cellules A549 et H460 n'a pu être observé après la mise en contact avec les hémorphines.

3 - Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons cherché à comprendre l'influence du microenvironnement tumoral sur deux lignées de cancers pulmonaires (A549 et H460). Le processus d'invasion implique la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) par des protéases spécifiques et notamment les MMPs, très fortement exprimées dans le microenvironnement tumoral où elles sont activées par des protéases à sérine telle la plasmine. Dans un contexte métastatique, les protéases lysosomiales ont aussi leur importance. Les cathepsines sont des protéases lysosomiales détruisant les protéines des lysosomes et notamment la cathepsine D. Cette enzyme a tout d'abord été identifiée comme une protéine d'intérêt dans les cancers du sein (Recklies *et al.*, 1980). En effet, sa sécrétion dans le milieu de culture diffère en fonction de l'état du tissu (carcinomes ou fibromes) ou de l'état métastatique. D'après une étude récente, Après de nombreuses études, la cathepsine D se trouve être produite de façon aberrante lorsque les cellules deviennent malignes (Abbott DE, 2010). Elle est sur-excrétée dans le microenvironnement tumoral et participe à la dégradation de la matrice extracellulaire et donc à la progression des métastases. En 1975, la cathepsine D a été retrouvée dans le plasma et les effusions pleurales, liquide en surplus de la cavité pleurale de patients atteints de carcinome bronchogéniques, cancers du poumon à petite cellule (CPCC).

Ces éléments nous ont conduit à rechercher dans les extraits de cancers pulmonaires des lignées A549 et H460 une activité protéasique de ce type. Les résultats montrent que les surnageants de culture ont une activité protéasique apparentée à la cathepsine D si le milieu de culture est acidifié (tampon MOPS). Les résultats de digestion de l'hémoglobine obtenus avec la lignée H460 montrent effectivement une modification de la nature des fragments cryptiques générés. L'acidification plus prononcée du milieu semble être favorable à la production de fragments peptidiques d'intérêt comme le montre les résultats ci-dessus de l'analyse chromatographique. Dans un milieu acidifié par le tampon MOPS en l'absence de SVF, des peptides apparentés aux hémorphines apparaissent. Néanmoins, ces expériences devront être répétées afin de vérifier si les protéases sont sécrétées dans le milieu extracellulaire du fait de l'acidification ou bien si le stress apoptotique observé consécutivement à l'acidification ne serait pas responsable de la modification du comportement de ces cellules.

De plus, nous avons cherché à identifier quelles protéases étaient impliquées dans cette activité. Nous avons été chargés de rechercher la présence de cathepsine D dans les extraits de cancers pulmonaires (surnageants et culots cellulaires). Nous avons mis au point les paramètres permettant de détecter la cathepsine D dans des fractions cellulaires par Western Blot afin que ce test puisse être utilisé en routine au laboratoire sur d'autres types cellulaires. Nous n'avons pu identifier la cathepsine D par Western Blot dans les surnageants ou culots cellulaires des lignées A549 et H460. En effet, il est possible que la quantité de protéines totales utilisées ne soit pas assez importante pour révéler la présence de la cathepsine D. Nous avons donc mené en parallèle une étude enzymatique afin d'estimer l'activité cathepsine D des fragments cellulaires. Le microenvironnement tumoral acidifié est celui qui influence le plus l'activation des protéases puisque l'activité cathepsine D est 40 fois plus importante dans ce type de microenvironnement comparé à un milieu de culture classique pour la lignée H460. Nous avons de même montré une activité cathepsine D dans les surnageants de la lignée A549 mais sans SVF.

Ces résultats ne sont que préliminaires et doivent être mis en commun avec les études réalisées par les autres équipes de recherche associées. Nous pouvons déjà mettre en évidence à notre échelle que l'acidification du milieu de culture est propice à l'activation des protéases. Une des protéases identifiées est la cathepsine D, enzyme connue pour accélérer la prolifération cellulaire et la tumorogénèse (Glondu *et al.*, 2002). De futures expérimentations sont nécessaires pour :

- identifier les autres protéases activées,
- compléter les analyses en utilisant les culots cellulaires lorsque la quantité d'extraits sera suffisante.

Il semble important de relever qu'une fois de plus la présence des hémorphines de type 7 a pu être mis en évidence dans un contexte pathologique. Ces premiers résultats devront être complétés pour permettre l'utilisation de ces peptides comme marqueurs d'une progression métastatique pulmonaire.

Projet collaboratif : Etude des hémorphines de type 7 dans les anévrismes de l’aorte abdominale

Contexte du projet :

Un projet collaboratif impliquant notre équipe et celle de l'unité INSERM U698 « Hémostase, Bio-ingénierie et Remodelage Cardiovasculaires » (dirigée par le Pr Jean-Baptiste Michel) a été mis en place en 2007 suite à la démonstration par cette équipe que des milieux conditionnés issus de thrombus d'anévrismes de l'aorte abdominale étaient riches en fragments issus de la chaîne alpha de l'hémoglobine. Dans un contexte de recherche de nouveaux biomarqueurs de l'athérosclérose, une étude collaborative a vu le jour mettant en parallèle nos compétences dans l'immunodétection des peptides issus de la protéolyse de l'hémoglobine et la maîtrise par cette unité de nouvelles technologies permettant l'exploration moléculaire, tissulaire et cellulaire de l'athérosclérose.

L'athérosclérose des artères à destinée cérébrale, extra- et intracrâniennes, est la cause dominante de l'ischémie cérébrale dans les pays occidentaux. L'étude de cette maladie artérielle éclaire les mécanismes d'un grand nombre d'accidents vasculaires cérébraux et fournit de précieuses indications sur leur traitement, curatif et préventif. L'athérosclérose est la pathologie la plus fréquente de la paroi des artères chez l'homme. Les artères sont constituées de trois couches de la lumière vasculaire vers l'extérieur : l'intima, la média et l'adventice. A l'état normal, l'intima est constitué d'une couche de cellules endothéliales à une matrice extracellulaire fine ; il n'y a pas de vaisseaux dans la média artérielle carotidienne. La média est physiologiquement inaccessible à la colonisation cellulaire. L'adventice est la couche la plus externe des artères. Constitué de tissu conjonctif lâche, elle est particulièrement riche en vaisseaux. L'athérosclérose est une lésion focale et multiple de la paroi des artères de gros et moyens calibres. Elle consiste en un épaississement localisé de la paroi artérielle où l'intima anormalement enrichie de cellules musculaires lisses, est soulevée par des dépôts, formant une plaque où s'associent deux composantes qui donnent son nom à la maladie : l'athérome et la sclérose. Dès 1938, en même temps que l'observation des hémorragies dans les plaques vulnérables chez l'homme, Paterson rapportait le développement de néo-capillaires dans les plaques compliquées, et leur implication dans la genèse des hémorragies sous-intimales (Paterson, 1938). Ces observations ont permis à Barger de proposer un rôle important de l'angiogénèse centripète dans l'expression clinique de la maladie. Certaines protéases ont été identifiées dans cette pathologie : les

métalloprotéases à zinc et les sérine protéases. Ces enzymes protéolytiques sont impliqués dans toutes les phases de la maladie athéromateuse (Glagov *et al.*, 1987). L'exemple de l'implication des protéases dans l'évolution de l'athérome vers les complications est fourni par les anévrysmes de l'aorte abdominale, pathologie dans laquelle la protéolyse de la matrice extracellulaire joue le rôle pathogène principale. Pour le moment, la protéase la plus étudiée est MMP-9.

Dans l'aorte abdominale, l'athérothrombose se développe très fréquemment. Elle évolue généralement en anévrisme. Le sang s'engouffre brutalement à partir d'une petite déchirure de la paroi interne (intima) de l'aorte. L'anévrysme artériel se définit par une perte du parallélisme des bords d'une artère, entraînant une dilatation localisée permanente de l'artère avec une augmentation de diamètre d'au moins 50 % par rapport au diamètre normal théorique de l'artère considérée. L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) est quand à lui relié à la dégradation de la media dans le cas d'une aorte athéromateuse (Sakalihasan & Defawe, 2005). La surface luminale des AAA est souvent recouverte d'un thrombus, d'épaisseur variable (Anidjar & Kieffer, 1992). Il pourrait jouer un rôle dans la répartition de la contrainte hémodynamique sur l'ensemble de la paroi, et dans la régulation de l'activité protéolytique.

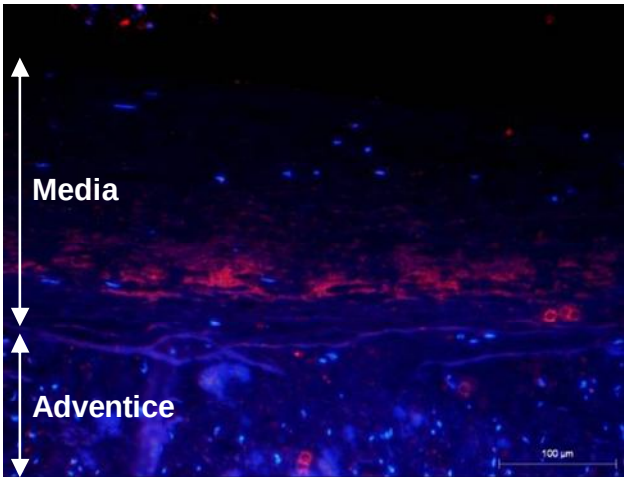
L'AAA est un environnement favorable à la protéolyse cellulaire de l'hémoglobine. La démonstration de la présence de peptides dont la structure est apparentée à celle de l'hémoglobine dans les thrombus d'AAA a conduit à émettre l'hypothèse que des protéases transportées par les leucocytes (MMPS, cathepsines, élastase, …) ou bien celles présentes *in situ* pourraient être à l'origine de la libération de peptides, capables de prédire une évolution pathologique du remodelage vasculaire.

Organisation expérimentale du projet et principaux résultats :

Les échantillons d'AAA séparés en média et adventice pour la paroi et en trois couches pour le thrombus (luminale, intermédiaire et abluminale) ont été incubés dans du milieu de culture. Des milieux conditionnés d'aorte saine ont été utilisés comme contrôle

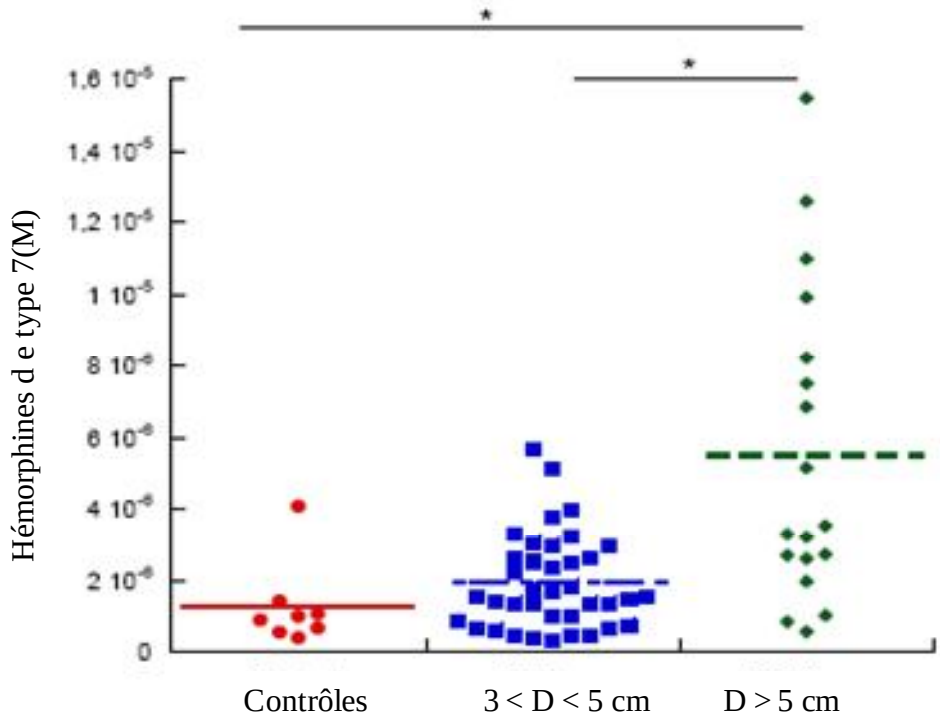
(média et adventice). Les sécrétomes ainsi obtenus ont été analysés en spectrométrie de masse après fractionnement sur différentes surfaces chromatographiques (technique SELDI-TOF MS : Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight). Des analyses immunohistologiques ont aussi été réalisées sur des coupes d'aortes anévrismales ou saines avec un anticorps dirigé spécifiquement contre les hémorphines de type 7. Nous avons participé à cette étude en mesurant par ELISA la concentration en hémorphines de type 7 dans ces sécrétomes. Nous avons pu montrer que la concentration en hémorphines de type 7 était très élevée dans les sécrétomes, quelque soit la partie du thrombus ainsi que dans la media jusqu'à atteindre quelques mmoles/L En parallèle, les études de spectrométrie de masse menées à Paris ont permis de montrer que le peptide LVVH7 était significativement plus concentré dans la média des aortes abdominales anévrismales que dans celle des aortes saines. Sur des coupes d'aortes, les immunomarquages des hémorphines de type 7 (figure 32), de l'hémoglobine, de la cathepsine D et des cellules inflammatoires nous ont permis de confirmer les observations faites en spectrométrie de masse et d'observer une colocalisation LVV-hémorphine 7- cathepsine D, notamment présente dans les macrophages. Ces résultats montrant l'importance des hémorphines dans ce contexte pathologique nous ont conduits à poursuivre les investigations en posant l'hypothèse que LVVH7 pourrait être un marqueur de la progression de l'anévrisme.

<u>Figure 32 :</u> Immunocoloration de (L)VVH7 dans la media et l'adventice d'un AAA (coloration rouge). Les noyaux sont repérés par DAPI (bleu).



Notre collaboration dans cette étude s'est donc poursuivie par le dosage des hémorphines de type 7 dans le sérum de patients atteints d'anévrisme de l'aorte abdominale. En effet, les hémorphines de type 7 sont libérées dans la partie luminale du thrombus ce qui laissent suggérer qu'elles pourraient diffuser dans le compartiment sanguin.

<u>Figure 33 :</u> Concentration en hémorphines de type 7 dans le sérum de patients souffrant d'AAA et de sujets sains. D représente le diamètre de l'aorte abdominale, * p < 0,05.



La concentration des peptides est 4 fois plus importante chez des patients souffrant d'un petit anévrisme et 5 fois plus importante pour des anévrismes plus larges. De plus, les diamètres les plus grands d'AAA sont corrélés de façon significative avec les concentrations en hémorphines de type 7.

Conclusions :

Cette collaboration entre nos deux équipes a permis la réalisation d'une publication :

Hemorphin-7 reflects Hemoglobin Proteolysis in Abdominal Aortic Aneurysm. Dejouvencel T ., Feron D., Rossignol P., Sapoval M., Kauffmann C., Piot J.M., Michel J.B., Fruitier-Arnaudin I., Meilhac O. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:269-275.

Les résultats suggèrent que les hémorphines de type 7, présents dans le thrombus, pourraient rejoindre la circulation sanguine et refléter la progression de la maladie. De plus, LVVH7 semble avoir un effet significatif sur le recrutement des neutrophiles permettant la cicatrisation. Les neutrophiles sont attirés de façon plus importante quand ils sont en présence du peptide LVVH7alors que l'hémoglobine seule ne semble pas avoir d'effet.

Cette étude a permis d'identifier les peptides hémorphines de type 7 dans les AAA. Ils sont sécrétés de façon importante dans la couche luminale du thrombus. Néanmoins, d'autres investigations sont nécessaires avant de pouvoir considérer LVVH7 comme un marqueur pertinent de l'évolution du thrombus vers la rupture. En effet, une étude sur le temps de demi-vie des peptides dans cette pathologie est nécessaire. Comme nous avons pu le voir dans les deux précédents chapitre, les hémorphines de type 7 sont impliquées dans de différentes pathologies ; leur dégradation étant toujours lié à une modification de leur précurseur, l'hémoglobine ou de l'environnement protéolytique.

Conclusions - Perspectives

La protéolyse est un phénomène omniprésent dans les systèmes biologiques. Elle joue un rôle très important dans les organismes vivants car elle intervient dans des processus vitaux tels que le catabolisme, l'apoptose, la coagulation (Puente *et al.*, 2003). Ce mécanisme implique la formation de fragments peptidiques issus de la protéolyse de différentes molécules protéiques endogènes qui peuvent à leur tour exercer des fonctions biologiques variées. Aujourd'hui de nombreuses données bibliographiques s'accumulent pour dire que ces clivages protéolytiques conduisent à la génération de peptides, dont 1) les séquences se trouvent enfouies au cœur de protéines, et dont 2) il est difficile de prévoir l'activité biologique. Les activités biologiques alors supportées par ces nouveaux peptides sont d'ailleurs souvent différentes des activités de leurs protéines « parentes ». Ces nouveaux « pool » peptidiques, fonction des modifications environnementales cellulaires, entrent dans le concept de peptidomique et plus précisément de cryptidomique défini par Autelitano en 2006. C'est précisément aux hémorphines, peptides bioactifs dérivant de la protéolyse de la chaîne β de l'hémoglobine, que nous nous sommes intéressés dans cette thèse. Certaines pathologies, telles que le cancer (Silvy *et al.*, 2001) ou la maladie d'Alzheimer (Cataldo & Nixon, 1990), sont associées à une augmentation de la protéolyse. De nombreux peptides, issus de cette progression, ont été étudiés comme de potentiel biomarqueur depuis cette dernière décennie (Villanueva *et al.*, 2006). C'est dans cette optique que s'inscrivent ces travaux de thèse qui avaient pour objectifs l'étude du potentiel biomarqueur des hémorphines de type 7 dans deux pathologies concernées par la modification de leur système protéolytique, les cancers broncho-pulmonaires et le diabète (Gil *et al.*, 1991). Ces travaux s'inscrivent dans la continuité des recherches conduites au laboratoire qui ont montré des taux circulants d'hémorphines de type 7 anormalement élevés chez des patientes atteintes de cancer du sein (Cohen *et al.*, 2003b) et anormalement abaissés chez des patients diabétiques de type 1 (Fruiter-Arnaudin *et al.*, 2003). Afin d'apporter des réponses biochimiques à ces anomalies, notre travail s'est exclusivement concentré sur la pathologie du diabète grâce à la mise en place d'un Projet Hospitalier de Recherche Clinique avec l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille et le service du Pr Vialettes. L'ensemble des hypothèses incluses dans le projet ont pu être testées et font l'objet des résultats présentés dans le premier chapitre du manuscrit.

La cohorte de patients diabétiques a pu être élargie et l'immunodétection sérique des hémorphines de type 7 a permis de conforter les premiers résultats de l'abaissement significatif des taux circulants d'hémorphines chez les patients diabétiques de type 1 avec une

baisse plus accusée chez les type 2. Deux hypothèses suggérant un défaut métabolique de production ou de dégradation des hémorphines ont été testées. Le métabolisme des hémorphines a tout d'abord été étudié par la mesure de l'activité de trois enzymes clés dans le métabolisme des hémorphines: la cathepsine D, la Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) et l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine (ECA). Aucune des enzymes étudiées ne permet d'expliquer la diminution des hémorphines de type 7 dans le sérum des patients diabétiques. En effet, l'activité sérique de la cathepsine D, enzyme responsable de la libération des hémorphines à partir de l'hémoglobine, n'est pas diminuée. De même, les résultats des activités enzymatiques de la DPPIV et de l'ECA ne vont pas dans le sens d'un hypercatabolisme sérique des hémorphines. L'activité DPPIV est augmentée dans les sera des patients témoins alors que l'on pouvait s'attendre à une diminution. L'activité de l'ECA ne permet pas non plus d'élucider la diminution des hémorphines de type 7 dans les sera des patients diabétiques puisqu'elle est sensiblement du même niveau que celle mesurée dans les contrôles. Ces résultats ne semblent pas en faveur d'une hypoproduction ou d'un catabolisme exacerbé de ces peptides.

La deuxième hypothèse de travail a consisté à étudier l'hémoglobine, précurseur endogène des hémorphines. Cette protéine est glyquée de façon plus importante chez des patients diabétiques. Nous avons donc entrepris de comparer la nature des fragments générés consécutivement à l'action de la cathepsine D sur de l'hémoglobine directement extraite de patients diabétiques. Sur la base des valeurs d'HbA1c, exprimant un pourcentage de glycation par rapport à l'hémoglobine totale, trois niveaux de glycation ont pu être testés 6, 10,5 et 12,5%. Les résultats de l'hydrolyse *in vitro* d'hémoglobine de patients par la cathepsine D ont montré que les peptides LVVH7, VVH7 et H7 sont bien libérés au bout de 30 minutes d'incubation. En revanche, le taux de glycation n'a pas d'impact direct sur la libération des hémorphines de type 7. Aucune corrélation significative n'a pu être montrée entre l'augmentation du taux de glycation de l'hémoglobine et la libération d'hémorphines quelque soit le temps d'hydrolyse (entre 0 et 30 minutes). L'observation de la diminution des concentrations d'hémorphines de type 7 dans le sérum des patients diabétiques ne semble pas non plus reliée à la modification par glycation de leur protéine parente.

En parallèle de ce projet clinique ayant trait aux hémorphines, nous avons également pu mesurer les taux circulants et tissulaires des hémorphines de type 7 chez des patients

souffrant d'anévrismes de l'aorte abdominale. L'évaluation de ces concentrations à la fois sur des milieux conditionnés de tissus chirurgicaux ou bien sur des sera a permis de montrer que la concentration des peptides était quatre fois supérieure chez des patients souffrant d'un petit anévrisme et cinq fois supérieure pour des anévrismes plus larges.

A l'analyse de ces différents contextes pathologiques qui nous permettent d'identifier et de doser les hémorphines de type 7, nous constatons que l'évolution des taux est fonction des pathologies étudiées, diminuées chez des patients atteints de diabète et augmentées chez des patients souffrant d'AAA, ce qui témoigne de la forte influence du statut protéasique de ces environnements pathologiques sur la nature des produits générés.

Ces deux pathologies sont intimement liées puisque le diabète «conduit» à l'athérosclérose (Kanter *et al.*, 2008). La concentration sérique des hémorphines varie pour ces deux maladies sans pour autant atteindre les mêmes valeurs. Une étude de Liu et coll (2006) a montré que l'activité sérique de la cathepsine S augmente chez des patients atteints de diabète et d'athérosclérose. L'activité de cette cathepsine, impliquée dans l'obésité et les maladies associées (Taleb & Clement, 2007), serait intéressante à étudier dans les sera des patients.

Afin de compléter les travaux réalisés sur le diabète, le rôle des hémorphines de type 7 a été étudié dans les adipocytes. En effet, nous savons que LVVH7 interagit sur le récepteur de l'angiotensine IV identifié comme l'IRAP qui est un récepteur enzyme modulé par l'insuline. Ce récepteur est transloqué à la membrane plasmique des cellules dans la même vésicule que GLUT4 (Ross *et al.*, 1997). L'assimilation de l'insuline par la cellule est modifiée dans le diabète et nous avons recherché à connaître le rôle de LVVH7 dans la co-translocation de GLUT4 et IRAP à la membrane des adipocytes. Des tests enzymatiques sur culture d'adipocytes ont été mis en place et ont montré que LVVH7 inhibe l'activité d'IRAP lorsqu'il est associé à l'insuline. En revanche, en présence de LVVH7 seul dans le milieu de culture, il n'y a pas de hausse significative de l'activité catalytique. LVVH7, en concentration proche du µM, associé à l'insuline, agit donc sur l'activité extracellulaire d'IRAP. Lorsque nous avons étudié l'influence du peptide sur la translocation du récepteur GLUT4, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effets de LVVH7 sur la translocation de GLUT4. Nous avons pu par immunocytochimie identifier le récepteur à la membrane des adipocytes humains mais nos limitations techniques n'ont pas permis de suivre l'évolution de leur

position dans la cellule. Ces expérimentations méritent d'être reconduites avec des techniques alternatives à celles du laboratoire. Notamment, un marquage radioactif du glucose ou du récepteur GLUT4 pourrait permettre de connaître l'influence de LVVH7 sur les captations du glucose par la cellule. Des études en PCR quantitative ont été entreprises mais non pas encore pu aboutir. Nous souhaitons poursuivre cette recherche de l'influence du peptide LVVH7 sur la transcription de GLUT4 dans la cellule qui démontrerait une activité nouvelle de régulation du métabolisme énergétique pour ces peptides.

D'autres hypothèses doivent être testées pour permettre d'élucider les raisons de la diminution des taux circulants de ces peptides dans ce qui permettrait d'évaluer les conséquences de cette diminution à l'échelle cellulaire. L'hyperglycémie est souvent associée à un stress oxydatif et nitrosatif (Ahmed *et al.*, 2005), il serait intéressant de regarder si de telles modifications peuvent affecter l'hémoglobine et donc interférer avec la nature des produits issus de sa dégradation cellulaire. De plus, la modification des peptides eux-mêmes (glycosylés, nitrés,…) pourrait expliquer cette diminution. Néanmoins, la très faible concentration sérique des hémorphines pourrait constituer une contrainte technique à l'identification de telles modifications dans les échantillons biologiques. La validation de cette hypothèse devra mettre en œuvre des techniques analytiques sensibles comme par exemple la nanochromotographie liquide couplée à la spectrométrie MALDI/TOF.

Les hémorphines interagissent avec des systèmes biologiques complexes tels que le système opiacé et le système rénine-angiotensine mais leur rôle a aussi été démontré ces dix dernières années dans la régulation de la mémoire et des apprentissages au travers de leur interaction avec le récepteur IRAP (Lee *et al.*, 2001). L'étude plus approfondie de leur interaction avec le récepteur IRAP présente un fort intérêt dans une pathologie telle que le diabète, car la connaissance de leur interaction étroite avec ce récepteur soulève quelques questions : la diminution sérique observée des hémorphines de type 7 est-elle reliée au fait qu'elles puissent se fixer à ce type de récepteur avec comme conséquence une diminution de leur biodisponibilité ? Cette diminution reflète-t-elle une utilisation plus importante au niveau cellulaire ? Ou au contraire, la diminution de la concentration en hémorphines dans le sang peut-elle avoir une influence sur la translocation de GLUT4 et IRAP à la membrane ? Ces questions sont importantes et méritent des expériences complémentaires et des techniques alternatives à celles utilisés dans ces travaux.

Dans la deuxième partie de cette thèse, un autre environnement pathologique a été étudié celui des cancers broncho-pulmonaires, dans l'objectif 1) d'étudier le potentiel digestif de l'hémoglobine de ces cellules tumorales et 2) d'apporter de nouveaux arguments en faveur de l'utilisation des hémorphines comme « biomarqueur » de progression tumorale. Dans le cas de cancers, le processus d'invasion implique la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) par des protéases tumorales spécifiques, parmi lesquelles les métalloprotéinases (MMPs) (Freije *et al.*, 2003). Dans un contexte métastatique, les protéases lysosomiales comme les cathepsines B et D ont aussi leur importance puisqu'elles sont décrites comme étant impliquées dans la destruction du stroma facilitant l'invasion tumorale (Berchem *et al.*, 2002).

Ces quelques éléments nous ont conduits à nous concentrer sur ce type d'endoprotéases connues également pour leur capacité à utiliser l'hémoglobine en tant que substrat. Afin d'identifier si les extraits de cancers pulmonaires des lignées A549 et H460 étaient capables de sécréter de telles activités protéolytiques, les cellules ont été cultivées dans des conditions mimant le microenvironnement tumoral, à savoir une légère acidité. Les résultats montrent que les surnageants de culture ainsi collectés des deux lignées sont positifs pour une activité protéasique de type endoprotéase acide uniquement si le milieu de culture est acidifié (par ajout de tampon MOPS dans le milieu de culture, pH 6,8). Dans ce tampon et en l'absence de SVF (de façon à s'affranchir des protéases du sérum), des hémorphines de type 7 ont être identifiées à l'issue de la mise en contact des surnageants de culture avec l'hémoglobine humaine. Néanmoins, des expériences complémentaires devront être réalisées afin de vérifier que la sécrétion des protéases dans le milieu extracellulaire est bien une conséquence de l'acidification du milieu et non une conséquence d'un stress apoptotique du à l'acidification artificielle du milieu. De plus, nous avons cherché à identifier la spécificité des protéases impliquées dans la production des hémorphines. Par western-blot des surnageants et des culots cellulaires obtenus des deux lignées tumorales, aucun signal pour la cathepsine D n'a pas pu être visualisé. Par contre, la mesure de l'activité enzymatique cathepsine D dans ces mêmes échantillons a permis de mettre en évidence que le microenvironnement tumoral acidifié influence l'activation des protéases dont la spécificité est proche de celle de la cathepsine D. L'activité enzymatique apparentée à celle de la cathepsine D est 40 fois plus

importante dans ce type de microenvironnement si on la compare à un milieu de culture classique pour la lignée H460. Nous pouvons déjà mettre en évidence à notre échelle que l'acidification du milieu de culture est propice à l'activation des protéases et à la libération d'hémorphines dans le milieu extracellulaire.

La présence des hémorphines *in vivo* associée à des environnements pathologiques est aujourd'hui bien illustrée dans la littérature. Néanmoins, peu de travaux ont été consacrés à l'étude de leur signification physiologique dans ces contextes. Les résultats des travaux de cette thèse ont ouvert la voie en montrant que les hémorphines de type 7 pouvaient représenter de vrais marqueurs de dysfonctionnements protéolytiques mais aussi de nouveaux biorégulateurs du métabolisme énergétique cellulaire.

Références

Ahmed, N., Babaei-Jadidi, R., Howell, S.K., Beisswenger, P.J. & Thornalley, P.J. (2005) Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes. *Diabetologia* **48**(8), 1590-603.

Albiston, A.L., McDowall, S.G., Matsacos, D., Sim, P., Clune, E., Mustafa, T., Lee, J., Mendelsohn, F.A.O., Simpson, R.J., Connolly, L.M. & Chai, S.Y. (2001) Evidence That the Angiotensin IV (AT4) Receptor Is the Enzyme Insulin-regulated Aminopeptidase. *Journal of Biological Chemistry* **276**(52), 48623-48626.

Albiston, A.L., Peck, G.R., Yeatman, H.R., Fernando, R., Ye, S. & Chai, S.Y. (2007) Therapeutic targeting of insulin-regulated aminopeptidase: heads and tails? *Pharmacol Ther.* **116**(3), 417-27.

Anidjar, S. & Kieffer, E. (1992) Pathogenesis of acquired aneurysms of the abdominal aorta. *Annals of Vascular Surgery* **6**(3), 298-305.

Barkhudaryan, N., Kellermann, J., Galoyan, A. & Lottspeich, F. (1993) High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronaro-constrictory peptide from the beta-chain of hemoglobin. *FEBS Letters* **329**(1-2), 215-218.

Bégu, A. (2005) Rôle des hémorphines dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle chez les patients diabétiques de type 1. Thèse de doctorat Université de Marseille.

Berchem, G., Glondu, M., Gleizes, M., Brouillet, J.P., Vignon, F., Garcia, M. & Liaudet-Coopman, E. (2002) Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene. 2002 Aug 29;21(38):5951-5.* **21**(38), 5951-5.

Brantl, V., Gramsch, C. & Lottspeich, F. (1986) Novel opioid peptides derived from hemoglobin: Hemorphins. *European Journal of Pharmacology* **125**(2), 309-310.

Brenner, B.M., Cooper, M.E., de Zeeuw, D., Grunfeld, J.P., Keane, W.F., Kurokawa, K., McGill, J.B., Mitch, W.E., Parving, H.H., Remuzzi, G., Ribeiro, A.B., Schluchter, M.D., Snavely, D., Zhang, Z., Simpson, R., Ramjit, D. & Shahinfar, S. (2000) The losartan renal protection study--rationale, study design and baseline characteristics of RENAAL (Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan). *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **1**(4), 328-35.

Brownlee, M. (1994) Glycation and diabetic complications. *Diabetes* **43**(6), 836-41.

Bryant, N.J., Govers, R. & James, D.E. (2002) Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**(4), 267-77.

Cataldo, A.M. & Nixon, R.A. (1990) Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(10), 3861-5.

Cejka, J., Zelezna, B., Velek, J., Zicha, J. & Kunes, J. (2004) LVV-hemorphin-7 lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats: Radiotelemetry study. *Physiological Research* **53**(6), 603-607.

Cerpa-Poljak, A., Lahnstein, J., Mason, K.E., Smythe, G.A. & Duncan, M.W. (1997) Mass spectrometric identification and quantification of hemorphins extracted from human adrenal and pheochromocytoma tissue. *Journal of Neurochemistry* **68**(4), 1712-1719.

Chai, S.Y., Fernando, R., Peck, G., Ye, S.Y., Mendelsohn, F.A.O., Jenkins, T.A. & Albiston, A.L. (2004) The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**(21), 2728-2737.

Chang, R.C., Huang, W.Y., Redding, T.W., Arimura, A., Coy, D.H. & Schally, A.V. (1980) Isolation and structure of several peptides from porcine hypothalami. *Biochim Biophys Acta.* **625**(2), 266-73.

Chantrain, C.F., DeClerck, Y.A., Groshen, S. & McNamara, G. (2003) Computerized quantification of tissue vascularization using high-resolution slide scanning of whole tumor sections. *J Histochem Cytochem.* **51**(2), 151-8.

Chen, F., Luo, X., Zhang, J., Lu, Y. & Luo, R. (2009) Elevated serum levels of TPS and CYFRA 21-1 predict poor prognosis in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. **Med Oncol.** .

Cohen, M., Fruitier-Arnaudin, I., Garreau-Balandier, I. & Piot, J.M. (2002) Quantification of hemorphin-7 peptides by enzyme linked immunosorbent assay with secondary antibody. *Analytica Chimica Acta* **461**(2), 229-233.

Cohen, M., Fruitier-Arnaudin, I., Garreau-Balandier, I. & Piot, J.M. (2003a) Microplate assay for determination of cathepsin D activity based on quantification of a specific and stable peptide released from hemoglobin: VV-hemorphin-7. *Analytica Chimica Acta* **486**(1), 21-29.

Cohen, M., Fruitier-Arnaudin, I. & Piot, J.M. (2004) Hemorphins: Substrates and/or inhibitors of dipeptidyl peptidase IV - Hemorphins N-terminus sequence influence on the interaction between hemorphins and DPPIV. *Biochimie* **86**(1), 31-37.

Cohen, M., Fruitier-Arnaudin, I., Sauvan, R., Birnbaum, D. & Piot, J.M. (2003b) Serum levels of Hemorphin-7 peptides in patients with breast cancer. *Clin Chim Acta* **337**, 59-67.

Collinder, E., Nyberg, F., Sanderson-Nydahl, K., Gottlieb-Vedi, M. & Lindholm, A. (2005) The opioid haemorphin-7 in horses during low-speed and high-speed treadmill exercise to fatigue. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine* **52**(4), 162-165.

Culman, J., Baulmann, J., Blume, A. & Unger, T. (2001) The renin-angiotensin system in the brain: an update. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **2**(2), 96-102.

Czech, M.P. & Corvera, S. (1999) Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem.* **274**(4), 1865-8.

Dagouassat, N., Garreau, I., Sannier, F., Zhao, Q. & Piot, J.M. (1996) Generation of VV-hemorphin-7 from globin by peritoneal macrophages. *FEBS Letters* **382**(1-2), 37-42.

Davis, T.P., Gillespie, T.J. & Porreca, F. (1989) Peptide fragments derived from the Î²-chain of hemoglobin (hemorphins) are centrally active in vivo. *Peptides* **10**(4), 747-751.

De Bundel, D., Demaegdt, H., Lahoutte, T., Caveliers, V., Kersemans, K., Ceulemans, A.G., Vauquelin, G., Clinckers, R., Vanderheyden, P., Michotte, Y. & Smolders, I. (2010) Involvement of the AT1 receptor subtype in the effects of angiotensin IV and LVV-haemorphin 7 on hippocampal neurotransmitter levels and spatial working memory. *J Neurochem.* **112**(5), 1223-1234.

De Bundel , D., Smolders, I., Yang, R., Albiston, A.L., Michotte, Y. & Chai, S.Y. (2009) Angiotensin IV and LVV-haemorphin 7 enhance spatial working memory in rats: effects on hippocampal glucose levels and blood flow. *Neurobiol Learn Mem.* **92**(1), 19-26.

Demaegdt, H., Vanderheyden, P., De Backer, J.P., Mosselmans, S., Laeremans, H., Le, M.T., Kersemans, V., Michotte, Y. & Vauquelin, G. (2004) Endogenous cystinyl aminopeptidase in Chinese hamster ovary cells: Characterization by [125I]Ang IV binding and catalytic activity. *Biochemical Pharmacology* **68**(5), 885-892.

Duethman, D., Dewan, N. & Conlon, J.M. (2000) Isolation of the opioid peptide Leu-Val-Val-hemorphin-7 from bronchoalveolar lavage fluid of a patient with non-small cell lung cancer. *Peptides* **21**(1), 137-142.

Dzau, V.J., Bernstein, K., Celermajer, D., Cohen, J., Dahlof, B., Deanfield, J., Diez, J., Drexler, H., Ferrari, R., Van Gilst, W., Hansson, L., Hornig, B., Husain, A., Johnston, C., Lazar, H., Lonn, E., Luscher, T., Mancini, J., Mimran, A., Pepine, C., Rabelink, T., Remme, W., Ruilope, L., Ruzicka, M., Schunkert, H., Swedberg, K., Unger, T., Vaughan, D. & Weber, M. (2002) Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report. *Cardiovasc Drugs Ther.* **16**(2), 149-60.

El Messari, S., Leloup, C., Quignon, M., Brisorgueil, M.J., Penicaud, L. & Arluison, M. (1998) Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (Glut4) in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* **399**(4), 492-512.

Erchegyi, J., Kastin, A.J. & Zadina, J.E. (1992) Isolation of a novel tetrapeptide with opiate and antiopiate activity from human brain cortex: Tyr-Pro-Trp-Gly-NH2 (Tyr-W-MIF-1). *Peptides* **13**(4), 623-631.

Fernando, R.N., Albiston, A.L. & Chai, S.Y. (2008) The insulin-regulated aminopeptidase IRAP is colocalised with GLUT4 in the mouse hippocampus - Potential role in modulation of glucose uptake in neurones? *European Journal of Neuroscience* **28**(3), 588-598.

Fernando, R.N., Luff, S.E., Albiston, A.L. & Chai, S.Y. (2007) Sub-cellular localization of insulin-regulated membrane aminopeptidase, IRAP to vesicles in neurons. *Journal of Neurochemistry* **102**(3), 967-976.

Franklin, S.S., Larson, M.G., Khan, S.A., Wong, N.D., Leip, E.P., Kannel, W.B. & Levy, D. (2001) Does the relation of blood pressure to coronary heart disease risk change with aging? The Framingham Heart Study. *Circulation* **103**(9), 1245-9.

Freije, J.M., Balbin, M., Pendas, A.M., Sanchez, L.M., Puente, X.S. & Lopez-Otin, C. (2003) Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv Exp Med Biol.* **532**, 91-107.

Fruitier-Arnaudin, I., Cohen, M, Nervi, S., Bordenave, S., Sannier, F. & Piot, J.M. (2003) Reduced level of opioid peptides, hemorphin-7 peptides, in serum of diabetic patients *Diabetes Care* **26**(8), 2480.

Fruitier-Arnaudin, I., Cohen, M., Bordenave, S., Sannier, F. & Piot, J.M. (2002) Comparative effects of angiotensin IV and two hemorphins on angiotensin-converting enzyme activity. *Peptides* **23**(8), 1465-1470.

Fruitier-Arnaudin, I., Cohen, M., Coitoux, C. & Piot, J.M. (2003) In vitro metabolism of LVV-Hemorphin-7 by renal cytosol and purified prolyl endopeptidase. *Peptides* **24**(8), 1201-1206.

Fruitier, I. (1999) Les hémorphines : peptides biologiquement actifs issus de l'hémoglobine. Détermination d'une voie potentielle de biosynthèse et de dégradation *in vivo* et mise ne évidence de sites récepteurs cibles. Thèse de doctorat, Université La Rochelle.

Fruitier, I., Garreau, I., Lacroix, A., Cupo, A. & Piot, J.M. (1999) Proteolytic degradation of hemoglobin by endogenous lysosomal proteases gives rise to bioactive peptides: Hemorphins. *FEBS Letters* **447**(1), 81-86.

Fruitier, I., Garreau, I. & Piot, J.M. (1998) Cathepsin D is a good candidate for the specific release of a stable hemorphin from hemoglobin in vivo: VV-hemorphin-7. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **246**(3), 719-724.

Gans, R.O. & Donker, A.J. (1991) Insulin and blood pressure regulation. *J Intern Med Suppl. 1991;735:49-64.* **735**, 49-64.

Garreau, I., Chansel, D., Vandermeersch, S., Fruitier, I., Piot, J.M. & Ardaillou, R. (1998) Hemorphins inhibit angiotensin IV binding and interact with aminopeptidase N. *Peptides* **19**(8), 1339-1348.

Garreau, I., Cucumel, K., Dagouassat, N., Zhao, Q., Cupo, A. & Piot, J.M. (1997) Hemorphin peptides are released from hemoglobin by Cathepsin D. Radioimmunoassay against the C-part of V-V-hemorphin-7: An alternative assay for the Cathepsin D activity. *Peptides* **18**(2), 293-300.

Gil, H., Mata-Segreda, J. & Schowen, R. (1991) Effect of non-enzymic glycosylation on reactivity in proteolysis. *Acta Cient Venez.* **42**(1), 16-23.

Glagov, S., Weisenberg, E., Zarins, C.K., Stankunavicius, R. & Kolettis, G.J. (1987) Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med. 1987 May 28;316(22):1371-5.* **316**(22), 1371-5.

Glamsta, E.-L., Meyerson, B., Silberring, J., Terenius, L. & Nyberg, F. (1992a) Isolation of a hemoglobin-derived opioid peptide from cerebrospinal fluid of patients with cerebrovascular bleedings. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **184**(2), 1060-1066.

Glamsta, E.L., Marklund, A., Hellman, U., Wernstedt, C., Terenius, L. & Nyberg, F. (1991) Isolation and characterization of a hemoglobin-derived opioid peptide from the human pituitary gland. *Regul Pept.* **34**(3), 169-79.

Glamsta, E.L., Morkrid, L., Lantz, I. & Nyberg, F. (1993) Concomitant increase in blood plasma levels of immunoreactive hemorphin-7 and beta-endorphin following long distance running. *Regulatory Peptides* **49**(1), 9-18.

Glamsta, E.L., Nyberg, F. & Silberring, J. (1992b) Application of fast-atom bombardment mass spectrometry for sequencing of a hemoglobin fragment, naturally occurring in human cerebrospinal fluid. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **6**(12), 777-780.

Glondu, M., Liaudet-Coopman, E., Derocq, D., Platet, N., Rochefort, H. & Garcia, M. (2002) Down-regulation of cathepsin-D expression by antisense gene transfer inhibits tumor growth and experimental lung metastasis of human breast cancer cells. *Oncogene.* **21**(33), 5127-34.

Greene, K.L., Albertsen, P.C., Babaian, R.J., Carter, H.B., Gann, P.H., Han, M., Kuban, D.A., Sartor, A.O., Stanford, J.L., Zietman, A. & Carroll, P. (2009) Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update. *The Journal of Urology* **182**(5), 2232-41.

Harding, J.W., Cook, V.I., Miller-Wing, A.V., Hanesworth, J.M., Sardinia, M.F., Hall, K.L., Stobb, J.W., Swanson, G.N., Coleman, J.K. & Wright, J.W. (1992) Identification of an AII(3-8) [AIV] binding site in guinea pig hippocampus. *Brain Res. 1992 Jun 26;583(1-2):340-3.* **583**(1-2), 340-3.

Harding, J.W., Wright, J.W., Swanson, G.N., Hanesworth, J.M. & Krebs, L.T. (1994) AT4 receptors: specificity and distribution. *Kidney Int.* **46**(6), 1510-2.

Hino, M., Fuyamada, H. & Hayakawa, T. (1976) X prolyl dipeptidyl aminopeptidase activity, with X proline p nitroanilides as substrates, in normal and pathological human sera. *Clinical Chemistry* **22**(8), 1256-1261.

Jarmolowska, B., Bielikowicz, K., Iwan, M., Sidor, K., Kostyra, E. & Kaczmarski, M. (2007) Serum activity of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV; EC 3.4.14.5) in breast-fed infants with symptoms of allergy. *Peptides* **28**(3), 678-682.

Kanter, J.E., Averill, M.M., Leboeuf, R.C. & Bornfeldt, K.E. (2008) Diabetes-accelerated atherosclerosis and inflammation. *Circ Res.* **103**(8), 116-7.

Karelin, A.A., Filippova, M.M., Iatskin, O.N., Blishchenko, E.Y., Nazimov, I.V. & Ivanov, V.T. (1998) [Proteolytic degradation of hemoglobin in erythrocytes results in formation of biologically active peptides]. *Bioorg Khim.* **24**(4), 271-81.

Karelin, A.A., Philippova, M.M., Karelina, E.V. & Ivanov, V.T. (1994) Isolation of endogenous hemorphin-related hemoglobin fragments from bovine brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **202**(1), 410-415.

Keller, S.R., Davis, A.C. & Clairmont, K.B. (2002) Mice deficient in the insulin-regulated membrane aminopeptidase show substantial decreases in glucose transporter GLUT4 levels but maintain normal glucose homeostasis. *J Biol Chem* **277**(20), 17677-86.

Keller, S.R., Scott, H.M., Mastick, C.C., Aebersold, R. & Lienhard, G.E. (1995) Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles. *J Biol Chem.* **270**(4), 23612-8.

Kino, K., Mizumoto, K., Watanabe, J. & Tsunoo, H. (1987) Immunohistochemical studies on hemoglobin-haptoglobin and hemoglobin catabolism sites. *J Histochem Cytochem.* **35**(3), 381-6.

Lantz, I., Glamsta, E.-L., Talback, L. & Nyberg, F. (1991) Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity. *FEBS Letters* **287**(1-2), 39-41.

Larsen, M.I., Horder, M. & Mogensen, E.F. (1990) Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med. 1987 May 28;316(22):1371-5.* **323**(15), 1021-5.

Laustsen, P.G., Vang, S. & Kristensen, T. (2001) Mutational analysis of the active site of human insulin-regulated aminopeptidase. *Eur J Biochem.* **268**(1), 98-104.

Lee, J., Albiston, A.L., Allen, A.M., Mendelsohn, F.A.O., Ping, S.E., Barrett, G.L., Murphy, M., Morris, M.J., McDowall, S.G. & Chai, S.Y. (2004) Effect of I.C.V. injection of AT4 receptor ligands, NLE 1-angiotensin IV and LVV-hemorphin 7, on spatial learning in rats. *Neuroscience* **124**(2), 341-349.

Lee, J., Chai, S.Y., Mendelsohn, F.A.O., Morris, M.J. & Allen, A.M. (2001) Potentiation of cholinergic transmission in the rat hippocampus by angiotensin IV and LVV-hemorphin-7. *Neuropharmacology* **40**(4), 618-623.

Lee, J., Mustafa, T., McDowall, S.G., Mendelsohn, F.A.O., Brennan, M., Lew, R.A., Albiston, A.L. & Chai, S.Y. (2003) Structure-activity study of LVV-hemorphin-7: Angiotensin AT4 receptor ligand and inhibitor of insulin-regulated aminopeptidase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **305**(1), 205-211.

Lew, R.A., Mustafa, T., Ye, S., McDowall, S.G., Chai, S.Y. & Albiston, A.L. (2003) Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP). *Journal of Neurochemistry* **86**(2), 344-350.

Liu, J., Ma, L., Yang, J. & Ren, A. (2006) Increased serum cathepsin S in patients with atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis* (186), 411-9.

Mäkinen, K.K., Sewon, L. & Mäkinen, P.-L. (1996) Analysis in gingival crevicular fluid of two oligopeptides derived from human hemoglobin beta-chain. *Journal of Periodontal Research* **31**(1), 43-46.

Matsumoto, H., Nagasaka, T., Hattori, A., Rogi, T., Tsuruoka, N., Mizutani, S. & Tsujimoto, M. (2001) Expression of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in neuronal cells and its action on neuronal peptides. *Eur J Biochem.* **268**(11), 3259-66.

Moeller, I., Albiston, A.L., Lew, R.A., Mendelsohn, F.A.O. & Chai, S.Y. (1999) A globin fragment, LVV-hemorphin-7, induces [3H]thymidine incorporation in a neuronal cell line via the AT4 receptor. *Journal of Neurochemistry* **73**(1), 301-308.

Moeller, I., Lew, R.A., Mendelsohn, F.A.O., Smith, A.I., Brennan, M.E., Tetaz, T.J. & Chai, S.Y. (1997) The globin fragment LVV-hemorphin-7 is an endogenous ligand for the AT4 receptor in the brain. *Journal of Neurochemistry* **68**(6), 2530-2537.

Moisan, S., Harvey, N., Beaudry, G., Forzani, P., Burhop, K.E., Drapeau, G. & Rioux, F. (1998) Structural requirements and mechanism of the pressor activity of Leu- Val-Val-hemorphin-7, a fragment of hemoglobin ?-chain in rats. *Peptides* **19**(1), 119-131.

Montcourrier, P., Mangeat, P.H., Valembois, C., Salazar, G., Sahuquet, A., Duperray, C. & Rochefort, H. (1994) Characterization of very acidic phagosomes in breast cancer cells and their association with invasion. *J Cell Sci.* **107**(9), 2381-91.

Norgaard, K., Feldt-Rasmussen, B., Borch-Johnsen, K., Saelan, H. & Deckert, T. (1990) Prevalence of hypertension in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* **33**(7), 407-10.

Nyberg, F., Sanderson, K. & Glamsta, E.-L. (1997a) The hemorphins: A new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin. *Biopolymers - Peptide Science Section* **43**(2), 147-156.

Nyberg, F., Sanderson, K. & Glamsta, E.L. (1997b) The hemorphins: A new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin. *Biopolymers - Peptide Science Section* **43**(2), 147-156.

Nyberg, G., Sanderson, K., Andren, P., Thornwall, M., Einarsson, M., Danielson, B. & Nyberg, F. (1996) Isolation of haemorphin-related peptides from filter membranes collected in connection with haemofiltration of human subjects. *Journal of Chromatography A* **723**(1), 43-49.

Park, I.J., Choi, G.S. & Jun, S.H. (2009) Prognostic value of serum tumor antigen CA19-9 after curative resection of colorectal cancer. *Anticancer Res.* **29**(10), 4303-8.

Paterson, J. (1938) Capillary rupture with intimal hemorrhage as a causative factor in coronary thrombus. *Arch Pathol Lab Med* **25**(474-487).

Perneger, T.V., Brancati, F.L., Whelton, P.K. & Klag, M.J. (1994) End-stage renal disease attributable to diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* **121**(12), 912-8.

Pimenta, D.C. & Lebrun, I. (2007) Cryptides: Buried secrets in proteins. *Peptides* **28**(12), 2403-2410.

Piot, J.M., Zhao, Q., Guillochon, D., Ricart, G. & Thomas, D. (1992) Isolation and characterization of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **189**(1), 101-110.

Poljak, A., McLean, C.A., Sachdev, P., Brodaty, H. & Smythe, G.A. (2004) Quantification of Hemorphins in Alzheimer's Disease Brains. *Journal of Neuroscience Research* **75**(5), 704-714.

Pollak, A., Lubec, G., Coradello, H., Gherardini, R., Maxa, E. & Leban, J. (1982) Reduced susceptibility of glycosylated hemoglobin to proteolytic cleavage. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch.* **109**(4), 621-30.

Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M. & Lopez-Otin, C. (2003) Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet.* **4**(7), 544-58.

Recklies, A.D., Tiltman, K.J., Stoker, T.A. & Poole, A.R. (1980) Secretion of proteinases from malignant and nonmalignant human breast tissue. *Cancer Res.* **40**(3), 550-6.

Ross, S.A., Herbst, J.J., Keller, S.R. & Lienhard, G.E. (1997) Trafficking kinetics of the insulin-regulated membrane aminopeptidase in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **239**(1), 247-51.

Sakalihasan, N.L., R. & Defawe, O.D. (2005) Abdominal aortic aneurysm. *Lancet. 2005* **365**(9470), 1577-89.

Scheffler, H., Koch, G., Brantl, V. & Teschemacher, H. (1990) Release of opioid peptide immunoreactive materials from pituitary tissue upon stimulation with a hemoglobin fragment, hemorphin-4, in vitro. In *New leads in opioid research: proceedings of the International Narcotics Research Conference. ICS914*, p. 379.

Silvy, M., Giusti, C., Martin, P.M. & Berthois, Y. (2001) Differential regulation of cell proliferation and protease secretion by epidermal growth factor and amphiregulin in tumoral versus normal breast epithelial cells. *Br. J. Cancer* **84**(7), 936-45.

Skold, K., Svensson, M., Kaplan, A., Bjorkesten, L., Astrom, J. & Andren, P.E. (2002) A neuroproteomic approach to targeting neuropeptides in the brain. *Proteomics* **2**(4), 447-454.

Smith, R. & Turk, V. (1974) Cathepsin D: rapid isolation by affinity chromatography on haemoglobin agarose resin. *European Journal of Biochemistry* **48**(1), 245-254.

Stern, M.P. (1995) Diabetes and cardiovascular disease. The "common soil" hypothesis. *Diabetes* **44**(4), 369-74.

Stragier, B., Sarre, S., Vanderheyden, P., Vauquelin, G., FourniÃ©-Zaluski, M.C., Ebinger, G. & Michotte, Y. (2004) Metabolism of angiotensin II is required for its in vivo effect on dopamine release in the striatum of the rat. *Journal of Neurochemistry* **90**(5), 1251-1257.

Sumitani, S., Ramlal, T., Somwar, R., Keller, S.R. & Klip, A. (1997) Insulin regulation and selective segregation with glucose transporter-4 of the membrane aminopeptidase vp165 in rat skeletal muscle cells. *Endocrinology.* **138**(3), 1029-34.

Svendsen, P.A., Christiansen, J.S., Soegaard, U. & Nerup, J. (1981) Synthesis of glycosylated haemoglobin in vivo. *Diabetologia. 1981* **21**(6), 549-53.

Swanson, G.N., Hanesworth, J.M., Sardinia, M.F., Coleman, J.K., Wright, J.W., Hall, K.L., Miller-Wing, A.V., Stobb, J.W., Cook, V.I. & Harding, E.C. (1992) Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept.* **40**(3), 409-19.

Taleb, S. & Clement, K. (2007) Emerging role of cathepsin S in obesity and its associated diseases. *Clin Chem Lab Med.* **45**(3), 328-32.

Thomas, W.G. & Mendelsohn, F.A. (2003) Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Int J Biochem Cell Biol.* **35**(6), 774-9.

Vanderheyden, P.M.L. (2009) From angiotensin IV binding site to AT4 receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* **302**(2), 159-166.

Villanueva, J., Shaffer, D.R., Philip, J., Chaparro, C.A., Erdjument-Bromage, H., Olshen, A.B., Fleisher, M., Lilja, H., Brogi, E., Boyd, J., Sanchez-Carbayo, M., Holland, E.C., Cordon-Cardo, C., Scher, H.I. & Tempst, P. (2006) Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. *J Clin Invest.* **116**(1), 271-84.

Waters, S.B., D'Auria, M., Martin, S.S., Nguyen, C., Kozma, L.M. & Luskey, K.L. (1997) The amino terminus of insulin-responsive aminopeptidase causes Glut4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **272**(37), 23323-7.

Weykamp, C.W., Penders, T.J., Muskiet, F.A. & van der Slik, W. (1994) Effect of calibration on dispersion of glycohemoglobin values determined by 111 laboratories using 21 methods. *Clin Chem* **40**(1), 138-44.

Wheatcroft, S.B., Williams, I.L., Shah, A.M. & Kearney, M.T. (2003) Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med.* **20**(4), 255-68.

Woessner, J.F. (1972) Pepstatin inhibits the digestion of hemoglobin and protein-polysaccharide complex by cathepsin D. *Biochem Biophys Res Commun.* **47**(4), 965-70.

Woo, C.H., Shishido, T., McClain, C., Lim, J.H., Li, J.D., Yang, J., Yan, C. & Abe, J. (2008) Extracellular signal-regulated kinase 5 SUMOylation antagonizes shear stress-

induced antiinflammatory response and endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Circ Res.* **102**(5), 538-45.

Ye, S., Chai, S.Y., Lew, R.A. & Albiston, A.L. (2007) Insulin-regulated aminopeptidase: Analysis of peptide substrate and inhibitor binding to the catalytic domain. *Biological Chemistry* **388**(4), 399-403.

Yukhananov, R.Y., Glamsta, E.L. & Nyberg, F. (1994) Interaction of hemorphins with opioid receptors in the rat vas deferens and guinea-pig ileum. *Regulatory Peptides* (SUPPL. 1).

Zaman, M.A., Oparil, S. & Calhoun, D.A. (2002) Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov.* **1**(8), 621-36.

Zhao, Q., Sannier, F., Garreau, I., Lecoeur, C. & Piot, J.M. (1996) Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with second-order derivative spectroscopy for the quantitation of aromatic amino acids in peptides: Application to hemorphins. *Journal of Chromatography A* **723**(1), 35-41.

Zhou, M., Peng, J.R., Wang, H.X., Zhong, Z.H., Guo, Y.T., Pan, X.Y. & Leng, X.S. (2005) Identification of a natural opioid peptide Leu-Val-Val-hemorphin-6 in hepatocarcinoma cells of a patient by LC-MS. *Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology* **13**(8), 617.

Zhou, M., Peng, J.R., Zhong, Z.H., Tu, X.Q., Chang, Y.B., Jiao, G.J. & Leng, X.S. (2006) Role of opioid peptide Leu-Val-Val-hemorphin-6 in hepatocellular carcinoma. *World Chinese Journal of Digestology* **14**(31), 3020-3025.

Annexes

Articles publiés pendant la thèse :

Article 1 :
Significant lower VVH7-like immunoreactivity serum level in diabetic patients: evidence for independence from metabolic control and three key enzymes in hemorphin metabolism, cathepsin D, ACE and DPP-IV. Feron D, Begu-Le Corroller A., Piot JM., Fruitier-Arnaudin I. *Peptides* 30 (2009) 256–261.

Article 2 :

Hemorphin-7 reflects Hemoglobin Proteolysis in Abdominal Aortic Aneurysm. Dejouvencel T., Feron D., Rossignol P., Sapoval M., Kauffmann C., Piot J.M., Michel J.B., Fruitier-Arnaudin I., Meilhac O. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:269-275.

Article 3: Proteolytic degradation by cathepsin D of glycated hemoglobin from diabetes patients gives rise to hemorphin-7 peptides. Feron D, Piot JM., Fruitier-Arnaudin I. Peptides (2010) (*sous-presse)*

Significations physiopathologiques des hémorphines de type 7 dans le diabète et les cancers broncho-pulmonaire

Résumé :
Les hémorphines représentent une classe de peptides cryptiques bioactifs issus de la protéolyse de la chaîne β de l'hémoglobine dont la présence *in vivo* a souvent été associée à des conditions physiologiques ou pathologiques particulières, comme les cancers. De ce fait, l'hypothèse d'utiliser ces peptides comme marqueur de pathologies avaient déjà été posée. Des études récentes au laboratoire ont montré que leur concentration sérique était diminuée chez les patients diabétiques. Afin de confirmer cette étude, nous avons travaillé sur une cohorte de 120 patients atteints de diabète de type 1 et 2 et nous avons étudié les différentes hypothèses permettant d'expliquer cette diminution : métabolisme des hémorphines, impact de l'hémoglobine glyquée sur la libération des peptides. De plus, nous avons cherché à connaître le rôle de LVVH7 dans la signalisation insulinique. Les résultats obtenus suggèrent que la diminution de la concentration sérique des hémorphines de type 7 est spécifique du diabète mais que la glycation de l'hémoglobine n'a pas d'impact sur la libération des hémorphines. Parallèlement à cette étude, nous avons caractérisé les hémorphines de type 7 dans le microenvironnement du cancer broncho-pulmonaire. La cathepsine D, enzyme impliquée dans la libération de LVVH7 et VVH7 ainsi que dans le microenvironnement tumoral, a été étudié dans des cultures de lignées de cancers broncho-pulmonaires acidifiée et donc propice à la progression tumorale. Les résultats ont permis de confirmer la présence de la cathepsine D dans le surnageant de cultures des cellules cancéreuses. De plus, nous avons montré la libération d'hémorphines de type 7 dans des milieux de culture acidifiés.

Mots clés : hémorphines, diabète, cancer broncho-pulmonaire, cathepsine D, protéolyse de l hémoglobine

Physiopathological significations of hemorphin-7 in diabetes and lung cancers

Abstract:
Hemorphins are cryptic bioactive peptides derived from β chain of haemoglobin proteolysis. Their biological presence has often been associated with physiological or pathological conditions, like cancers. Thus, it was already suggested that hemorphins could be used as marker of pathology. Previous studies achieved in our laboratory demonstrated that hemorphin-7 was decreased in serum of diabetic patients. To confirm these previous results, we worked on a population of 120 patients with type 1 and type 2 diabetes and we studied different hypothesis: hemorphins metabolism, impact of glycated haemoglobin. Moreover, we researched the role of LVVH7 in insulin signalisation. The results suggested that hemorphin-7 concentrations in serum of diabetic patients are specific of this pathology but glycation of haemoglobin have no impact on liberation of hemorphins.
In parallel, we characterized hemorphin-7 in tumor progression of lung cancers. Cathepsin D, previously demonstrated as a key enzyme in hemorphins generation and also in tumor progression, has been studied *in vitro* in lung cancers, cultured in acidified conditions, favourable to metastasis. In addition, we also identified hemorphin-7 liberation in acidified media culture.

Keywords : hemorphins, diabetes, lung cancer, cathepsin D, haemoglobin proteolysis

Laboratoire Littoral Environnement et SociétéS
UMR 6250 CNRS
Avenue Michel Crépeau - Bâtiment Marie Curie
17042 La Rochelle Cédex 1