



HAL
open science

Étude des modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine dans le diabète de type 2 : identification de biomarqueurs de glycoxydation et de facteurs de risque de complications vasculaires

Alexis Guérin-Dubourg

► **To cite this version:**

Alexis Guérin-Dubourg. Étude des modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine dans le diabète de type 2 : identification de biomarqueurs de glycoxydation et de facteurs de risque de complications vasculaires. Médecine humaine et pathologie. Université de la Réunion, 2014. Français. NNT : 2014LARE0017 . tel-01144369

HAL Id: tel-01144369

<https://theses.hal.science/tel-01144369>

Submitted on 21 Apr 2015

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.



THESE

Présentée pour l'obtention du titre de Docteur de l'université de la Réunion

Spécialité : BIOCHIMIE

Etude des modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine dans le diabète de type 2 : identification de biomarqueurs de glycoxydation et de facteurs de risque de complications vasculaires

Par

Alexis Guerin-Dubourg

*Soutenue publiquement le mercredi 03 décembre 2014
Amphithéâtre Charpak, Saint Denis de La Réunion*

| | | |
|-------------------------|--|---------------------|
| Pr. P. GILLERY | Professeur et Praticien Hospitalier, CHU Reims | Rapporteur |
| Pr. D. GRUSON | Professeur, Clinique Universitaire St Luc, Bruxelles | Rapporteur |
| Dr. O. M EILHAC | Directeur de Recherches INSERM , Uté de La Réunion | Examineur |
| Dr. M COURNOT | Docteur et Praticien Hospitalier, CH G.M artin, St Paul | Examineur |
| Pr E. BOURDON | Professeur, Université de la Réunion | Directeur |
| DrHDR P. RONDEAU | Ingénieur d'Etudes, Université de la Réunion | Co-Directeur |

L'ensemble des travaux de cette thèse de sciences ont été réalisés au sein du laboratoire GEICO-UFR Santé-Université de La Réunion et du laboratoire de Biochimie du CHU La Réunion-Hôpital Félix Guyon.

Je tiens à remercier premièrement tous ceux qui m'ont soutenu dans ce projet avant même la création sinon aux premières heures du CHU et de l'UFR-Santé Université de La Réunion:

- Professeur Pascale **GUIRAUD** (Doyen de l'UFR Santé) : merci pour ton soutien amical, ta confiance toujours affirmée à mon égard et pour m'avoir permis de m'épanouir dans mes activités de recherche et d'enseignement à l'UFR Santé ces 4 dernières années.
- M. David **GRUSON** (Directeur général du CHU) et M. Lionel **CALENGE** (Directeur Général Adjoint du CHU) merci pour votre confiance, votre disponibilité et pour m'avoir soutenu dans la réalisation de cette projet.
- Professeur Christian **LEFEBVRE D'HELLENCOURT** (Directeur du GEICO) : merci de m'avoir accueilli dès mon stage de master 2 dans ton laboratoire, pour tes conseils avisés et pour tes encouragements à poursuivre ces travaux dans le cadre d'un doctorat.
- Dr Xavier **DEBUSSCHE** (Président de la DRCI) : tu m'as accompagné dès mon arrivée au CHR, tu m'as toujours encouragé à aller de l'avant et à me projeter bien au-delà de mes propres ambitions. Merci pour ton soutien, ton amitié, tes conseils et pour m'avoir présenté bon nombre des acteurs de la recherche à La Réunion.
- M. Christian **MERIAU** (Directeur du CYROI) : pour ton accueil toujours chaleureux au CYROI, merci d'avoir systématiquement défendu mes différents projets.
- Dr Maya **CESARI** (Directeur scientifique – CYROI), pour m'avoir accompagné dans ma recherche initiale d'un stage de M2 sur l'île de La Réunion, pour m'avoir mis en relation avec le duo Emmanuel Bourdon - Philippe Rondeau. Merci pour ta bienveillance.
- Dr Frank **TALLET** (Chef du Pôle Plateau Technique – Chef de service de Biochimie – CHU La Réunion) pour m'avoir accueilli les bras ouverts dans ton laboratoire, pour m'avoir permis d'effectuer ces travaux de recherche dans des conditions optimales. Merci Frank pour tes encouragements, ton amitié et tous tes conseils prodigués durant nos années de travail en commun. Je tacherai d'en faire bon usage.

C'est grâce à votre engagement à tous que ce projet a pu se concrétiser. Sans vous La Réunion ne disposerait pas aujourd'hui d'outils performants d'encadrement pédagogique en sciences de la santé, en biochimie et en recherche clinique.

Je remercie tout particulièrement les acteurs principaux de cette thèse qui m'ont accompagné durant ces 4 années de travail :

A Monsieur **Emmanuel BOURDON**, Professeur Universitaire, Responsable pédagogique et Directeur de Thèse : pour m'avoir accompagné avec bienveillance et patience tout au long de ces années. Pour avoir su me soutenir et encourager quand il le fallait. Je te remercie, ainsi que l'ensemble du groupe GEICO, de m'avoir donné l'envie et le goût de poursuivre dans la recherche et de finaliser ce travail de thèse.

A Monsieur **Philippe RONDEAU**, Ingénieur d'Etudes, HDR et Co-Directeur de Thèse : rien de ces travaux n'aurait pu être possible sans ta contribution. Je te remercie pour ton encadrement et ton expertise technique si précise. Vous formez avec Emmanuel un duo remarquable de complémentarité et vous m'avez fait découvrir une vision conviviale et humaine de la recherche. Merci aussi d'avoir su entrecouper ces travaux par des pauses gastronomiques fromagères savoyardes, que je qualifierai de « tartiflesques », dont toi seul a le secret.

A Monsieur **Olivier MELHAC**, Directeur de Recherche : ton enthousiasme et ton énergie désormais légendaires sont pour moi une source d'inspiration formidable. Merci pour ton soutien amical, ton accueil dans la future équipe DETROI et pour tes encouragements. J'espère sincèrement que l'avenir nous donnera l'opportunité de travailler sur des projets communs.

A Jennifer **BARAKA-VIDOT**, pour nos échanges scientifiques, professionnels et amicaux durant ces 4 années qui auront contribué à nos travaux respectifs. Je te souhaite un bel avenir dans la recherche scientifique.

A Aurélie **CATAN** et Cynthia **PLANESSE** pour votre participation active à ces travaux et pour vos sourires qui m'ont toujours accueillis.

Je remercie également Mlle **CURDY**, Messieurs **ROBERT** et **MAILLOT**, techniciens de laboratoire, qui m'ont aidé à recueillir les prélèvements nécessaires à cette étude.

Merci aussi à Monsieur Adrian **FIANU** (Biostatisticien : CIC – CHU La Réunion) pour le temps précieux que tu as su m'accorder dans l'expression méthodologique et statistique de mes idées. Bon courage à toi pour la fin de ton projet de thèse.

A tous les **membres du GEICO** qui devient aujourd'hui une des premières unités INSERM de La Réunion : merci aux enseignants chercheurs, doctorants et techniciens de recherche pour votre accueil et votre convivialité, ce fut toujours un très grand plaisir de quitter mon laboratoire de biologie médicale pour venir me rafraîchir les idées dans votre laboratoire de recherche.

A mes grand-mères,

A mes parents,

A mes amis,

A Emeline, ma moitié

A Barnabé, Sacha et Clémentine nos enfants chéris

Ce sont vos sourires qui me donnent la force d'avancer...

ABREVIATIONS

| | |
|-------------------------------|---|
| <i>ADA</i> | <i>American Diabetes Association</i> |
| <i>ADP</i> | <i>Adenosine diphosphate</i> |
| <i>AGEs</i> | <i>Advanced Glycation End Products</i> |
| <i>AGJ</i> | <i>Anomalie de glycémie à jeun</i> |
| <i>AOMI</i> | <i>Artériopathie oblitérante des membres inférieurs</i> |
| <i>AOPPs</i> | <i>Produits d'oxydation protéiques avancés</i> |
| <i>APP</i> | <i>Amyloid protein precursor</i> |
| <i>AVC</i> | <i>Accident Vasculaire Cérébral</i> |
| <i>bFGF</i> | <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> |
| <i>CML</i> | <i>Carboxy Methyl Lysine</i> |
| <i>CRP</i> | <i>Protéine C-réactive</i> |
| <i>CV</i> | <i>Cardiovasculaire</i> |
| <i>DAG</i> | <i>Diacylglycérol</i> |
| <i>DDI</i> | <i>D-Dimères</i> |
| <i>DN-RAGE</i> | <i>Dominant Negative RAGE</i> |
| <i>eNOS</i> | <i>Endothelial nitric oxyde synthase</i> |
| <i>esRAGE</i> | <i>Endogenous secretory RAGE</i> |
| <i>FID</i> | <i>Fédération Internationale du Diabète</i> |
| <i>FR</i> | <i>Facteurs de risque</i> |
| <i>GA</i> | <i>Glycated Albumin</i> |
| <i>GPxs</i> | <i>Glutathion peroxydases</i> |
| <i>HAS</i> | <i>Haute Autorité de Santé</i> |
| <i>HbA1c</i> | <i>Hémoglobine glyquée</i> |
| <i>HDL</i> | <i>High density lipoprotein</i> |
| <i>HGPO</i> | <i>hyperglycémie provoquée par voie orale</i> |
| <i>HMGB1</i> | <i>High mobility group box-1</i> |
| <i>HPLC</i> | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| <i>HTA</i> | <i>Hypertension Artérielle</i> |
| <i>ICAM-1</i> | <i>Intracellular adhesion molecule-1</i> |
| <i>IDL</i> | <i>Intermediate-density lipoprotein</i> |
| <i>IG</i> | <i>Intolérance au glucose</i> |
| <i>IL-1β</i> | <i>interleukine 1β</i> |
| <i>IL-6</i> | <i>Interleukine 6</i> |
| <i>IL-6</i> | <i>Interleukine 6</i> |
| <i>IL-8</i> | <i>Interleukine 8</i> |
| <i>IM</i> | <i>Infarctus du Myocarde</i> |
| <i>IMA</i> | <i>Ischemia Modified Albumin</i> |
| <i>IMT</i> | <i>Epaisseur Intima-Media (intima-media thickness)</i> |
| <i>InVS</i> | <i>Institut de Veille Sanitaire</i> |
| <i>IPS</i> | <i>Indice de pression systolique</i> |
| <i>IRS</i> | <i>Insulin Responsiv Element</i> |

| | |
|--------------------------------|---|
| <i>LDL</i> | <i>Low density lipoprotein</i> |
| <i>Lp-PLA2</i> | <i>Lipoprotein associated Phospholipase A2</i> |
| <i>MAPK</i> | <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> |
| <i>MCP-1</i> | <i>Monocyte chemotactic-protein-1</i> |
| <i>MCV</i> | <i>Maladie cardiovasculaire</i> |
| <i>mDia-1</i> | <i>Mammalian diaphanous1</i> |
| <i>MGO</i> | <i>Méthylglyoxal</i> |
| <i>NADH</i> | <i>Nicotinamide Adénine Dinucléotide</i> |
| <i>NADPH</i> | <i>Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate</i> |
| <i>NF-κB</i> | <i>Necrosis Factor kappa B</i> |
| <i>NO</i> | <i>Monoxyde d'azote</i> |
| <i>OMS</i> | <i>Organisation mondiale de la Santé</i> |
| <i>PAF</i> | <i>Platelet activating factor</i> |
| <i>PAI-1</i> | <i>Inhibiteur de l'activateur du plasminogène</i> |
| <i>PAS</i> | <i>Pression artérielle systolique</i> |
| <i>PGI2</i> | <i>Prostacycline</i> |
| <i>PI3K</i> | <i>Phosphoinositol 3 kinase</i> |
| <i>PKC</i> | <i>Protéines kinases C</i> |
| <i>RAGE</i> | <i>Receptor for advanced glycation end-products</i> |
| <i>RBP4</i> | <i>Rétinol-binding protein-4</i> |
| <i>RE</i> | <i>Réticulum endoplasmique</i> |
| <i>ROS</i> | <i>Reactiv Oxygen Species</i> |
| <i>SAA</i> | <i>Serum Amyloïde A</i> |
| <i>SCA</i> | <i>Syndrome coronarien aigu</i> |
| <i>SOD</i> | <i>Superoxide dismutase</i> |
| <i>sRAGE</i> | <i>RAGE solubles</i> |
| <i>TGF-β</i> | <i>Tumor Growth Factor (β)</i> |
| <i>TLR</i> | <i>Toll like receptor</i> |
| <i>TNF-α</i> | <i>Tumor Necrosis Factor-α</i> |
| <i>tPA</i> | <i>Activateur du plasminogène tissulaire</i> |
| <i>TT/TH</i> | <i>Rapport tour de taille/tour de hanches</i> |
| <i>VCAM-1</i> | <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i> |
| <i>VEGF</i> | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| <i>VLDL</i> | <i>very low-density lipoprotein</i> |
| <i>WHO</i> | <i>World Health Organization</i> |

TABLEAUX

- Tableau 1 *ERMIES données générales d'inclusion (moyenne +/- écart-type)*
- Tableau 2 *Données biologiques (moyenne +/- écart-type) présentées par sous-groupes d'atteintes vasculaires relevées à l'inclusion d'ERMIES (absence d'atteinte vasculaire vs. Complication vasculaire comparaison). Les variables sont comparées selon le test t de Student (en gras, $p < 0,2$).*
- Tableau 3 *Coefficients de corrélation de Spearman entre biomarqueurs de glycation (HbA1c, fructosamines, GA), d'oxydation (IMA) et de glycoxydation (AGEs). (* $p < 0,001$)*

FIGURES

- Figure n°1 *Prévalence du diabète de type 2. Données 2013 mondiales et répartition par continent*
- Figure n°2 *Mortalité liée au diabète chez les individus de moins de 60 ans*
- Figure n°3 *Mécanismes intracellulaires de l'insulinorésistance*
- Figure n°4 *Structure de la paroi vasculaire et place de l'endothélium vasculaire*
- Figure n°5 *Coupe schématique d'une artère saine et d'une artère artérioscléreuse : place de l'endothélium vasculaire*
- Figure n°6 *Dysfonction endothéliale et complications cardiovasculaires du diabète : athérosclérose, néphropathie et rétinopathie*
- Figure n°7 *Coupure Homolytique d'une molécule et production d'espèces radicalaires*
- Figure n° 8 *représentation schématique des mécanismes de production de ROS au cours du diabète*
- Figure n° 9 *Principaux sites de l'albumine impliqués dans son activité antioxydante*
- Figure n°10 *Mécanismes physiologiques de génération de ROS et principales défenses antioxydantes*
- Figure n°11 *Formation des produits d'Amadori et réarrangement oxydatifs en produits avancés de glycation – Phénomène de glycoxydation*
- Figure n°12 *Différentes formes d'AGEs rencontrés au cours du diabète*
- Figure n°13 *Structure tridimensionnelle de l'albumine : représentation des sites de liaison spécifique de Sudlow (type 1 et type 2) et des principaux sites de glycation (lysines)*

- Figure n°14 *Produits avancés de Glycation – Sources et implications physiopathologiques*⁹⁶
- Figure n°15 *Récepteurs RAGE – Principales Isoformes*
- Figure n°16 *Effets cellulaires de l'activation du RAGE – Transduction du Signal*
- Figure n°17 *Valeurs comparatives de concentrations plasmatiques de biomarqueurs (moyenne +/- écart-type) entre les groupes sans complication vasculaire vs. avec complication vasculaire*
- Figure n°18 *Distribution des valeurs d'IMA (DO) et d'IMA/Albumine entre les groupes sans complication vasculaire et avec complication vasculaire relevée à l'inclusion d'ERMIES. Représentation en box-plot (valeur minimale, 25^{ème} percentile, valeur médiane, 75^{ème} percentile et valeur maximale)*
- Figure n°19 *Courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) des paramètres biologiques IMA et de l'HbA1c rapportées à l'identification des atteintes vasculaires relevées à l'inclusion d'ERMIES. Données comparées d'aire sous la courbe*
- Figure n°20 *Distribution des valeurs d'AGE et de GA entre les groupes sans complication vasculaire et avec complication vasculaire relevée à l'inclusion d'ERMIES. Représentation en box-plot (valeur minimale, 25^{ème} percentile, valeur médiane, 75^{ème} percentile et valeur maximale)*

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| ABREVIATIONS..... | 9 |
| TABLEAUX..... | 11 |
| FIGURES..... | 12 |
| SOMMAIRE..... | 15 |
| INTRODUCTION | 18 |
| PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 21 |
| 1. LE DIABETE DE TYPE 2..... | 23 |
| 1.1. Définition..... | 23 |
| 1.2. Epidémiologie..... | 23 |
| 1.2.1. Epidémiologie mondiale..... | 23 |
| 1.2.2. Epidémiologie en France..... | 26 |
| 1.3. Diagnostic et suivi..... | 27 |
| 1.3.1. La glycémie..... | 27 |
| 1.3.2. L'hémoglobine glyquée (HbA1c)..... | 28 |
| 1.4. Etiologie et immunopathologie du diabète de type 2..... | 28 |
| 1.4.1. Les facteurs génétiques..... | 29 |
| 1.4.2. Les facteurs environnementaux..... | 29 |
| 1.4.3. Immunologie..... | 30 |
| 1.5. Complications chroniques du diabète..... | 34 |
| 1.5.1. Complications microangiopathiques..... | 35 |
| 1.5.2. Complications macroangiopathiques..... | 36 |
| 2. COMPLICATIONS CARDIOVASCULAIRES DU DIABETE DE TYPE2..... | 37 |
| 2.1. Les complications cardiovasculaires du diabète..... | 37 |
| 2.1.1. Cardiopathie ischémique..... | 37 |
| 2.1.2. Artérite des membres inférieurs..... | 39 |
| 2.1.3. Athérosclérose carotidienne..... | 39 |
| 2.2. Complications vasculaires et fonction endothéliale..... | 40 |
| 2.2.1. L'endothélium vasculaire : rôle physiologique..... | 40 |

| | |
|--|-----|
| 2.2.2. Dysfonction endothéliale et pathologies vasculaires | 43 |
| 3. Evaluation du risque cardiovasculaire et pathologie diabétique : facteurs de risque..... | 46 |
| 3.1. Facteurs de risques cardiovasculaires conventionnels..... | 46 |
| 3.1.1. Les dyslipidémies..... | 46 |
| 3.1.2. L'hypertension artérielle | 47 |
| 3.1.3. L'âge et le sexe | 48 |
| 3.1.4. Le tabagisme | 48 |
| 3.1.5. Le surpoids et l'élévation du ratio tour de taille/tour de hanches..... | 48 |
| 3.2. Evaluation du risque vasculaire..... | 49 |
| 3.2.1. Le score de Framingham | 49 |
| 3.2.2. Risque cardiovasculaire et diabète de type 2 | 49 |
| 3.3. Améliorer le dépistage du risque cardiovasculaire..... | 51 |
| 4. DIABETE, STRESS OXYDANT ET HYPERGLYCEMIE CHRONIQUE..... | 53 |
| 4.1 Hyperglycémie chronique et stress oxydant | 53 |
| 4.1.1. Définitions des radicaux libres. | 53 |
| 4.1.2. Diabète de type 2 et hyperproduction de radicaux libres..... | 54 |
| 4.1.3. Les défenses antioxydantes. | 57 |
| 4.1.4. Conséquences de l'hyperproduction d'espèces réactives de l'oxygène. | 62 |
| 4.2. Hyperglycémie chronique et AGEs (advanced glycation end-products)..... | 65 |
| 4.2.1. Formation des AGEs : phénomène de Glycoxydation..... | 65 |
| 4.2.2. Effets des AGEs sur la matrice extracellulaire, les protéines circulantes et cellulaires..... | 68 |
| 4.2.3. Les Récepteurs aux AGEs. | 72 |
| OBJECTIF DU TRAVAIL | 78 |
| PARTIE EXPERIMENTALE | 81 |
| 1. ETUDES DES MODIFICATIONS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DE L'ALBUMINE AU COURS DU DIABETE DE TYPE 2..... | 83 |
| 1.1. Introduction | 83 |
| 1.2. Résultats..... | 85 |
| 1.3. Discussion | 107 |
| 1.4. Conclusion | 109 |

| | |
|--|-----|
| 2. EFFETS CELLULAIRES DE L'ALBUMINE MODIFIEE AU COURS DU DIABETE | 111 |
| 2.1. Introduction..... | 111 |
| 2.2. Résultats..... | 112 |
| 2.3. Discussion | 127 |
| 2.4. Conclusion | 128 |
| 3. ETUDE PILOTE D'ASSOCIATION DES FORMES MODIFIEES DE L'ALBUMINE (AGES, GA ET IMA) AUX ATTEINTES VASCULAIRES DES PATIENTS DIABETIQUES : ERMIES-ALBOX..... | 131 |
| 3.1. Etat actuel des connaissances..... | 131 |
| 3.1.1. Les complications vasculaires du diabète de type 2 | 131 |
| 3.1.2. Prévention des complications vasculaires du diabète | 131 |
| 3.1.3. Glycation des protéines et stress oxydatif dans le diabète | 132 |
| 3.2. Objectifs de la recherche | 133 |
| 3.3. Aspects Méthodologiques..... | 134 |
| 3.3.1. Schéma de la recherche | 134 |
| 3.3.2. Critères d'éligibilité..... | 135 |
| 3.3.3. Critères d'évaluations..... | 136 |
| 3.3.4. Méthodes analytiques..... | 137 |
| 3.3.5. Analyse statistique des données..... | 139 |
| 3.4. Résultats..... | 141 |
| 3.4.1 Description générale de la population observée | 141 |
| 3.4.2 Corrélations des marqueurs biochimiques | 144 |
| 3.4.3 IMA et atteintes vasculaires..... | 145 |
| 3.4.4 GA, AGEs et atteintes vasculaires | 147 |
| 3.5. Discussion, conclusions et perspectives..... | 148 |
| CONCLUSION | 153 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 157 |

INTRODUCTION

Le diabète de type 2 est considéré aujourd'hui comme le mal du siècle. Cette maladie métabolique chronique, liée aux changements de mode de vie et d'habitudes alimentaires de ces 30 dernières années, voit en effet son incidence croître de manière exponentielle et touche désormais plus de 350 millions de personnes à travers le monde.

La mortalité du diabète de type 2 est principalement due aux complications vasculaires de cette pathologie amenant, à terme, à des événements cardiovasculaires graves tels l'infarctus du myocarde (IM) ou encore des accidents vasculaires cérébraux (AVC). Le risque d'événement cardiovasculaire est multiplié par 3 chez les patients souffrant du diabète¹. L'hyperglycémie chronique rencontrée au cours du diabète est donc considérée aujourd'hui comme un facteur de risque cardiovasculaire.

Des efforts importants doivent toujours être fournis en terme de dépistage et de prévention du diabète de type 2 à travers le monde pour enrayer la progression de cette pandémie. Il en est de même pour le dépistage, la prévention et la prise en charge des atteintes vasculaires liées au diabète. En effet le traitement de l'hyperglycémie reconnue comme facteur de risques cardiovasculaires ainsi que celui de l'hypertension artérielle, des dyslipidémies ou encore de l'obésité, facteurs de risque couramment utilisés et associés au syndrome métabolique des diabétiques de type 2, permettent de retarder l'apparition des complications cardiovasculaires et de limiter la mortalité liée au diabète.

Cependant de trop nombreux patients souffrent et meurent encore des complications vasculaires du diabète par défaut de prise en charge puisqu'ils n'ont pas été identifiés, sinon trop tardivement, comme à haut risque cardiovasculaire au moyen des biomarqueurs conventionnels. Ceci amène à penser que les facteurs de risque cardiovasculaires actuellement identifiés sont insuffisants et que les mécanismes physiopathologiques amenant aux atteintes vasculaires du diabète ne sont pas encore totalement élucidés.

De nombreux travaux restent donc à entreprendre pour mieux comprendre l'ensemble des mécanismes physiopathologiques qui contribuent à l'augmentation des atteintes vasculaires

au cours du diabète. Le décryptage précis de ces mécanismes physiopathologiques nous permettraient ainsi d'identifier de nouveaux biomarqueurs susceptibles de dépister précocement les patients à haut risque vasculaire et pourraient constituer des cibles pharmacologiques innovantes dans la prise en charge des complications vasculaires du diabète.

Parmi les hypothèses couramment évoquées, le laboratoire GEICO s'est plus particulièrement intéressé aux mécanismes combinés de l'hyperglycémie et du stress oxydant rencontrés au cours du diabète. Ces deux phénomènes conjugués, regroupés sous le nom de glycoxydation, constitueraient en effet un mécanisme physiopathologique central du diabète et de ses complications vasculaires.

Un des axes importants de recherche au laboratoire GEICO consiste en l'étude de l'effet de la glycoxydation sur la protéine circulante la plus abondante du plasma, à savoir l'albumine. C'est autour de cet axe que l'ensemble des travaux de ce mémoire s'est articulé. Nous avons ici travaillé dans un premier temps sur l'identification des modifications des propriétés structurales et fonctionnelles de l'albumine au cours du diabète. Dans un deuxième temps nous avons cherché à identifier si ces modifications glycoxydatives de l'albumine avaient des conséquences physiopathologiques pouvant être reliées aux complications cardiovasculaires rencontrées dans le diabète de type 2.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le diabète de type 2

1.1. Définition

Le diabète est défini comme une affection métabolique, caractérisée par une hyperglycémie (taux de sucre dans le sang trop élevé) liée à une déficience, soit de la sécrétion, soit de l'action de l'insuline, ou des deux. L'insuline est une hormone produite par le pancréas, indispensable à la pénétration du glucose sanguin dans les cellules. Lorsqu'elle fait défaut, le taux de sucre augmente dans le sang, or l'organisme est très sensible à ces variations : la chronicité de l'hyperglycémie est responsable de complications à long terme touchant de nombreux organes notamment les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux².

La grande majorité des cas de diabète se répartissent en deux catégories : le diabète de type 1 et le diabète de type 2. Les autres cas de diabète sont le diabète gestationnel défini comme une intolérance au glucose débutante ou découverte la première fois pendant la grossesse³ ou d'autres types plus spécifiques car liés à : des défauts génétiques des cellules β du pancréas, des défauts génétiques de l'action de l'insuline, des maladies du pancréas exocrine, des endocrinopathies, secondaire à la prise de médicaments ou de substances chimiques, secondaire à une infection, des formes non communes de diabètes immuns ou des diabètes associés à des syndromes génétiques².

Le diabète de type 2 est caractérisé par une résistance à l'insuline et une carence relative de la sécrétion d'insuline. Son apparition est lente : il peut évoluer avec un degré d'hyperglycémie suffisant pour engendrer des atteintes organiques et fonctionnelles dans de nombreux tissus mais sans symptôme clinique et donc sans diagnostic pendant plusieurs années. Cette forme de diabète s'établit le plus souvent chez des personnes adultes et très majoritairement en surpoids⁴.

1.2. Epidémiologie

1.2.1. Epidémiologie mondiale

Selon la Fédération Internationale du Diabète (FID), l'épidémie mondiale du diabète a explosé pour toucher en 2013, 382 millions de personnes, soit 8,3 % de la population adulte. Si cette tendance se poursuit, 550 millions de personnes environ, soit un adulte sur 10, seront atteintes de diabète d'ici 2030, ce qui représente près de 10 millions de nouveaux cas par an. Notons de plus que la proportion de personnes atteintes du diabète mais non diagnostiquées est estimé à près de 46% soit environ 175 millions⁵.

En Europe Occidentale, on compte aujourd'hui 33 millions de diabétiques, avec une prévision de 50 millions en 2030.

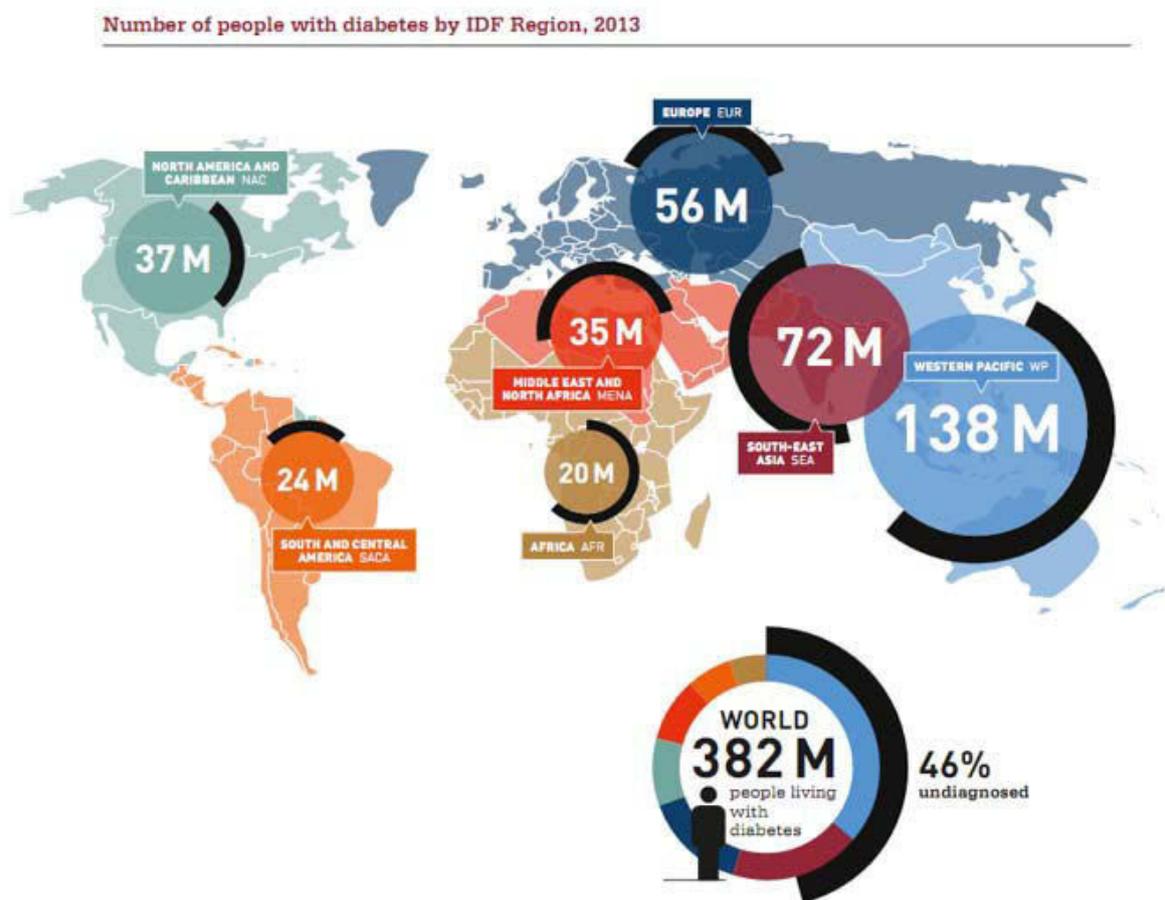


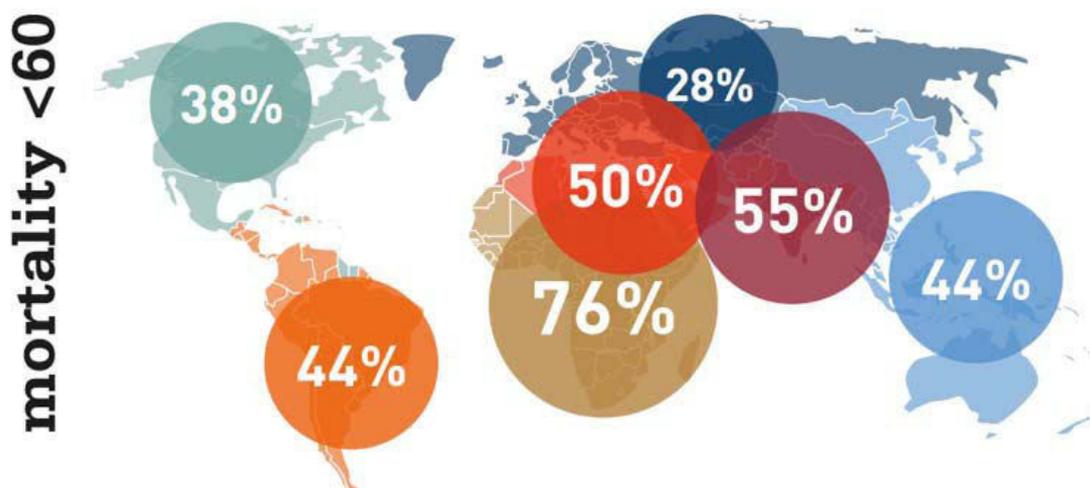
Figure n°1 : Prévalence du diabète de type 2. Données 2013 mondiales et répartition par continent. ⁵

Environ 80 % des diabétiques vivent dans des pays à faible et moyen revenus et la prévalence est supérieure dans les zones urbaines par rapport aux zones rurales, avec une atteinte plus grande des groupes sociaux défavorisés. Les principaux éléments responsables de l'augmentation du diabète sont les changements de style de vie et le vieillissement des

populations. En 2011, la tranche d'âge la plus touchée par le diabète, est représentée par les 40-59 ans qui totalisent 179 millions de personnes⁵.

Le diabète de type 2 est un problème de santé mondial. La mortalité liée au diabète est très forte et peut représenter selon les continents de 28% à 76% des causes de décès chez les individus de moins de 60 ans. Sa prévalence est fortement associée à l'ethnie mais son développement accéléré s'est effectué, dans la plupart des pays, en parallèle avec les changements culturels et sociaux rapides (l'urbanisation croissante, les changements alimentaires, la réduction de l'activité physique) et avec le vieillissement démographique.

La mortalité des diabétiques est principalement due aux complications vasculaires rencontrées dans le diabète de type 2 qui associent la microangiopathie diabétique (rétinopathie, néphropathie et pied diabétique) et la macroangiopathie diabétique (athérosclérose, syndromes coronariens, accidents vasculaires cérébraux (AVC),...). En effet, le risque d'atteinte vasculaire est fortement augmenté et les complications cardiovasculaires associées (AVC, infarctus du myocarde (IM)) sont responsables de 80% des décès des personnes diabétiques.



Proportion of deaths due to diabetes in people under 60 years of age, 2013

Figure n°2 : Mortalité liée au diabète chez les individus de moins de 60 ans⁵

La prévention du diabète de type 2 et de ses complications repose donc essentiellement sur des modifications du style de vie, une modification de l'alimentation et une incitation à la pratique sportive.

1.2.2. Epidémiologie en France

L'Institut de Veille Sanitaire (InVS) rapporte, d'après l'analyse du régime général de l'assurance maladie, une prévalence du diabète traité pharmacologiquement en France de 4,4 % de la population, soit 2,9 millions de personnes en 2009. Cette prévalence augmente de manière continue et cela devrait se poursuivre avec le vieillissement de la population, l'augmentation de l'espérance de vie des diabétiques et l'augmentation de la prévalence de l'obésité⁴.

Il ressort de l'enquête épidémiologique descriptive ENTRED 2007 (Echantillon national témoin représentatif des personnes diabétiques), que la grande majorité des personnes (92 %) ont un diabète de type 2. La population diabétique est âgée : la moyenne d'âge est de 65 ans et un quart a 75 ans ou plus, et souvent peu aisée financièrement. Sur l'ensemble de l'échantillon représentatif, 77% des personnes diabétiques sont nées en France, 12% dans un pays du Maghreb et 11% dans d'autres pays⁶.

Les zones les plus touchées sont les DOM-TOM (7,4% de diabétiques en Martinique; 8,1% en Guadeloupe; 8,8% à La Réunion⁷; 7,3% en Guyane), ainsi que le nord et le nord-est de la métropole (Nord-Pas-de-Calais 5,4%; Picardie 5,3%; Champagne-Ardenne 5,0%; Alsace 5,0%)^{6,8}.

L'augmentation de l'espérance de vie participe également à l'augmentation de la prévalence du diabète. En effet, il existe une disparité importante selon les âges : 0,4% pour les 0-44 ans, 5,8% pour les 45-64 ans, 13,3% pour les 65-74 ans et 13,4% pour les 75 ans et plus. Ainsi, la prévention, le dépistage et la prise en charge des patients diabétiques, ainsi que la prévention et le traitement des complications du diabète sont des enjeux majeurs de santé publique, tant sur le plan mondial, qu'europpéen ou français.

1.3. Diagnostic et suivi

1.3.1. La glycémie

Le diagnostic du diabète repose sur la mesure de la glycémie (taux de sucre dans le sang), pour cela trois méthodes sont possibles et, en l'absence d'hyperglycémie sans équivoque, chacune doit être confirmée un autre jour par la répétition d'une de ces trois méthodes. Le patient sera considéré comme diabétique dans les situations suivantes^{9, 10}:

- Glycémie à jeun (absence d'apport calorique depuis au moins 8 heures) supérieure ou égale à 126 mg/dl ou 7mmol/l
- Glycémie à un moment quelconque de la journée en présence des signes cliniques d'hyperglycémie (polyurie, polydipsie, perte de poids inexplicée souvent associée à une polyphagie) supérieure ou égale à 200 mg/dl ou 11,1 mmol/l
- Glycémie à la 2^{ème} heure d'une HGPO (hyperglycémie provoquée par voie orale selon les recommandations de l'OMS en utilisant une charge orale en glucose anhydre égale à 75g dissout dans de l'eau) supérieure ou égale à 200 mg/dl ou 11,1 mmol/l

Les valeurs normales de glycémies sont inférieures à 100 mg/dl à jeun et inférieures à 140 mg/dl à la deuxième heure d'une HPGO. Aussi existe-t-il un groupe intermédiaire de sujets dont les niveaux de glucose sanguin, bien que ne répondant pas aux critères diagnostiques du diabète, sont néanmoins trop élevés pour être considérés comme normaux :

- Si la glycémie à jeun est comprise entre 100 et 125 mg/dl (ou entre 5,6 et 6,9 mmol/l) on parlera d'anomalie de la glycémie à jeun (AGJ).
- Si à la 2^{ème} heure d'une HGPO la glycémie est comprise entre 140 et 199 mg/dl (ou entre 7,8 et 11,1 mmol/l) on parlera d'intolérance au glucose (IG).

L'IG et l'AGJ ne sont pas des entités cliniques en elles-mêmes mais des facteurs de risque d'un futur diabète ou de maladies cardiovasculaires^{10,9}.

1.3.2. L'hémoglobine glyquée (HbA1c)

Le dosage de l'hémoglobine glyquée permet d'obtenir une estimation de la glycémie moyenne au cours des deux à trois derniers mois de suivi d'un patient. Sa valeur est généralement exprimée en pourcentage et permet la surveillance de l'équilibre glycémique des patients diabétiques¹¹. Il s'agit principalement d'un élément de suivi de l'équilibre glycémique, mais un niveau supérieur ou égal à 6,5% d'HbA1c, déterminé par HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance), à deux reprises, a récemment été intégré aux critères diagnostiques du diabète par l'ADA (American Diabetes Association)¹⁰.

L'hémoglobine glyquée est issue de la glycation de l'hémoglobine sanguine au cours d'épisodes d'hyperglycémie prolongée. La glycation est une réaction non enzymatique au cours de laquelle le glucose se lie aux protéines de manière irréversible. Le degré de glycation des protéines dépend de l'exposition au glucose et donc du niveau d'hyperglycémie associé à la durée d'exposition des protéines au glucose. Le dosage de l'HbA1c est le reflet de l'équilibre glycémique sur une période de 4 à 8 semaines. Une corrélation a été établie entre le taux moyen de glycémie et le pourcentage d'HbA1c^{12,11}.

Un bon contrôle de la glycémie est représenté par une valeur d'HbA1c peu élevée, et celle-ci est attendue dans la prévention de l'apparition des complications microvasculaires et macrovasculaires du diabète. Une augmentation relative de 30% des complications microvasculaires du diabète a été observée pour chaque pourcent d'élévation de l'HbA1c¹³. Cette mesure, marqueur rétrospectif de la glycémie moyenne des deux derniers mois permet d'évaluer l'efficacité des traitements pour ainsi les réadapter en fonctions des objectifs thérapeutiques fixés¹¹. Une HbA1c supérieure à 7,5% constitue également un facteur de risque de complication cardiovasculaire.

1.4. Etiologie et immunopathologie du diabète de type 2

Le développement d'un diabète de type 2 est associé à de fortes prédispositions génétiques combiné à des facteurs environnementaux favorisant.

1.4.1. Les facteurs génétiques

La part du déterminisme génétique dans le diabète de type 2 est très importante puisque l'on estime que le risque de développer la maladie est de 30% avec un parent atteint de diabète de type 2 et de 70% si les deux parents le sont. Le taux de concordance entre jumeaux monozygotes est de près de 90%.

Cependant, au regard de l'importante prévalence du diabète de type 2 dans la population générale, il est probable que les gènes de susceptibilité soient très nombreux, très répandus et de faible pénétrance, ce qui les rend difficile à identifier. Ainsi de nombreux gènes ont été analysés notamment ceux impliqués dans la régulation de la sécrétion de l'insuline ou de son action mais les variations interindividuelles et inter-ethniques limitent les conclusions^{4,14}.

1.4.2. Les facteurs environnementaux

Le facteur le plus puissant prédisposant au diabète de type 2 est l'obésité, particulièrement à répartition abdominale, puisque 80% des personnes atteintes de ce type de diabète présentent un excès pondéral. L'obésité est capable d'induire ou d'aggraver une insulino-résistance, imposant au pancréas une hypersécrétion permanente d'insuline. Pour la majorité des personnes obèses le pancréas sera capable de s'adapter et de maintenir une glycémie dans les valeurs normales mais pour un tiers d'entre eux les capacités de compensation s'épuiseront et ils développeront un diabète de type 2⁴.

La sédentarité, de plus en plus présente dans nos sociétés industrialisées, est également mise en cause dans l'apparition de la maladie, puisque l'activité physique améliore la sensibilité des tissus à l'insuline et donc présente un effet protecteur.

Enfin la qualité de la composition du régime alimentaire, notamment la présence d'un index glycémique élevé : alimentation riche en acides gras et pauvre en fibres double le risque de diabète.

1.4.3. Immunologie

Le diabète de type 2 est le résultat de deux composantes physiopathologiques : des anomalies de la sensibilité à l'insuline et des anomalies de sa sécrétion. L'inflammation est fortement mise en cause dans la pathogénie du diabète 2. Une augmentation du nombre de protéines de la phase inflammatoire aiguë (protéine C-réactive (CRP)), d'acide sialique, de cytokines et de chimiokines est retrouvée dans le plasma des patients atteints de diabète de type 2. Des niveaux élevés d'interleukine 1 β (IL-1 β), d'interleukine 6 (IL-6) et de CRP sont également prédictifs d'un diabète de type 2¹⁵.

1.4.3.1. Mécanismes de l'insulinorésistance

L'insulinorésistance est définie comme une diminution de l'action de l'insuline au niveau des tissus cibles : les muscles, le foie et le tissu adipeux, se traduisant par des défauts de captation du glucose au sein de ces tissus et un moindre frein de la production de glucose par le foie en réponse à l'insuline⁴. L'insulinorésistance est liée à des mécanismes complexes mêlant réaction inflammatoire, accumulation d'acides gras, stress oxydant et dysfonction mitochondriale (figure n°3).

Longtemps vu comme un tissu inerte, on sait désormais que le tissu adipeux participe à la pathogénèse du diabète. Les adipocytes ont une capacité à produire des adipokines (hormones et cytokines) qui régulent l'utilisation et le stockage des nutriments dans les autres tissus. L'augmentation de la masse adipeuse au cours de l'obésité s'accompagne d'une libération accrue de résistine, de RBP4 (rétinol-binding protein-4) et de TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) responsables d'une moindre sensibilité des tissus à l'insuline¹⁶. D'autres adipokines telles que la leptine et l'adiponectine sont considérées comme « anti-diabétogènes » car elles diminuent la synthèse de triglycérides, stimulent l'oxydation du glucose et des lipides et favorisent l'action de l'insuline au niveau du muscle et du foie¹⁶. L'obésité s'accompagnerait d'un défaut d'adiponectine et d'une résistance à la leptine et aurait par conséquent un effet diabétogène¹⁶.

L'hypoxie et la mort de cellules adipocytaires observées au cours de l'obésité contribuent au

recrutement d'un grand nombre de macrophages au sein du tissu adipeux. Ces macrophages activés participent également à la libération de nombreuses substances pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6...) entraînant l'induction et la maintenance d'un état inflammatoire associé à l'obésité¹⁵.

Au cours de l'obésité la saturation des possibilités de stockage des lipides au niveau des adipocytes entraîne une redistribution anormale de ces lipides responsable d'une lipotoxicité.

Dans les hépatocytes, les défauts d'oxydation des acides gras entraînent une surcharge métabolique par accumulation d'espèces lipidiques cytosoliques telles que le diacylglycérol (DAG), les céramides et les triglycérides. Ce phénomène peut être attribué à l'augmentation de malonyl-coA, induite par le glucose, qui sert à la fois d'intermédiaire précurseur *de novo* pour la lipogenèse et qui bloque l'enzyme clé de l'entrée des acides gras, l'acyl-coA, dans la mitochondrie et donc leur oxydation. L'augmentation d'insuline inhibe l'expression d'enzymes β -oxydatives et ce rôle est maintenu au cours du développement de l'insulinorésistance, alors que son action de suppression de la néoglucogenèse diminue¹⁶.

L'excès d'apport alimentaire, au niveau hépatique comme au niveau du tissu adipeux, est également associé à un stress du réticulum endoplasmique (RE). Ce stress du RE et l'accumulation des produits dérivés des lipides activent des protéines de type sérine/thréonine kinases : les protéines kinases C (PKC), qui agissent sur les récepteurs à l'insuline ou sur leurs substrats IRS1 et IRS2 (Insulin Responsive Element), entravant le signal de l'insuline^{14,15}.

Dans les cellules du muscle strié squelettique, on observe également une accumulation cytoplasmique de dérivés lipidiques (DAG, céramides) mais l'insulinorésistance au niveau musculaire est principalement liée à des dysfonctions mitochondriales. Dans ce modèle, la β -oxydation a bien lieu mais n'étant pas associée à une augmentation du cycle de l'acide tricarboxylique et de l'activité de la chaîne de transport des électrons, elle pourrait conduire à un métabolisme incomplet des acides gras dans cette voie et une augmentation de dérivés tels que l'aryl-carnitine et d'espèces réactives de l'oxygène au sein de la mitochondrie. Ces

stress sont susceptibles d'activer des protéines kinases qui entravent la translocation du transporteur de glucose GLUT4 et donc la pénétration du glucose au sein des tissus^{14,16}.

La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne la phosphorylation de résidus tyrosine des substrats IRS permettant l'activation de la PI3K (phosphoinositol 3 kinase), puis la translocation du transporteur de glucose GLUT4 dans le muscle et le tissu adipeux, la synthèse de glycogène au niveau musculaire et hépatique, et l'inhibition de la néoglucogenèse hépatique et de la lipolyse dans le tissu adipeux¹⁷.

L'obésité et l'alimentation riche en graisse entraînent donc l'apparition de différents stress métaboliques. Des stimuli extracellulaires représentés par les cytokines comme l'IL-1 β et le TNF- α , par les acides gras libres et par les produits terminaux de la glycation (AGEs), formés suite à l'hyperglycémie, qui se lient respectivement à leurs récepteurs cellulaires spécifiques : IL-1R, TNFR, toll like receptor (TLR) et le récepteur RAGE (receptor for advanced glycation end-products). Des stress intracellulaires induits par la surcharge métabolique que sont l'accumulation de lipides (céramides), l'augmentation de la production d'espèces oxygénoréactives, du stress du réticulum endoplasmique et l'activation des PKC. Ces différents stimuli aboutissent à l'activation des voies du IKK β (IkB kinase β)-NF- κ B au niveau des hépatocytes, des adipocytes et des macrophages qui leur sont associés^{15,18}.

La voie du NF- κ B est activée dans de nombreux tissus au cours du diabète de type 2 et de l'obésité et a un rôle central dans la promotion de l'inflammation tissulaire. L'obésité induit ainsi l'expression de gènes cible du facteur de transcription NF- κ B comme les gènes des cytokines pro-inflammatoires dans le foie et les tissus adipeux¹⁵. Ces cytokines, incluant le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β peuvent entraîner une insulino-résistance dans les tissus dans lesquels elles sont produites et peuvent être transportées dans la circulation sanguine pour affecter des tissus à distance : parois des vaisseaux sanguins, muscle, cœur, reins, et leucocytes circulants. La voie du JNK active des facteurs de transcription dont le rôle n'est pas complètement établi au cours de l'insulino-résistance¹⁵. Les cytokines produites par la voie du NF- κ B, notamment IL-1 β et TNF- α ont elles-mêmes la capacité d'activer la voie du NF- κ B.

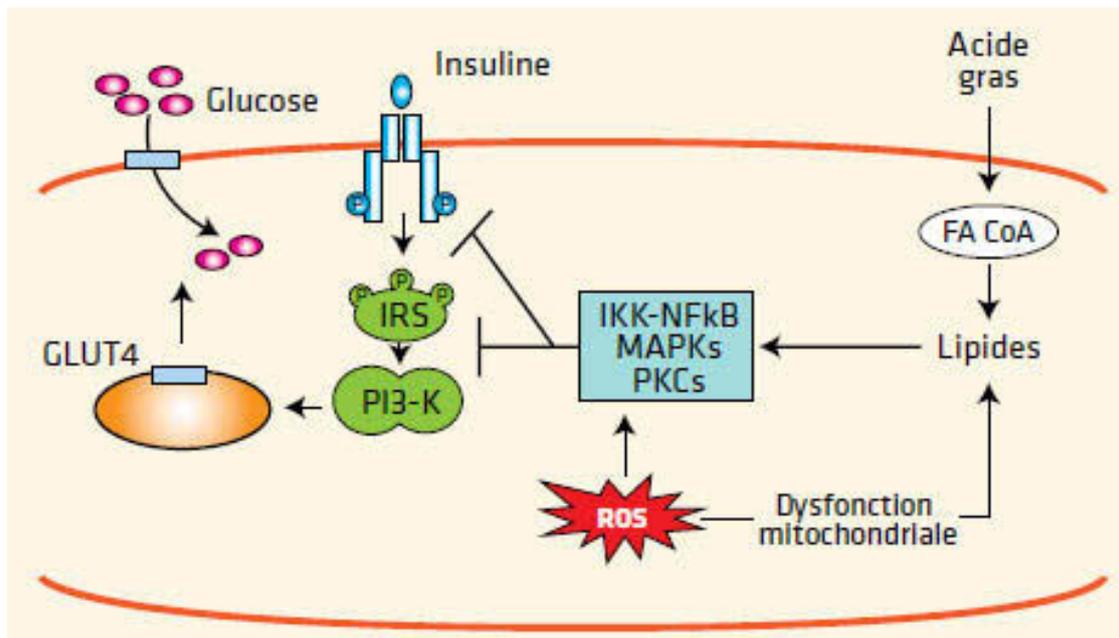


Figure n°3 : Mécanismes intracellulaires de l'insulinorésistance

Ces processus une fois activés peuvent donc être auto-entretenus par un feed-back positif, et perpétuer l'état inflammatoire¹⁵.

1.4.3.2. Mécanismes du déficit insulinosécrétoire

Le diabète de type 2 s'accompagne d'un défaut quantitatif et qualitatif de la sécrétion d'insuline évoluant vers une réduction progressive de cette sécrétion sous-tendue par des phénomènes d'apoptose des cellules β du pancréas⁴. Plusieurs mécanismes ont été évoqués pour expliquer la disparition progressive de ces cellules. Les niveaux élevés de cytokines et de chimiokines retrouvés au niveau des îlots des diabétiques de type 2 placent à nouveau l'inflammation au cœur des processus pathogéniques.

L'exposition chronique des îlots pancréatiques à de forte quantité de nutriments (hyperglycémie et excès d'acides gras libres) induit des dysfonctions des cellules β et aboutit à leur mort cellulaire, définissant le concept de « glucolipotoxicité ». L'hyperglycémie entraîne une apoptose des cellules β par l'induction de l'expression du récepteur pro-apoptotique FAS à la surface de ces cellules et cette expression est ensuite positivement régulée par la production d'IL-1 β par les cellules β sous l'influence du glucose. Les acides

gras, surtout en présence de glucose, sont également responsables d'une augmentation de la production d'IL-1 β . L'induction initiale d'IL-1 β peut ensuite être amplifiée par un cycle d'auto-inflammation, les cellules β exprimant fortement son récepteur l'IL-1R1 (IL-1 receptor type 1) alors que son récepteur antagoniste IL-1RA est diminué dans les îlots des patients atteints de diabète de type 2. La voie du NF- κ B est également activée dans les cellules β des îlots par l'intermédiaire de l'action du glucose et de l'IL-1 β et son inhibition semble protéger ces cellules des effets néfastes liés à la glucotoxicité¹⁵.

L'hyperglycémie est responsable d'une plus forte sollicitation de la fonction sécrétrice des cellules β . La demande accrue d'insuline entraîne une surcharge de travail au niveau du réticulum endoplasmique (RE), conduisant à un stress du RE pouvant conduire à la mort des cellules¹⁶ par autophagie.

L'hyperglycémie entraîne également une augmentation de la production d'espèces oxygénoréactives, or les cellules β sont très pauvres en enzymes antioxydantes et donc très susceptibles au stress oxydatif¹⁵ entraînant à terme une mort cellulaire par apoptose.

Enfin l'hypersécrétion d'insuline est accompagnée par une libération accrue d'amyline susceptible de former des fibres amyloïdes qui s'accumulent à la surface des cellules β , aboutissant à leur dysfonction et leur apoptose. Elles induisent la sécrétion d'IL-1 β par les macrophages et peuvent ainsi contribuer elles aussi à l'inflammation des îlots et à la destruction progressive des cellules β du pancréas¹⁵.

1.5. Complications chroniques du diabète

Les complications à long terme du diabète sont classiquement divisées en deux catégories :

- les complications microangiopathiques : neuropathie, néphropathie et rétinopathie dont le facteur de risque majeur est l'hyperglycémie chronique
- les complications macroangiopathiques : maladies cardiovasculaires dont les facteurs de risque sont l'hyperglycémie, l'insulinorésistance, des

carences en insuline, une dyslipidémie, l'hypertension, l'hyperlipidémie et l'inflammation¹⁹.

1.5.1. Complications microangiopathiques

1.5.1.1. Rétinopathie

La rétinopathie est une complication fréquente qui touche plus de 50% des diabétiques après 15 ans d'évolution du diabète. Fortement liée à l'hyperglycémie et la durée du diabète, elle se traduit par diverses lésions observables lors d'un examen du fond d'œil : micro-anévrismes rétiniens, hémorragies rétiniennes punctiformes, exsudats et oedèmes rétiniens, et oedème maculaire. Elle est responsable, à terme, de cécité¹⁹.

1.5.1.2. Néphropathie

La néphropathie touche préférentiellement les diabétiques de type 1 : 50% des malades en sont atteints. Ses principaux facteurs d'apparition et de progression sont le mauvais équilibre glycémique et l'hypertension. La néphropathie diabétique évolue en plusieurs étapes et débute par une protéinurie discrète, couramment appelée micro-albuminurie, qui traduit des défauts anatomiques et biochimiques au niveau des glomérules rénaux. Elle évolue associée à une hypertension en un syndrome œdémateux susceptible d'évoluer vers une insuffisance rénale. Le patient est alors macroalbuminurique et les glomérules rénaux diminuent en nombre et en capacité fonctionnelle. La néphropathie diabétique évolue à terme vers une insuffisance rénale chronique sévère¹⁹.

1.5.1.3. Neuropathie

La neuropathie est la complication la plus fréquente et la plus précoce du diabète sucré. Il s'agit d'une démyélinisation segmentaire des axones associée à des dépôts lipidiques sur les cellules de Schwann entourant les axones. Sa manifestation la plus commune est la polyneuropathie : atteinte bilatérale et symétrique au départ distale puis qui remonte progressivement au niveau proximal des membres, touchant quasi exclusivement les membres inférieurs. Elle débute par des paresthésies et des dysesthésies qui évoluent par une symptomatologie douloureuse notamment la nuit et qui cèdent en général au cours de l'exercice physique. On observe fréquemment une disparition des réflexes ostéo-tendineux,

une altération des sensibilités profondes et superficielles, les troubles moteurs étant exceptionnels. La polynévrite diabétique peut être compliquée par des troubles trophiques, notamment le mal perforant plantaire. Il s'agit d'une ulcération cutanée au niveau des points de pression du pied, en général non douloureuse du fait de la neuropathie. La présence d'une infection à ce niveau est susceptible de la faire évoluer en lésions destructives articulaires et osseuses s'accompagnant d'une déformation du pied. La neuropathie peut également se manifester par des atteintes végétatives : vasomotrices, génito-urinaires et digestives. Sa prévention passe essentiellement par le maintien d'un bon équilibre glycémique¹⁹.

1.5.2. Complications macroangiopathiques

Elles touchent toutes les artères de l'organisme mais se manifestent principalement au niveau des artères coronaires et cérébrales, et des membres inférieurs. Les principaux facteurs de risque associés sont l'âge, le sexe, l'obésité, le tabagisme, l'hyperglycémie, l'hypertension artérielle, la dyslipidémie (augmentation des triglycérides, diminution du HDL cholestérol et présence de petits LDL denses très athérogènes) ou encore un syndrome inflammatoire sous-jacent.

Les lésions sont distales, souvent calcifiées et les dépôts lipidiques au niveau des artères sont accompagnés de dépôts glycoprotéiques. Elles peuvent conduire à une insuffisance coronaire susceptible d'entraîner un infarctus du myocarde, à une atteinte des troncs artériels supra-aortiques responsables d'accidents vasculaires cérébraux, et à une artériopathie pouvant conduire à des nécroses distales à l'origine d'amputations le plus souvent des membres inférieurs¹⁹.

2. COMPLICATIONS CARDIOVASCULAIRES DU DIABETE DE TYPE2

La mortalité des diabétiques est principalement due aux complications vasculaires rencontrées dans le diabète de type 2 qui associent la microangiopathie diabétique (rétinopathie, néphropathie et pied diabétique) et la macroangiopathie diabétique (athérosclérose, syndromes coronariens, AVC,...).

En effet, le risque d'atteinte vasculaire est très fortement augmenté au cours du diabète. Et les complications cardiovasculaires associées (AVC, IM) sont responsables de 80% des décès des personnes diabétiques⁵.

2.1. Les complications cardiovasculaires du diabète

Les conséquences les plus importantes du diabète se situent au niveau macrovasculaire, et en particulier au niveau coronarien, dont l'atteinte conditionne le pronostic vital des patients. Chez les patients diabétiques la principale cause de mortalité est en effet cardiovasculaire (60% de décès)^{6,20}. En pratique, le diabète multiplie par trois à cinq le risque d'infarctus du myocarde. En 2006 en France, 12 639 personnes diabétiques ont été hospitalisées pour un infarctus du myocarde et 9 % en sont décédées⁶.

Les atteintes macrovasculaires touchent les carotides, l'aorte, les artères des membres inférieurs, et surtout les coronaires.

2.1.1. Cardiopathie ischémique

La cardiopathie ischémique est la première cause de mortalité au niveau mondial : sur 50 millions de décès, ceux par ischémie myocardique représentent 6,3 millions²¹.

Dans l'étude ENTRED 2001, 17 % des patients diabétiques déclaraient avoir eu une complication ischémique cardiaque (angor, IDM, ou revascularisation coronaire), et 20% des médecins déclaraient une complication macrovasculaire chez leurs patients (angor, IM,

revascularisation coronaire ou AVC)²².

L'étude Framingham a montré que les hommes diabétiques ont 2 fois plus de pathologies cardiaques et les femmes diabétiques 3 à 5 fois plus que les non diabétiques²³. Certaines études tendent également à montrer que le taux d'évènements cardiaques chez le diabétique est aussi élevé que chez le patient non diabétique en ayant déjà eu un événement cardiovasculaire²⁴.

Plusieurs phénomènes peuvent expliquer l'augmentation du risque d'infarctus chez les sujets diabétiques et le fait que le pronostic soit plus péjoratif :

- l'état d'hypercoagulabilité associé au diabète,
- une athérosclérose souvent plus diffuse que chez un patient non diabétique,
- une altération de la structure des vaisseaux, ce qui rend la revascularisation plus difficile
- un dysfonctionnement métabolique empêchant les mécanismes compensatoires d'être efficaces²⁵.

L'atteinte cardiaque chez le diabétique peut se manifester de différentes manières : ischémie myocardique silencieuse, angor ou infarctus. L'action préventive repose sur un traitement médicamenteux intensif, permettant une réduction du risque d'évènement :

- par un contrôle glycémique (par exemple l'étude UKPDS a montré que la diminution de 1% du taux d'hémoglobine glyquée s'accompagnait d'une baisse de 14% du risque d'IDM)²⁶,
- par un contrôle de l'hypertension artérielle (cette même étude UKPDS a démontré une baisse de 15% de la mortalité liée au diabète pour toute diminution de la pression artérielle systolique (PAS) de 10 mm Hg)²⁷
- par une maîtrise des dyslipidémies (dans l'étude CARDS, les patients diabétiques sous 10 mg d'atorvastatine, hypolipémiant inhibiteur de l'HMG CoA-reductase, ont une diminution de 37% des évènements cardiovasculaires et de 27% de la mortalité)²⁸.

Par ailleurs, l'indication d'une revascularisation peut être retenue, soit par angioplastie avec éventuelle pose de stent, soit par pontage aorto-coronarien. La meilleure stratégie de

revascularisation reste encore débattue et est discutée au cas par cas.

2.1.2. Artérite des membres inférieurs

L'atteinte des artères périphériques des membres inférieurs (AOMI: artériopathie oblitérante des membres inférieurs) a une incidence de 0,12% dans la population générale et environ 3 fois plus élevée chez les diabétiques (soit 0,4%). C'est un facteur prédictif indépendant de mortalité et d'atteinte des artères cérébrales et coronariennes²⁹.

L'artérite se manifeste cliniquement par une claudication intermittente. Chez les patients asymptomatiques, elle se dépiste par la mesure de l'indice de pression systolique (IPS). L'IPS se mesure en faisant le rapport entre la pression artérielle de la cheville et du bras. En cas d'artériopathie, l'IPS est inférieur à 0,9. Une fois identifiée, la prise en charge des patients repose sur un traitement médicamenteux intensif avec une correction des facteurs de risque³⁰:

- un arrêt définitif du tabagisme,
- une statine,
- un inhibiteur de l'enzyme de conversion,
- un traitement inhibiteur de l'agrégation plaquettaire (qui réduit le risque d'évènement cardiovasculaire sévère),
- un β -bloquant en cas de cardiopathie.

Un programme de réhabilitation à l'exercice est de plus fortement recommandé.

En cas de claudication interférant gravement sur le style de vie, ou d'ischémie mettant en jeu le pronostic du membre inférieur, une revascularisation par angioplastie et +/- stenting, ou pontage vasculaire est alors nécessaire, afin d'éviter le traitement radical qu'est l'amputation.

2.1.3. Athérosclérose carotidienne

Sa principale complication est l'AVC. L'AVC est la deuxième cause de mortalité à travers le monde chez les personnes de plus de 60 ans (5,5 millions en 2002). En France, 150 000

personnes sont victimes d'AVC chaque année (dont 28 000 de moins de 60 ans), ce qui en fait la première cause de morbidité et la troisième cause de mortalité³¹. Il existe différents types d'AVC : l'accident ischémique transitoire, ischémique constitué, l'hémorragie intraparenchymateuse, l'hémorragie méningée. L'AVC ischémique est la conséquence de l'athérosclérose carotidienne. Celle-ci reste longtemps asymptomatique.

Le premier signe d'athérosclérose est une augmentation de l'épaisseur intima-média (IMT). Chez le diabétique, l'IMT est plus importante que chez le non diabétique, indépendamment de tous les autres facteurs de risque³². Elle est d'autant plus élevée que le diabète est mal contrôlé (HbA1c élevée) et dure depuis longtemps³³. La résistance à l'insuline chez ces patients est un facteur de risque de développer une athérosclérose carotidienne³⁴. Vient ensuite la formation de plaques athéroscléreuses, pouvant provoquer des sténoses et se compliquer en accident vasculaire.

Les lésions endothéliales des macros vaisseaux chez le diabétique sont la conséquence des atteintes dues:

- aux autres facteurs de risque cardiovasculaire: hypertension artérielle, dyslipidémie, tabagisme, hypercoagulabilité, activation plaquettaire,
- à des phénomènes propres au diabète : désulfatation des glycosaminoglycanes de la matrice vasculaire, activation du système rénine-angiotensine-aldostérone, stress oxydatif, inflammation de l'endothélium, secondaire à la glycémie élevée, à l'insuline et ses précurseurs, ainsi qu'aux produits liés à la glycation et à leurs récepteurs³⁵.

2.2. Complications vasculaires et fonction endothéliale

2.2.1. L'endothélium vasculaire : rôle physiologique

L'endothélium vasculaire constitue une couche de cellules tapissant l'intérieur des vaisseaux sanguins. Il joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie vasculaire de par sa position à l'interface des éléments circulants et du muscle lisse vasculaire (figure n°4)³⁶.

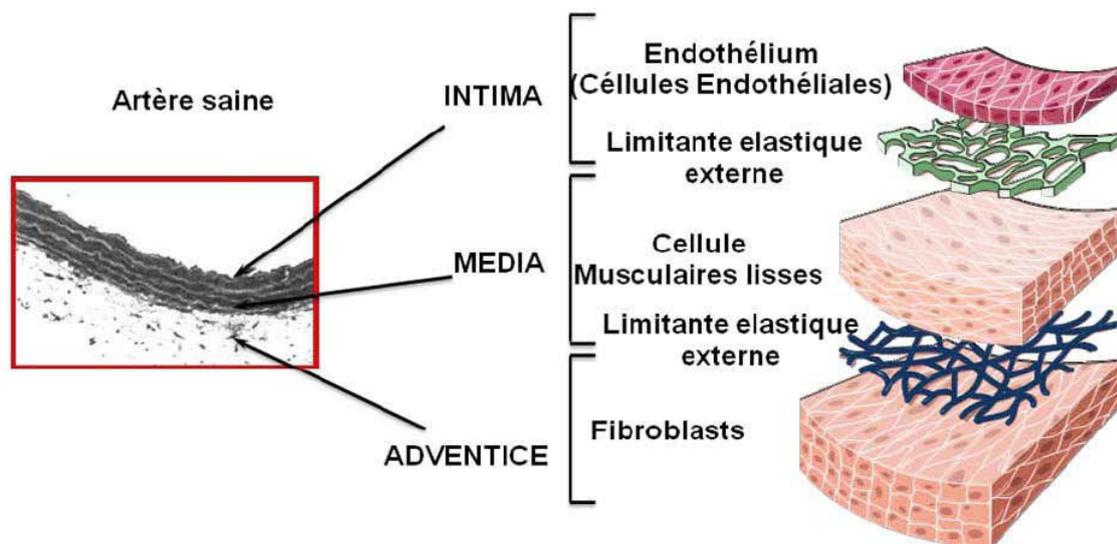


Figure n°4 : structure de la paroi vasculaire et place de l'endothélium vasculaire³⁶

L'endothélium est premièrement le régulateur du tonus vasculaire grâce à sa capacité à libérer des substances vasoactives, notamment le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline (propriétés vasodilatatrices) ainsi que l'endothéline et la thromboxane A2 (propriétés vasoconstrictives)³⁷. En ce qui concerne le NO il est libéré en réponse aux forces de cisaillement de l'endothélium. Par ailleurs le NO atténue la réponse contractile à différents vasopresseurs comme la noradrénaline, l'angiotensine II et l'endothéline. Ces agonistes activent en effet des récepteurs endothéliaux et, par ce biais, stimulent la production de NO. En cas d'anomalie de la fonction endothéliale, la libération de NO est diminuée, avec pour résultat une montée tensionnelle plus importante pendant la systole et un effet vasoconstricteur accru de la noradrénaline, de l'angiotensine II et de l'endothéline. Quant à l'endothéline, elle est libérée par les cellules endothéliales soumises à un cisaillement ou stimulées par exemple par la thrombine, l'angiotensine II et les lipoprotéines à basse densité (LDL) oxydées³⁸.

Le système nerveux autonome régule également le tonus vasculaire par le biais de l'endothélium. En effet, l'acétylcholine provoque une vasorelaxation en libérant du NO de l'endothélium. Cette substance induit par contre une vasoconstriction lorsqu'elle agit directement sur la musculature des vaisseaux sanguins. Ainsi, en cas de dysfonction

endothéliale, l'effet vasodilatateur de l'acétylcholine est diminué, voire aboli ou remplacé par un effet vasoconstricteur.

L'endothélium, en raison de sa localisation à l'interface entre le sang et les constituants de la paroi vasculaire, est impliqué également de manière très importante dans les processus d'hémostase, ceci en libérant des facteurs à action anticoagulante aussi bien que des facteurs à action procoagulante. Dans les conditions normales la couche endothéliale assume une fonction anticoagulante prédominante, mais en cas d'atteinte de l'endothélium, la contribution des facteurs menant à la thrombose prend le dessus.

La cellule endothéliale intervient dans les phénomènes de régulation de l'hémostase³⁷.

L'action anticoagulante de l'endothélium comporte³⁸ :

- 1) la libération de l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA) qui conduit à la formation de plasmine activée et, en conséquence, à une dégradation de la fibrine
- 2) la libération de NO et de prostacycline (PGI₂) qui diminuent l'agrégabilité plaquettaire
- 3) la présence à la surface cellulaire d'une protéine (thrombomoduline) capable de lier la thrombine, entraînant ainsi une activation de la protéine C et, par ce mécanisme, une inactivation des facteurs V et VIII activés
- 4) la présence à la surface endothéliale d'ectonucléotidases capables de dégrader l'ADP libéré lors de l'agrégation plaquettaire et, par ce biais, de limiter le processus d'agrégation induit par l'ADP.

Quant à la fonction procoagulante de l'endothélium, elle met en jeu³⁸ :

- 1) la libération du facteur tissulaire qui active la voie extrinsèque de la coagulation
- 2) la libération de thromboxane A₂ et du «platelet activating factor» (PAF) qui augmentent l'agrégabilité plaquettaire
- 3) la libération de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1)
- 4) la libération du facteur de von Willebrand qui facilite l'adhésion des plaquettes au tissu lésé et, tout en transportant le facteur VIII, ralentit sa dégradation.

L'endothélium joue également un rôle essentiel dans la régulation du passage des monocytes sanguins dans la paroi vasculaire³⁷. Ces monocytes jouent, entre autre, un rôle important dans la pathogenèse de l'athérosclérose. Ils sont attirés dans l'intima par les LDL oxydées et le «monocyte chemotactic-protein-1» (MCP-1), un facteur dont la libération à partir de l'endothélium est augmentée par l'endothéline et diminuée par le NO. Le monocyte une fois localisé dans l'intima devient un macrophage qui possède beaucoup de récepteurs capables de fixer les LDL oxydées, ce qui l'amène à capter une grande quantité de ces lipoprotéines et à devenir une cellule spumeuse. Le passage des monocytes est facilité par les molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules endothéliales. Leur expression est accrue par l'endothéline, et diminuée au contraire par le NO³⁸.

2.2.2. Dysfonction endothéliale et pathologies vasculaires

La caractéristique principale de la dysfonction endothéliale est une réduction de la biodisponibilité en NO associée à la perte de ses propriétés antiathérogènes et antithrombotiques³⁹.

C'est pourquoi la dysfonction endothéliale est impliquée de façon précoce dans la physiopathologie de l'athérosclérose (figure n°5) prédicteur de la mortalité et morbidité cardiovasculaire⁴⁰.

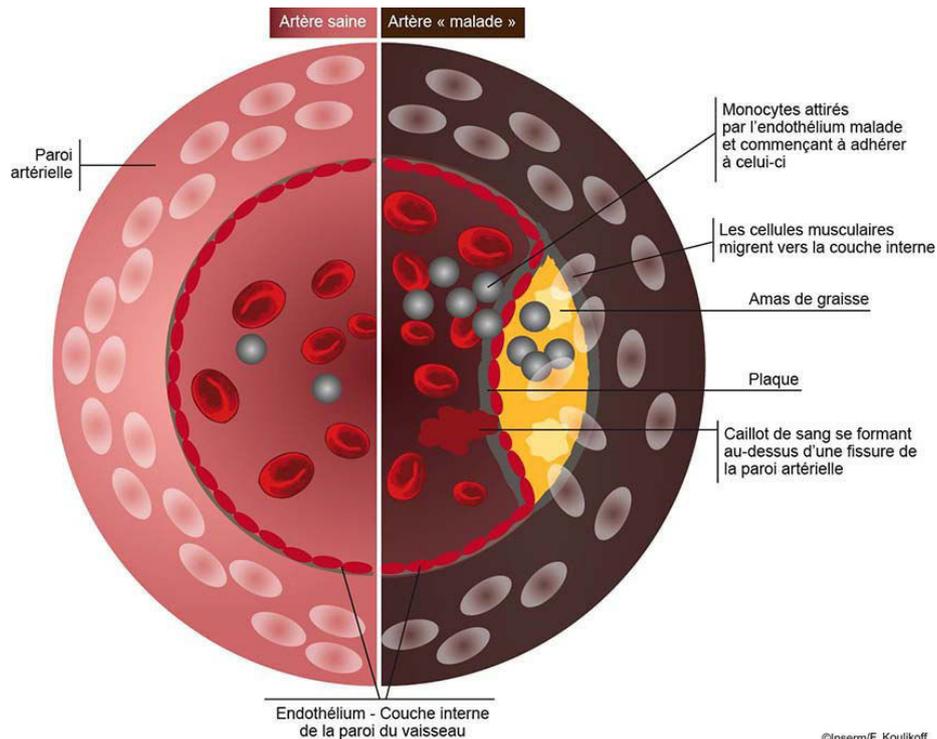


Figure n°5 : Coupe schématique d'une artère saine et d'une artère artérioscléreuse : place de l'endothélium vasculaire⁴¹

Bien que la pathophysiologie de la dysfonction endothéliale soit complexe et implique de multiples mécanismes, la diminution de la biodisponibilité du NO pourrait avoir quatre origines :

- l'augmentation de la capture ou de la dégradation du NO par les radicaux libres;
- la réduction de l'expression et/ou de l'activité de la eNOS ;
- le « découplage » de la eNOS (en l'absence du substrat l-arginine ou du cofacteur BH₄)⁴² ;
- l'altération de la transmission des événements signalétiques initiés par le NO⁴².

Étant donné le rôle majeur de la dysfonction endothéliale dans la maladie cardiovasculaire, on comprend pourquoi elle est rapidement apparue comme une cible préventive et thérapeutique prioritaire.

La présence de dysfonction endothéliale, définie comme une diminution de la réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine, a été démontrée dans différents territoires vasculaires, que ce soit chez des malades connus pour être coronariens ou des malades présentant un facteur de risque cardiovasculaire (hypertension, hypercholestérolémie, diabète,

tabagisme)³⁹. Les études ont montré qu'il est possible d'améliorer la fonction endothéliale grâce au traitement antihypertenseur, aux hypolipémiants et aux hypoglycémiant.

Il est dès lors tentant de spéculer que la mise en évidence d'une dysfonction endothéliale chez un malade donné indique l'existence d'un processus athérosclérotique sous-jacent, associé à un risque anormalement élevé de présenter une complication cardiovasculaire à moyen ou long termes (figure n°6)⁴³.

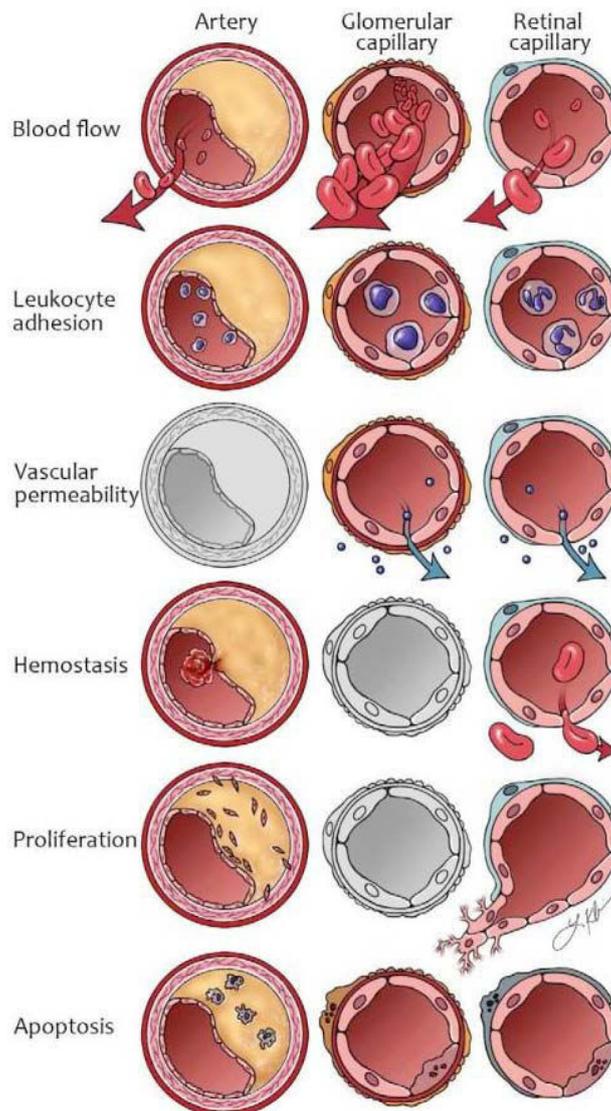


Figure n°6 : dysfonction endothéliale et complications cardiovasculaires du diabète : athérosclérose, néphropathie et rétinopathie⁴³

3. Evaluation du risque cardiovasculaire et pathologie diabétique : facteurs de risque

3.1. Facteurs de risques cardiovasculaires conventionnels

En dehors de la notion de diabète, plusieurs situations physiopathologiques sont conventionnellement considérées comme étant à risque de développer une pathologie cardiovasculaire. Ces facteurs de risque de maladie cardiovasculaire (MCV) peuvent être répartis, selon les classifications, en modifiables ou non modifiables⁹ :

- Les facteurs de risque non modifiables de MCV sont l'âge et le sexe.
- Les facteurs de risque modifiables, qui font l'objet d'une prise en charge thérapeutique, sont :
 - Les dyslipidémies (hyper LDLémie et hypo HDLémie principalement)
 - L'hypertension artérielle
 - Le tabagisme
 - Le surpoids lié directement à la notion de sédentarité

3.1.1. Les dyslipidémies

Plusieurs anomalies lipidiques sont à l'origine d'un risque accru d'athérosclérose.

3.1.1.1. L'hyper LDLémie

De nombreuses études montrent qu'un taux élevé de LDL est associé à une augmentation des pathologies cardiaques ou cardiovasculaires et de la mortalité⁹. Selon la Haute Autorité de Santé (HAS), chez un patient sans facteur de risque, le bilan sera considéré comme normal si le LDL cholestérol est < 1,60 g/l (4,1 mmol/l).

Chez les patients ayant une hyperLDLémie, un traitement reposant initialement sur les règles hygiéno-diététiques sera instauré durant 3 mois, suivi éventuellement d'un traitement médicamenteux hypolipémiant.

3.1.1.2. L'hypo HDLémie

Elle est définie par un HDL-cholestérol < 0,40 g/l (1 mmol/l), est souvent associée à une hypertriglycéridémie, une obésité, ou un diabète de type 2, et peut s'inscrire dans un tableau de syndrome métabolique. Le traitement repose essentiellement sur la correction des facteurs de risque associés, excepté en prévention secondaire, où la prescription d'un fibrate peut être justifiée en cas d'échec diététique (si hypertriglycéridémie avec LDL-cholestérol < 1,0 g/l et HDL-cholestérol < 0,40 g/l). L'hypo HDLémie est un facteur de risque d'évènement cardio-vasculaire à part entière. A l'inverse, un HDL élevé (>0,60 g/l ; soit 1,5mmol/l) est un facteur cardio-protecteur⁴⁴.

3.1.1.3. L'hypertriglycéridémie

Elle est définie par un taux de triglycérides >1,5 g/l (1,7mmol/l) et s'inscrit aussi souvent dans le cadre d'un syndrome métabolique. En cas d'hypertriglycéridémie <4g/l (4,6mmol/l), la prise en charge est avant tout diététique associant une réduction pondérale avec réduction des glucides simples, une activité physique, et une réduction de la consommation d'alcool.

3.1.1.4. L'apolipoprotéine A1 et l'apolipoprotéine B

L'apoA1 est le principal composant possédant une activité anti-athérogène biologiquement active de l'HDL cholestérol. L'apoB est un transporteur de particules VLDL (very low-density lipoprotein), IDL (intermediate-density lipoprotein) et LDL, toutes potentiellement athérogènes. Un rapport apoB / apoA1 élevé est associé à un plus grand nombre d'IDM, comme l'a montré l'étude INTERHEART⁴⁵. Une méta analyse montre que ce rapport apoB / apoA1 est un meilleur indicateur d'athérosclérose que le cholestérol LDL ou le rapport cholestérol total/HDL⁴⁶.

3.1.2. L'hypertension artérielle

Chez le diabétique, l'hypertension artérielle (HTA) représente un facteur aggravant de la néphropathie, de la rétinopathie, et de la cardiopathie diabétique.

L'objectif tensionnel chez le patient diabétique est donc plus strict : PA < 130/80 mm Hg. L'étude UKPDS⁴⁷ a montré qu'un contrôle tensionnel plus important (objectif TA<150/85 mmHg, avec un traitement par captopril ou atenolol) vs un objectif tensionnel moins strict (TA <180/105 mm Hg) chez le diabétique permet d'en diminuer les complications : réduction de 32% de la mortalité liée au diabète, diminution de 44% du nombre d'AVC et enfin réduction de 37% des complications microvasculaires (rénales ou ophtalmologiques). Cependant, ce contrôle doit être poursuivi de façon durable afin que les bénéfices puissent être maintenus sur le long terme.

3.1.3. L'âge et le sexe

La prévalence des maladies cardiovasculaires augmente avec l'âge. Un âge supérieur ou égal à 45 ans pour l'homme et 55 ans pour la femme est considéré comme un facteur de risque. Chez les patients diabétiques, par contre, le risque relatif de mort par maladie coronarienne est significativement plus élevé chez la femme que chez l'homme⁴⁸.

3.1.4. Le tabagisme

La fumée de tabac est à la fois un facteur prothrombotique et athérogène. C'est un facteur de risque d'IDM, de mort subite, d'anévrisme aortique, et d'atteinte vasculaire périphérique. Cependant, l'arrêt du tabac, même après 65 ans, entraîne une réduction de la mortalité et de la morbidité cardiovasculaire rapide⁴⁹.

3.1.5. Le surpoids et l'élévation du ratio tour de taille/ tour de hanches

L'étude INTERHEART a montré que l'IMC n'était pas un bon marqueur de risque. En revanche, dans cette étude le rapport tour de taille/tour de hanches (TT/TH) était un facteur fortement associé au risque d'IDM. Le tour de taille est lui fortement corrélé au risque d'IDM, alors que le tour de hanches y est inversement corrélé. Les normes de tour de taille sont ≤ 80 cm chez la femme, ≤ 94 cm chez l'homme. Les normes du rapport TT/TH : ≤ 0,85 chez les femmes, ≤ 1 chez les hommes⁵⁰.

3.2. Evaluation du risque vasculaire

3.2.1. Le score de Framingham

Le score de Framingham permet d'estimer le risque à 10 ans de développer une pathologie coronarienne grave. Il a été élaboré grâce aux résultats de l'étude Framingham. Le risque est calculé en fonction de plusieurs données ⁵¹:

- Age
- Sexe
- Cholestérol total
- HDL cholestérol
- Tabagisme
- Pression artérielle systolique
- Présence ou non d'un diabète
- +/- Présence ou non d'une hypertrophie ventriculaire gauche

Il se déroule en 9 étapes avec des scores différents en fonction du sexe. De nombreux logiciels permettent cependant de faire le calcul rapidement. En fonction du score, trois niveaux de risque sont définis :

- Faible : score < 10%
- Intermédiaire : score entre 10 et 20%
- Elevé : score ≥ 20%

Les sociétés savantes européennes et américaines ont fixé à 20% le seuil de risque cardio-vasculaire global nécessitant une intervention thérapeutique ^{9,10,52}.

3.2.2. Risque cardiovasculaire et diabète de type 2

La définition du risque vasculaire chez le patient diabétique diffère quelque peu selon les pays. Aux Etats-Unis, en 1998, Haffner *et al.* ont comparé l'incidence des IDM sur 7 ans chez les diabétiques et les non diabétiques avec ou sans antécédent d'infarctus⁵³. Le risque relatif entre le taux d'IDM chez les non diabétiques en prévention secondaire et chez les diabétiques en prévention primaire était de 1,2 une fois ajusté aux facteurs de risque

traditionnels, les classant donc en risque équivalent. De même, l'American Heart Association, ainsi que l'American Diabetes Association (ADA) considèrent dans leurs recommandations que le patient diabétique doit être traité comme un sujet à risque coronaire équivalent (ayant déjà eu un évènement cardiaque ischémique)^{9,10}.

En France, selon les recommandations HAS, un patient diabétique est considéré comme à haut risque cardio-vasculaire (ou risque cardio-vasculaire équivalent à une prévention secondaire) s'il présente :

- Soit une atteinte rénale, qui est définie par la présence d'une albuminurie 300 mg/24h, ou bien par une diminution du débit de filtration glomérulaire (calcul selon la formule de Cockcroft et Gault) inférieur à 60 ml/min.
- Soit un diabète évoluant depuis plus de 10 ans et au moins 2 facteurs de risque parmi lesquels :
 - Des antécédents familiaux de maladie coronaire précoce (infarctus ou mort subite chez le père ou un parent du 1^{er} degré de sexe masculin avant 55 ans, ou avant 65 ans chez la mère ou un parent du 1^{er} degré de sexe féminin), des antécédents familiaux d'AVC constitués avant l'âge de 45 ans
 - un tabagisme actif ou arrêté depuis moins de 3 ans,
 - une hypertension artérielle,
 - un HDL-cholestérol <0,40 g/l (soit 1 mmol/l),
 - une microalbuminurie (>30 mg/24 heures),
 - un âge ≥ 50 ans pour un homme, ou 60 ans pour une femme.
- Soit, après calcul par des équations de risque, un risque >20% de faire un évènement coronarien dans les 10 ans.

En 2001, dans l'étude ENTRED, 29% des patients diabétiques de type 2 avaient un risque vasculaire élevé (selon les définitions du risque vasculaire de l'HAS suscitées). Ce pourcentage était probablement sous-estimé du fait des fréquences insuffisantes des dosages de microalbuminurie et de cholestérol. Seulement un quart (26%) des personnes à haut risque atteignaient en 2001 l'objectif de LDL inférieur ou égal à 1 g/l.

Bien que discutées d'un pays à l'autre, l'ensemble de ces données met en exergue la réalité d'un risque vasculaire très élevé chez les patients diabétiques de type 2. Il est communément admis que le risque cardiovasculaire est 5 fois supérieur chez les sujets diabétiques comparés à la population non diabétique. Les complications cardiovasculaires qui en résultent (AVC, IM, AOMI, IRC) sont les principales causes de morbi-mortalité des patients diabétique constituant aujourd'hui un réel problème de santé publique au-delà du dépistage et de la prévention du diabète de type 2.

3.3. Améliorer le dépistage du risque cardiovasculaire

Les facteurs de risque (FR) cardiovasculaire (CV) classiques tels que la dyslipidémie, l'hypertension, le tabagisme et le diabète sucré ont été intégrés dans des modèles à variables multiples pour évaluer le risque de survenue d'un accident CV dans la population générale. Ce concept d'estimation globale du risque permet de prédire avec plus de vraisemblance le risque CV, tout en jouant un rôle clé dans l'individualisation des mesures thérapeutiques⁵².

Ainsi que l'a démontré l'étude INTERHEART réalisée sur un collectif de plus de 30 000 participants issus de 52 pays différents, les FR traditionnels sont à même d'expliquer plus de 90% des infarctus du myocarde⁴⁵. Fondés sur ces FR classiques, les algorithmes permettent de stratifier les individus en trois catégories de risque, faible, intermédiaire et élevé. Cependant, il faut tout de même constater que ces modèles ne sont pas parfaits. En effet, dans le cadre de l'étude prospective PROCAM (Prospective cardiovascular muenster), un tiers des victimes d'infarctus du myocarde a été observé dans le groupe des sujets qui avaient été initialement classifiés comme étant à risque intermédiaire⁵⁴.

C'est pour cette raison qu'au cours de ces dernières années un grand nombre de paramètres biochimiques ont été évalués en tant que facteurs potentiels de risque CV avec pour objectif d'améliorer l'évaluation du risque vasculaire aux moyens de méthodes non invasives⁵⁵.

Parmi les biomarqueurs biochimiques actuellement évalués on compte :

- les marqueurs de l'inflammation (CRP Ultrasensible, Homocystéine, Serum Amyloïde A (SAA), Lp-PLA2 (Lipoprotein associated Phospholipase A2), cytokines (IL-6, IL-18) et facteurs chimiotactiques (MCP-1, ICAM-1, VCAM-1)
- les marqueurs lipoprotéiques autres que les marqueurs conventionnellement utilisés (LDL-Ox, Génotypes d'ApoE, Lp(a), Small Dense LDL)
- les marqueurs de l'athéromatose (fibrinogène, D-Dimères (DDI), Activateur tissulaire du plasminogène (TPA),...)
- les marqueurs d'oxydation (homocystéine, Lp-PLA2, AGEs, ...)
- les marqueurs de la néphropathie diabétique (microalbuminurie, cystatine C)

Ces biomarqueurs sont représentatifs de mécanismes physiopathologiques impliqués directement dans le processus de dysfonctionnement endothélial et d'athérosclérose. Ils pourraient constituer des critères de jugement prédictifs de l'apparition d'évènements cardiovasculaires en association ou non aux facteurs de risques conventionnels. Dans cet optique, des investigations cliniques sont en cours.

4. DIABETE, STRESS OXYDANT ET HYPERGLYCEMIE CHRONIQUE

4.1 Hyperglycémie chronique et stress oxydant

Le stress oxydatif correspond globalement à un déséquilibre entre la production cellulaire de radicaux libres, d'espèces réactives de l'oxygène (ROS: Reactive Oxygen Species) et les défenses antioxydantes de l'organisme⁵⁶. La toxicité des radicaux libres varie en fonction de l'intensité et de la durée de leur formation.

La production modérée et transitoire de radicaux libres peut servir de mécanisme de défense en permettant la destruction de cellules cancéreuses. Si la synthèse d'espèces radicalaires est récurrente et chronique alors il y a un déséquilibre entre production et détoxification et stress oxydatif. Dans le cas d'un stress oxydant prolongé, la production excessive d'espèces radicalaires peut engendrer indirectement des mécanismes de mort cellulaire programmée (apoptose, autophagie)⁵⁷.

4.1.1. Définitions des radicaux libres.

Ce sont des espèces chimiques fortement réactives comportant des électrons non appariés au niveau de leur couche externe. La présence d'un électron célibataire confère à ces molécules, la plupart du temps, une grande instabilité. Elles ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés dans des processus le plus souvent non spécifiques, et que leur durée de vie en solution est très courte. La stabilité de ces entités chimiques décroît lorsque le nombre d'électrons célibataires augmente.

Les radicaux sont généralement obtenus par rupture de liaisons chimiques (figure n°7). Étant donné que les liaisons chimiques ont des énergies de l'ordre de centaines de $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, les conditions mises en jeu pour donner des radicaux sont souvent drastiques: hautes températures, radiations ionisantes, ultraviolets. Ils résultent de la coupure homolytique d'une molécule⁵⁸.



Figure n°7 : Coupure Homolytique d'une molécule et production d'espèces radicalaires

4.1.2. Diabète de type 2 et hyperproduction de radicaux libres

Au cours du diabète, et plus particulièrement dans le type 2 lié à un syndrome métabolique, l'hyperglycémie est associée à un stress oxydant lié à une hyperproduction de radicaux libres et ROS.

Le stress oxydant lié à l'hyperglycémie a plusieurs origines (figure n°8 et 10)⁵⁹:

- Le glucose sous sa forme ène-diol en présence de métaux de transitions donne un radical anionique ène-diol. Le radical ène-diol en réduisant l'oxygène moléculaire libère des radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). De plus, il y a formation concomitante d'un dérivé carbonylé au cours de cette réaction. L'anion superoxyde peut se dismuter en peroxyde d'hydrogène qui en présence de métaux de transitions produit un radical hydroxyle (HO^{\cdot}) très réactif⁵⁸.
- La glycation des protéines est par elle-même génératrice d'ROS (espèces réactives de l'oxygène). Toutes les étapes de la glycation génèrent des ROS, aussi bien au stade des produits initiaux que des produits intermédiaires et avancés, conduisant à la formation d'aldéhydes réactifs comme le méthylglyoxal (MGO). Les produits d'AMADORI telle que l'hémoglobine glyquée réagissent avec l'oxygène moléculaire pour former de l'ion superoxyde ou du peroxyde d'hydrogène⁵⁷.
- Un déséquilibre de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la NADPH oxydase présente dans les cellules musculaires et endothéliales génère des radicaux superoxydes. Le gradient de proton généré par la chaîne respiratoire mitochondriale est à l'origine de la production de radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). Cette production de

radicaux superoxydes se situe au niveau de la NADH déshydrogénase du complexe I et à l'interface entre l'ubiquinone et le complexe III.

- L'hyperglycémie prolongée induit la formation de produits terminaux de glycation. Les AGE stimulent les récepteurs membranaires RAGE situés à la surface des cellules endothéliales et musculaires. L'interaction AGE-RAGE stimule des voies de signalisation comportant les voies des Mitogen-Activated Proteine Kinases (MAPK) et la voie du facteur de transcription NFκB (Necrosis Factor kappa B) induisant la production de radicaux libres via la stimulation de la NADPH oxydase.
- L'hyperglycémie induit l'augmentation de la production de sorbitol par la voie des polyols. La production de sorbitol a pour conséquence la baisse de NADPH intracellulaire. En effet, le NADPH est nécessaire à l'activité de l'aldose réductase pour la synthèse du sorbitol. Le NADPH étant diminué, le glutathion oxydé sera réduit plus faiblement. De plus, le sorbitol est oxydé en fructose avec réduction du NAD⁺ en NADH,H⁺. L'augmentation de la concentration en sorbitol et fructose conduit à un oedème osmotique au niveau oculaire, ce qui explique que la voie des polyols joue un rôle clé dans la cataracte induite par le diabète⁶⁰. La voie des polyols entraîne la baisse du NADPH ce qui provoque une baisse d'activité de la NO-synthase qui synthétise le NO. Le radical superoxyde induit une baisse du NO en réagissant avec celui-ci et en formant un anion peroxyde très réactif. La baisse de concentration en NO pourrait être à l'origine de phénomènes d'hypertension car le NO est un puissant vasodilatateur. La biodisponibilité du NO est, de plus, diminuée par trois mécanismes :
 - Diminution d'activité de la NO-synthase, consécutive à la chute du rapport NADPH,H⁺/NADP⁺.
 - Réaction du NO avec l'anion superoxyde conduisant à la formation de peroxyde, oxydant puissant.
 - Piégeage du NO par les AGE.

- L'hyperglycémie induit la synthèse de diacylglycerol conduisant à l'activation de la voie de la protéine kinase C. La protéine kinase C stimule la NADPH oxydase provoquant la production d'espèces réactives de l'oxygène⁶¹.

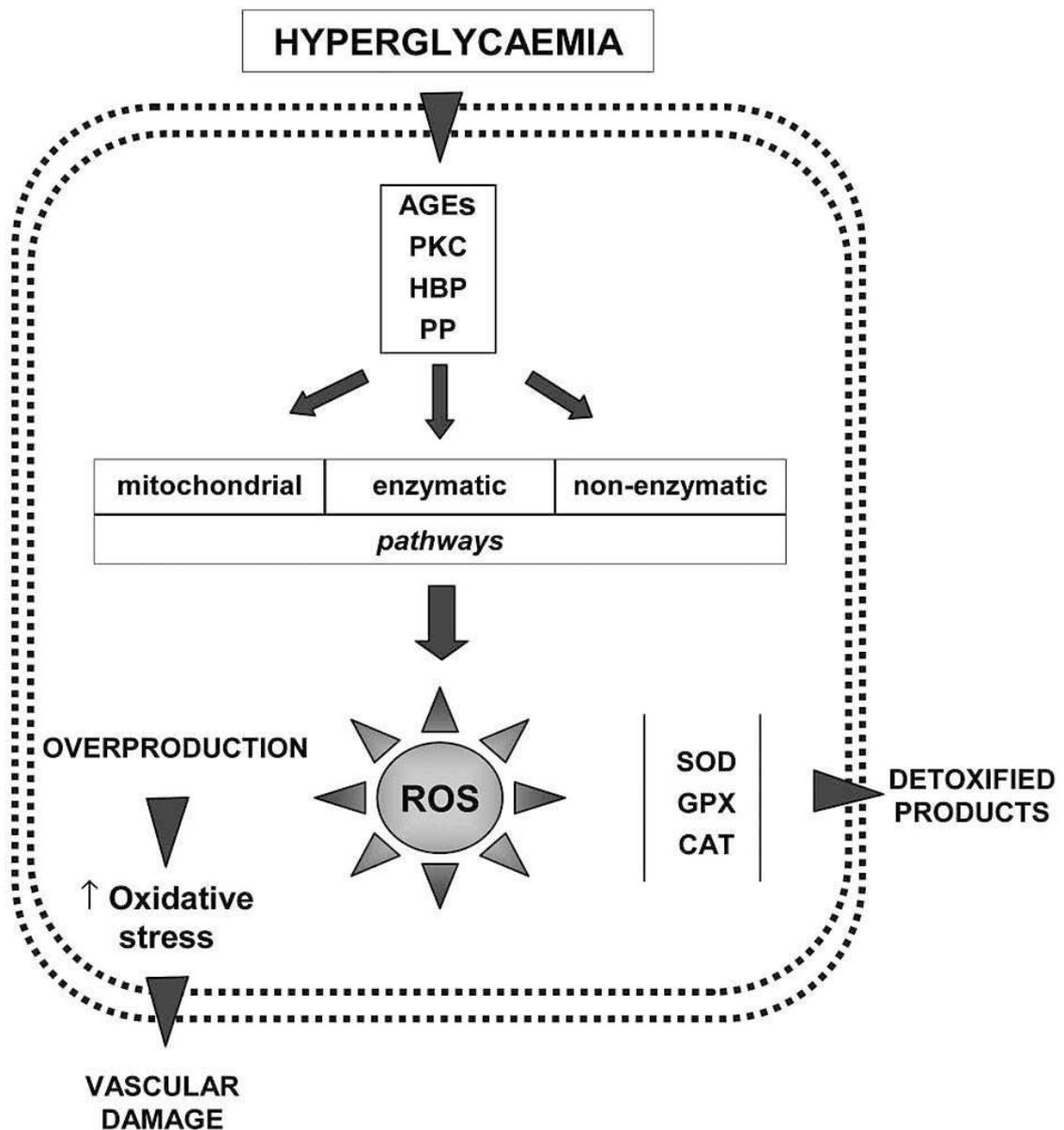


Figure n° 8 : représentation schématique des mécanismes de production de ROS au cours du diabète (AGES: advanced glycation end products; CAT: catalase; GPX: glutathione peroxidase; HBP: hexosamine biosynthetic pathway; PKC: protein kinase C; PP: polyol pathway; ROS: reactive oxygen species; SOD: superoxide dismutase)⁵⁹

4.1.3. Les défenses antioxydantes.

L'organisme possède un ensemble de défenses antioxydantes pour se protéger des ROS (figure n°10). L'organisme comporte deux types de défenses antioxydantes. L'une d'origine endogène formée d'enzymes et l'autre d'origine exogène constituée principalement de vitamines et d'oligoéléments.

4.1.3.1. Les systèmes de défenses enzymatiques.

-Les superoxydes dismutases (SOD).

Ces sont des métalloprotéines. Elles sont en première ligne dans le système de défense du stress oxydant. Elles assurent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Il existe trois isoenzymes de la SOD: la Cu/Zn-SOD1 présente dans le cytosol, la Mn-SOD2 mitochondriale et la Cu/Zn-SOD3. La SOD3 est sécrétée par les cellules musculaires lisses et représente le système de défense majeur dans la paroi des artères. L'expression de la SOD3 est augmentée par les facteurs vasoactifs comme l'histamine, l'endothéline 1 et l'angiotensine 2, et diminuée par l'homocystéine⁵⁶.

-Les glutathion peroxydases (GPxs).

Les GPxs sont des sélénoprotéines. Les GPxs réduisent les peroxydes lipidiques formés par l'oxydation des acides gras polyinsaturés. Le taux de GPxs est effondré en cas de déficit en sélénium. A partir d'un taux élevé en sélénium la concentration en GPxs atteint un plateau. Le dosage des GPxs ne peut être utilisé comme marqueur d'une intoxication au sélénium. La synthèse des GPxs étant rénale et hépatique, l'insuffisance rénale et/ou hépatique peuvent faire varier leurs taux⁵⁶.

-Le système thiorédoxine.

La thiorédoxine est l'antioxydant majeur qui maintient les protéines intracellulaires à l'état réduit. La thiorédoxine est régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase. La thiorédoxine contient un groupement sélénocystéine dans son site actif. De plus, elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène. Elle permet la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique⁵⁶.

-La catalase.

La catalase est une enzyme héminique constituée de quatre sous-unités contenant chacune un groupement héminique Fe^{2+} lié au site actif. Elle est localisée dans les peroxysomes et les hématies. La réaction que catalyse cette enzyme consiste en une dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en oxygène et eau⁶⁰.

4.1.3.2. Les systèmes de défenses non enzymatiques.

-Le glutathion

Le glutathion est formé par la condensation de trois acides aminés (acide glutamique, cystéine et glycine). Il est la source majoritaire de résidus thiols (-SH) dans la cellule où il est présent sous forme réduite (GSH). En condition physiologique normale, sa forme oxydée (GSSG) est présente en très faible concentration. Le rapport GSH/GSSG est un excellent marqueur de la peroxydation lipidique. Ce rapport tend à diminuer lors d'un exercice physique intense et au cours du vieillissement⁵⁶.

- L'albumine et les protéines-thiols

Toutes les protéines circulantes qui contiennent des groupements thiols participent aux défenses antioxydantes contre les ROS⁶².

Parmi ces protéines, l'albumine tient une place prépondérante, cette protéine est la plus abondante du plasma, elle constitue le principal tampon contre les ROS circulants. Cette protéine de 585 acides aminés est composée de 3 domaines homologues divisés en 9 boucles dont la stabilité est assurée par 17 ponts disulfures, conférant à cette protéine une certaine flexibilité (figure n°9)⁶³.

L'albumine constitue donc l'antioxydant protéique majeur du plasma, compartiment fortement sollicité par le stress oxydatif et en contact direct avec l'endothélium vasculaire. La plupart de ses propriétés antioxydantes sont attribuées à sa capacité de fixation de nombreux ligands de par l'adaptabilité importante de sa structure. L'albumine est en effet une protéine de transport de nombreux métabolites, xénobiotiques, lipides ou encore de

métaux divalents. Dans ce cadre elle présente un effet antioxydant indirect puisqu'elle limite l'effet de molécules prooxydantes par liaison à l'albumine.⁶⁴

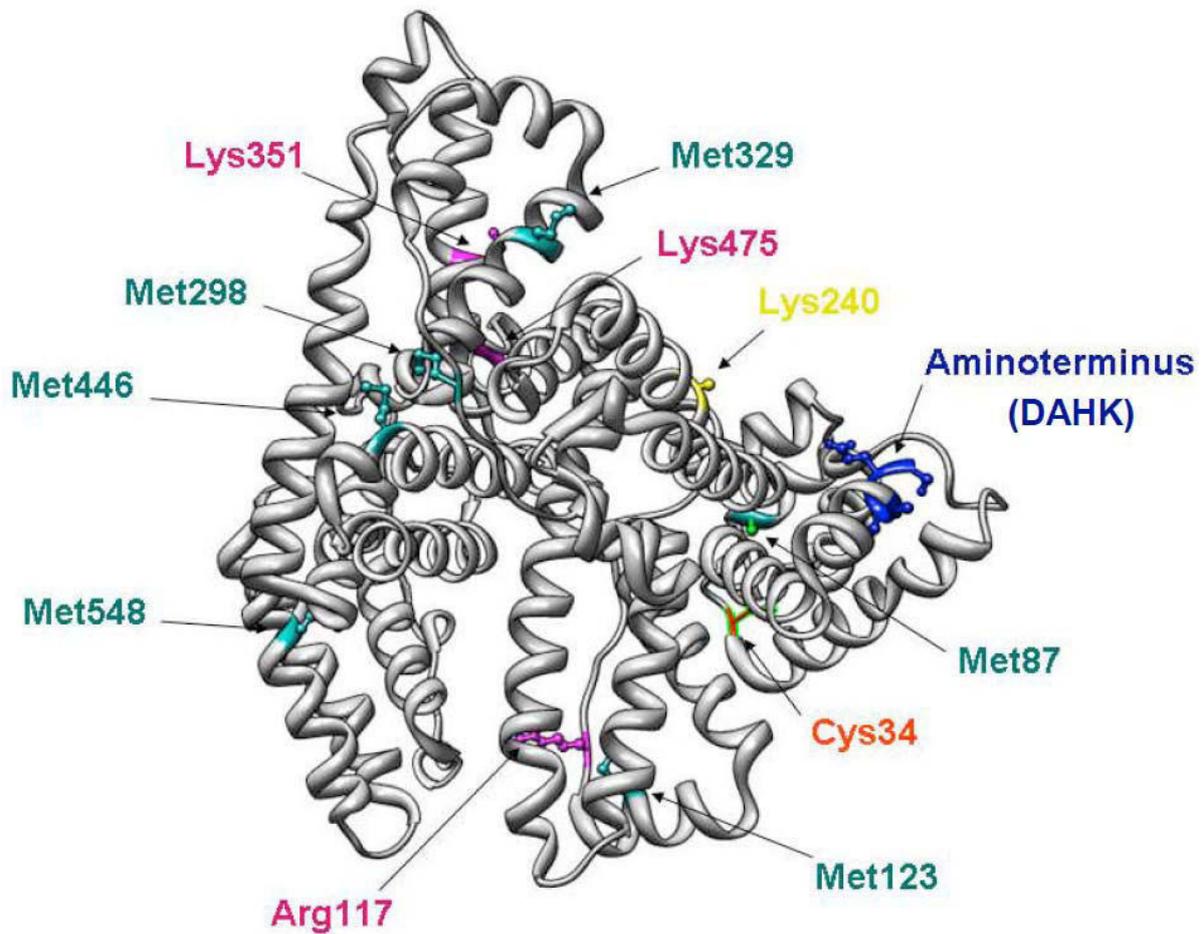


Figure n° 9: Principaux sites de l'albumine impliqués dans son activité antioxydante⁶⁴.

De plus son seul groupement thiol libre au niveau du résidu Cys34 lui confère d'une part des capacités de fixation de ligands supplémentaires et surtout la possibilité de piéger des radicaux libres.⁶⁵ Chez un adulte normal, environ 70 à 80% du résidu Cys34 de l'albumine est à l'état réduit (S-H). Le reste est sous la forme de ponts disulfures avec plusieurs composés soufrés comme la cystéine, l'homocystéine et le glutathion. Le groupement -SH de l'albumine représente un site de protection antioxydant puissant, contre les ROS et d'autres espèces radicalaires.

-La vitamine C (acide ascorbique).

L'homme ne peut synthétiser la vitamine C et doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg via une alimentation riche en fruits. La vitamine C est un piègeur d'ROS comme le

radical hydroxyle ou l'anion superoxyde en agissant en synergie avec la vitamine E. En effet, elle inhibe la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques⁶⁶.

-La vitamine E.

Le terme de vitamine E désigne un ensemble d'isomères qui comprend les tocophérols et les tocotriénols. Les deux isomères α -et β -tocophérol sont intéressants d'un point de vue biologique. Ayant un caractère lipophile, ils s'insèrent aux seins des membranes cytoplasmiques riches en acides gras polyinsaturés. Ils réagissent avec les radicaux peroxydes ROO^{\cdot} pour former un radical tocophéryle, et ainsi ils limitent la propagation de la peroxydation lipidique.

-Les caroténoïdes.

Parmi plus de 600 caroténoïdes différents, le β -carotène est le chef de file. On le retrouve dans l'abricot, le melon, la carotte et les légumes verts. L'effet bénéfique du β -carotène n'est présent qu'à dose physiologique ou alimentaire. A dose pharmacologique, le β -carotène est délétère, surtout chez le fumeur car les ROS altèrent le métabolisme des caroténoïdes et libèrent des métabolites pro-carcinogènes⁵⁶.

-Le Coenzyme Q10 ou ubiquinone.

C'est un dérivé benzoquinolique à longue chaîne latérale isoprénique. Sa chaîne latérale lui confère un caractère lipophile. Il joue un rôle essentiel dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et il est un puissant inhibiteur de la peroxydation lipidique⁵⁶.

-L'acide urique.

Il est présent sous la forme d'urate à pH physiologique et c'est le produit terminal majeur du métabolisme des purines. L'urate est un puissant piègeur de ROS. Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront réduites, notamment par la vitamine C. L'allantoïne qui est un produit de la réaction entre l'urate et les ROS est présent à des taux élevés lors d'un stress oxydant⁵⁶.

-La bilirubine.

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème par les cellules réticuloendothéliales. La bilirubine non soluble se lie à l'albumine dans un rapport stœchiométrique 1/1, ainsi sa liaison à l'albumine l'empêche de pénétrer dans les tissus riches en lipides tels que le cerveau. La bilirubine piège les radicaux ROO[•] et l'oxygène singulet. Ainsi la bilirubine protège l'albumine des ROS⁵⁶.

-Les polyphénols.

Ils sont naturellement présents dans l'alimentation. Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges et le vin rouge. Ils sont sous forme de flavonoïdes dans les agrumes et l'huile de lin, et enfin sous forme d'épicatéchine dans le vin, le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues brunes⁶⁷. Ce sont d'excellents piègeurs de ROS et de très bons chélateurs de métaux de transition comme le cuivre et le fer.

-Les oligoéléments :

- Le sélénium. Le sélénium est un cofacteur de la GPx, il est donc antioxydant de façon indirect. On retrouve le sélénium organique dans l'alimentation, sous forme d'un acide aminé, la sélénocystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique conduisant à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de la GPx.
- Le cuivre. A concentration physiologique le cuivre est le cofacteur d'une SOD, cependant, il peut jouer un rôle dans la production de ROS (réaction de FENTON) lorsque sa concentration est élevée.
- Le zinc. Le zinc est un cofacteur essentiel de la SOD. Il protège les groupements thiols des protéines. Il peut inhiber les réactions de formation de ROS induites par les métaux de transition comme le fer ou le cuivre⁵⁶.

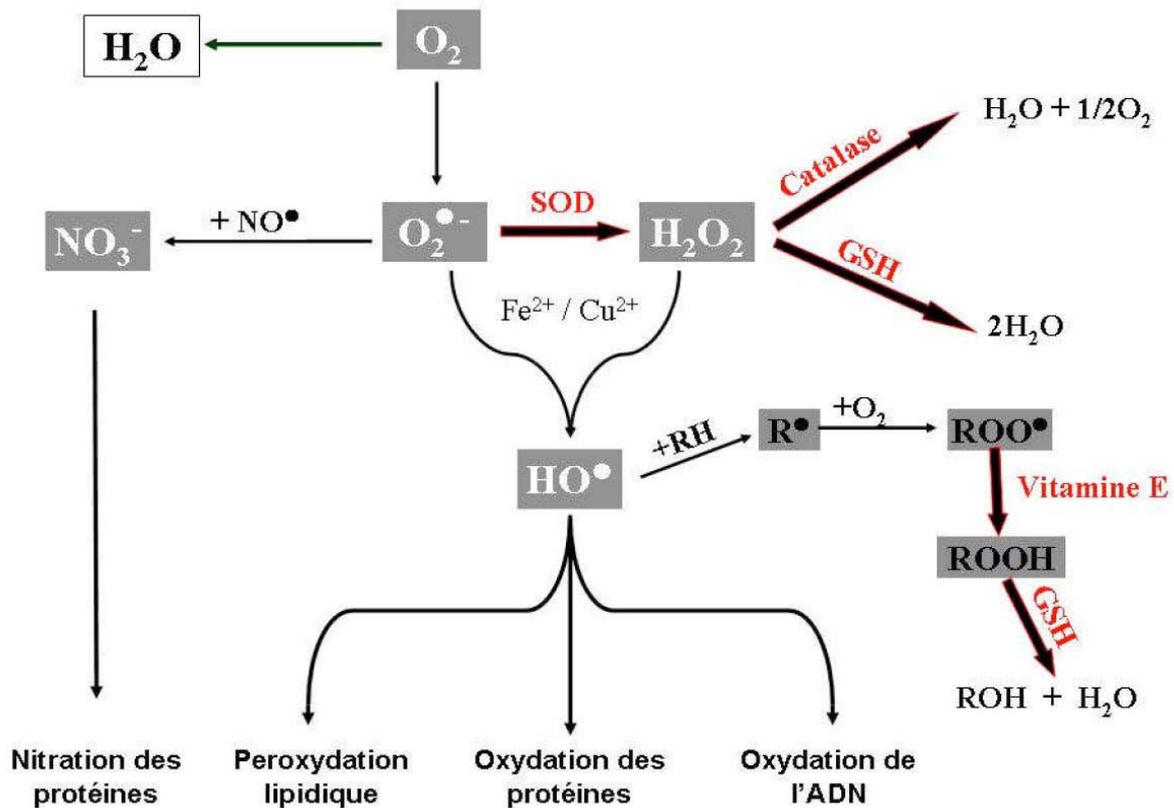


Figure n° 10 : Mécanismes physiologiques de génération de ROS et principales défenses antioxydantes⁵⁶

4.1.4. Conséquences de l'hyperproduction d'espèces réactives de l'oxygène.

Les ROS réagissent avec leur environnement et le dégradent. Ils réagissent avec :

4.1.4.1. Modifications oxydatives de l'ADN.

Par exemple, la guanine peut réagir avec un radical OH pour former la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine qui s'apparie avec une adénine au lieu d'une cytosine. Ceci entraîne alors des mutations au sein de l'ADN qui conduisent à l'altération du message génétique et peut déclencher un cancer et augmenter le vieillissement⁶⁸. L'anion superoxyde provoque des cassures au niveau de l'ADN, ceci induit le fonctionnement des poly (ADP-ribose) polymérase qui sont des enzymes de réparation de l'ADN. L'excès d'ADP-ribose formé par cette hyperactivité enzymatique vient se fixer sur la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et ainsi, l'inhibe. L'accumulation des métabolites de la glycolyse en amont

est responsable de l'activation de quatre voies métaboliques (voie des polyols, voie des hexosamines, voie de la PKC et la voie des AGE)⁶⁸.

4.1.4.2. Modifications oxydatives des protéines.

Les acides aminés les plus réactifs aux ROS sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. L'attaque de produits radicalaires sur les protéines entraîne l'oxydation de certains résidus avec pour conséquences l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts disulfures intra et inter-chaînes.

L'albumine, protéine circulant la plus abondante, présente une activité antioxydante très importante puisqu'elle présente de nombreux sites lui permettant de piéger des radicaux libres (figure n°9)⁶⁴. Cette propriété vaut à l'albumine de subir d'importantes modifications oxydatives puisqu'elle est la cible privilégiée des radicaux libres circulants. Si les modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine au cours d'un stress oxydatif prolongé n'ont pas toutes fait l'objet d'une description détaillée, l'albumine modifiée par l'ischémie encore appelée IMA (Ischemia Modified Albumin), premièrement décrite lors d'épisode ischémiques du type syndrome coronarien aigu (SCA) ou infarctus du myocarde (IM), est aujourd'hui communément reconnue comme un marqueur du stress oxydant.⁶⁹

Cette forme d'albumine est caractérisée par une capacité de liaison d'ions bivalents diminués, plus particulièrement le Co^{2+} . L'IMA est donc mise en évidence dans le plasma par mesure de la capacité de liaison de Cobalt en excès rapporté à la concentration plasmatique d'albumine.⁷⁰ La concentration d'IMA est inversement proportionnelle à la concentration de Cobalt non lié à l'albumine et est le reflet de l'impact du stress oxydant dans le compartiment plasmatique.⁷¹

De nombreuses études ont mis en évidence ces dernières années l'augmentation de l'IMA dans des pathologies chroniques sujettes à un fort stress oxydant (diabète, athérosclérose)^{72,73,74,75}.

La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes comme par exemple la non reconnaissance d'un récepteur par un ligand ou une perte d'activité enzymatique. Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire^{63,76}.

Les protéines modifiées par le stress oxydant présentent très certainement un rôle dans les mécanismes physiopathologiques impliqués dans des pathologies chroniques comme le diabète. Par exemple, les modifications oxydatives de protéines comme l'albumine, sont elles-mêmes source de radicaux libres et d'un stress oxydant qui a pu être mis en évidence *in vitro* sur des monocytes⁷⁷.

4.1.3.3. Modifications oxydatives des lipides membranaires.

En phase d'initiation le radical hydroxyle peut arracher un hydrogène sur les carbones situés entre une double liaison. Le radical lipidique réagit avec l'oxygène et forme un radical peroxyde (ROO[•]). Celui-ci est capable d'arracher un hydrogène à l'acide gras polyinsaturé voisin et ainsi de propager la réaction. Ceci induit une altération de la fluidité membranaire et conduit à la mort cellulaire. Les peroxydes formés sont neutralisés par la glutathion peroxydase, ou, ils continuent de s'oxyder et de se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonéanal) qui ont des activités pro-athérogènes et cancérogènes.

4.1.3.4. Modifications oxydatives des lipoprotéines.

Les LDL oxydées sont captées par des récepteurs spécifiques situés sur les macrophages. Les macrophages se transforment alors en cellules spumeuses qui ont un rôle dans les premières étapes de l'athérosclérose. Les LDL oxydées sont immunogènes et les complexes formés activent la voie classique du complément⁵⁶.

4.2. Hyperglycémie chronique et AGEs (advanced glycation end-products).

4.2.1. Formation des AGEs : phénomène de Glycoxydation

Le terme de glycation non enzymatique désigne les modifications tardives induites par la fixation d'oses simples sur les groupements aminés des protéines. C'est une réaction générale, spontanée, irréversible et cumulative procédant en plusieurs étapes. Une phase précoce qui commence par la formation d'une liaison aldimine (base de Schiff) capable de subir un réarrangement moléculaire dit réarrangement d'Amadori. L'HbA1c et les fructosamines sont des exemples caractéristiques des produits d'Amadori⁵⁷.

Les produits d'Amadori ne constituent pas un état définitif. Au cours d'une phase plus tardive, ils subissent des réactions oxydatives formant des intermédiaires dicarbonylés réactifs (MGO ou le 3désoxyglucosone) et aboutissant à la formation de structures plus complexes appelées AGEs: on parle alors de glycoxydation, phénomène combinant les mécanismes de glycation et d'oxydation des protéines (figure n°11)^{57,78,79}.

Les AGEs interviennent dans différents phénomènes tels que l'inflammation, l'apoptose cellulaire, le remodelage tissulaire ou l'angiogénèse. La plupart des réactions de glycation s'accompagnent de réactions d'oxydation qui sont à l'origine du terme de glycoxydation. Les différentes étapes de la glycation sont génératrices de ROS. Les ROS induisent la formation d'aldéhydes réactifs dont l'un des plus abondant est le MGO. Ces produits intermédiaires réagissent avec les groupements aminés libres des protéines afin de former des AGEs.

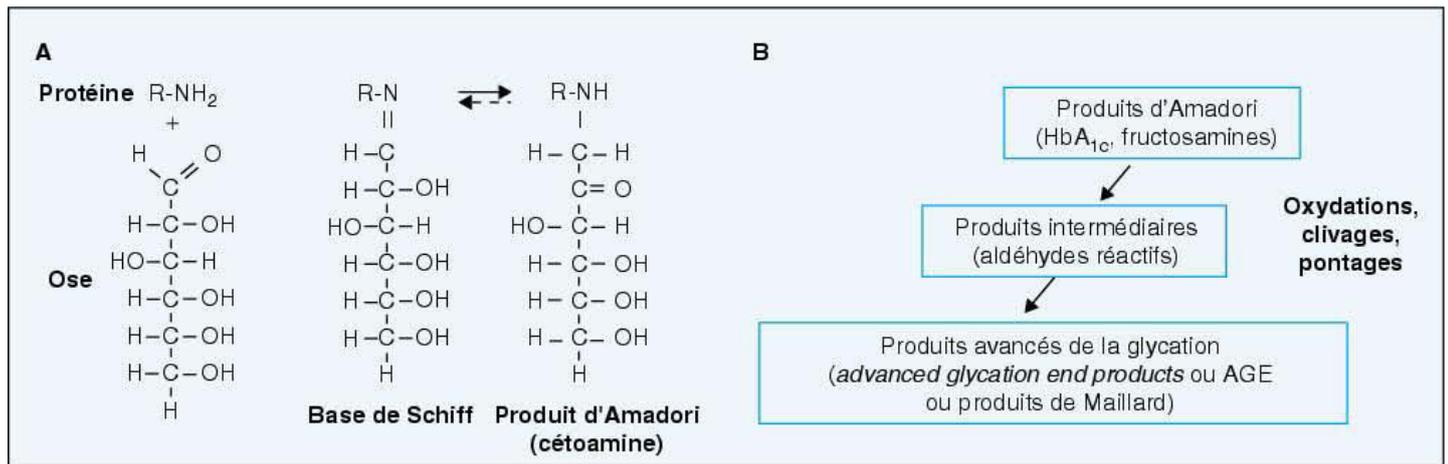


Figure n°11 : Formation des produits d'Amadori et réarrangement oxydatifs en produits avancés de glycation – Phénomène de glycoxydation⁵⁷.

Les voies de la glycation aboutissent à des composés communs avec ceux issus de la peroxydation lipidique comme par exemple la carboxyméthyllysine⁸⁰.

Tous les AGEs n'ont pas encore été identifiés et les mécanismes sous-jacents à leur formation restent incomplètement élucidés. La CML et la pentosidine ont été les plus étudiés car elles possèdent des propriétés antigéniques, ainsi elles peuvent être localisées et quantifiées à l'aide de techniques immunologiques. Les taux sériques de CML ont corrélés avec le développement de lésions microvasculaires chez des patients diabétiques de type 2⁸¹. Au cours de l'insuffisance rénale, on observe une importante accumulation de CML dans l'organisme, liée à un défaut d'élimination du rein.

Les différents AGEs aujourd'hui décrits, identifiés à partir de mécanismes de glycoxydation d'albumine *in vitro*, sont présentés dans la figure n°12⁷⁹.

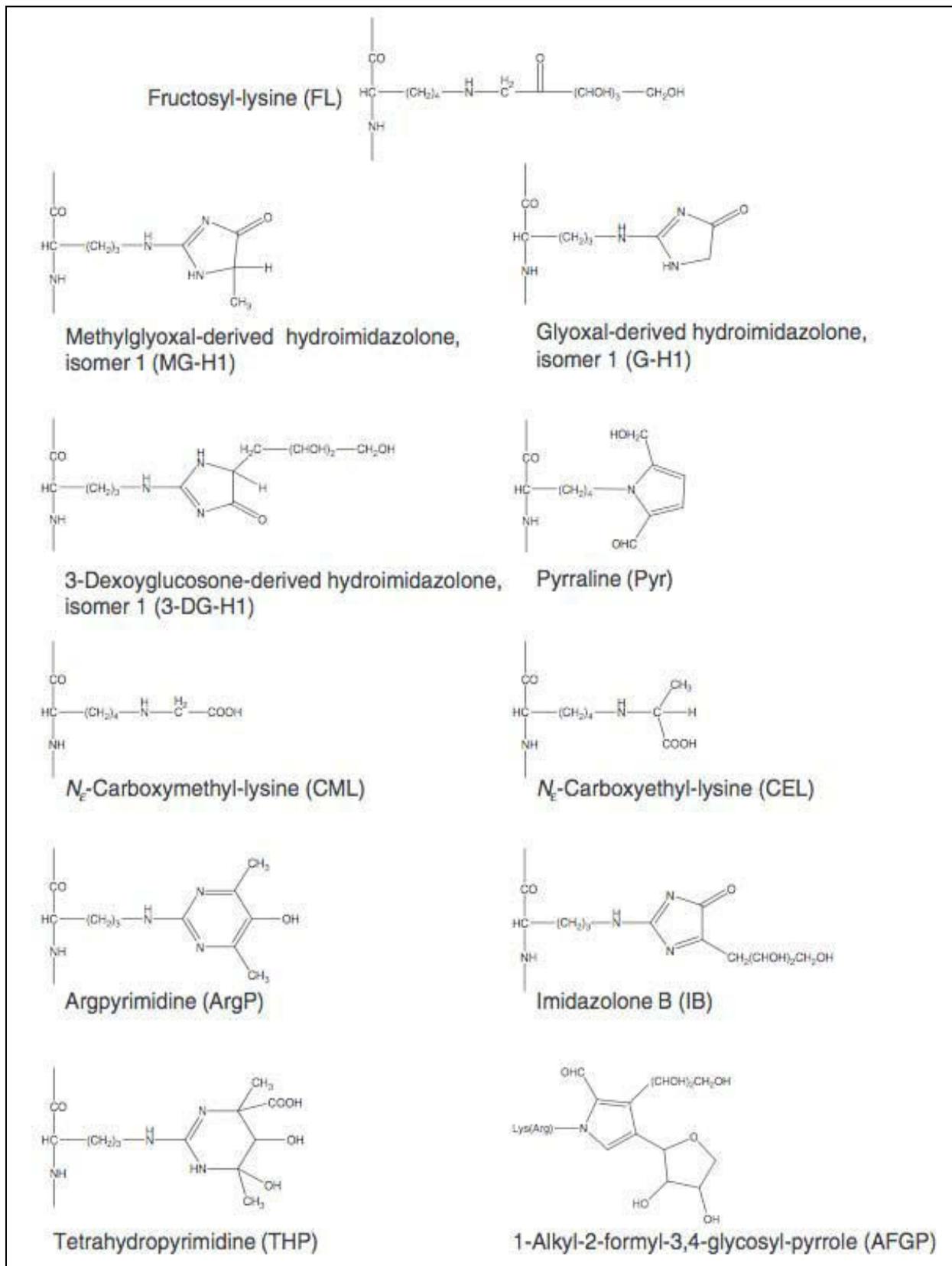


Figure n°12 : Différentes formes d'AGEs rencontrés au cours du diabète⁷⁹

4.2.2. Effets des AGEs sur la matrice extracellulaire, les protéines circulantes et cellulaires.

4.2.2.1. AGEs et matrice extracellulaire

On observe dans les tissus une réticulation des protéines et la formation d'agrégats. Il existe plusieurs mécanismes à l'origine de ce phénomène. Le premier mécanisme est l'oxydation de groupement sulfhydryle en ponts disulfures. Un deuxième mécanisme existant est la formation de liaisons covalentes entre produits avancés de glycation. Ces liaisons covalentes entre AGEs expliquent l'augmentation des espaces intermoléculaires du collagène responsable d'hyperperméabilité vasculaire et des défauts de polymérisation de tubuline axonale. Une troisième voie est la formation de liaisons covalentes de protéines plasmatiques au niveau de groupements réactifs générés par la glycation⁶³. Des liaisons croisées s'établissent entre AGEs, collagène, albumine et LDL (low density lipoprotein) au niveau des membranes basales, ceci implique le rôle des AGE dans la microangiopathie et dans la macroangiopathie diabétique⁸². Les AGEs s'accumulent dans les tissus et notamment sur les protéines à longue durée de vie comme le collagène de type I⁷⁸.

Les AGEs peuvent se lier à la laminine, protéine structurale de la matrice extracellulaire, et induire une diminution de la liaison d'autres composants majeurs et notamment les protéoglycannes. Ces derniers empêchent la fuite protéique au niveau de la membrane basale glomérulaire en lui conférant une charge négative⁸³. Il existe une corrélation entre la concentration en AGEs et la sévérité de la pathologie rénale dans des modèles expérimentaux d'animaux. On trouve une augmentation en CML (Carboxy Methyl Lysine) dans les protéines solubles et insolubles du collagène chez les insuffisants rénaux diabétiques. La dénaturation du collagène par les AGEs et leur capacité à retenir les protéines plasmatiques est à l'origine de l'épaississement de la membrane basale du glomérule. Les AGEs sont à l'origine de l'expansion mésangiale ce qui a pour conséquence une baisse de la filtration glomérulaire par compression des capillaires. Il a été démontré que les AGEs augmentent la libération de TGF- β (Tumor Growth Factor β) qui stimule la synthèse de collagène et donc l'épaississement de la membrane basale⁸⁴.

4.2.2.2. AGEs et acides nucléiques

Les AGE sont susceptibles de réagir avec les groupements aminés des nucléotides, et donc, de conduire ainsi à des coupures de l'ADN. Les AGEs pourraient être impliqués dans les embryopathies diabétiques. Au niveau oculaire, la modification du cristallin par les AGEs explique en grande partie l'opacification progressive et l'apparition de cataracte survenant au cours du diabète. On retrouve des concentrations élevées d'AGEs au niveau de l'humeur vitrée du patient diabétique, en rapport avec la rétinopathie diabétique⁶¹. Les AGEs pourraient contribuer à l'augmentation de la perméabilité vasculaire en altérant l'adhérence des cellules endothéliales et compromettant leur réplication normale.

4.2.2.3. Effets des AGEs sur les protéines : cas particulier de l'albumine

Il existe aussi une glycation des protéines circulantes. La formation de l'hémoglobine glyquée induit une augmentation de sa viscosité au sein des globules rouges.

La glycation protéique peut entraîner une altération d'activités enzymatiques, liées à la présence de résidus de lysine au voisinage du site actif ou à des modifications conformationnelles.

L'albumine, principale protéine circulante, subit également d'importantes modifications par mécanismes glycoxydatifs pour former des AGEs.

Nous nous sommes attachés dans cette étude à décrire les effets de la glycoxydation sur de cette protéine en étudiant ses propriétés structurales mais aussi fonctionnelles : transport de molécules endogènes et xénobiotiques, propriété antioxydantes, maintien de l'homéostasie plasmatique⁸⁵.

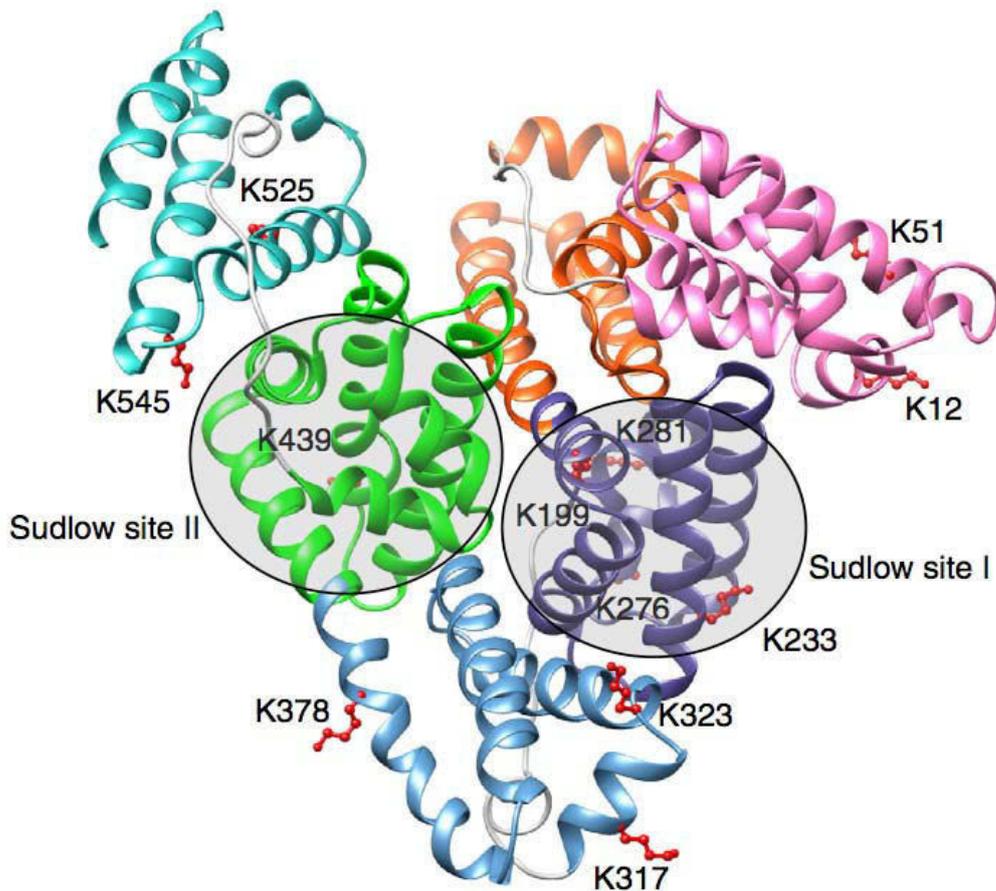


Figure n°13 : Structure tridimensionnelle de l'albumine : représentation des sites de liaison spécifique de Sudlow (type 1 et type 2) et des principaux sites de glycation (lysines)⁷⁹

La formation des AGEs sur des protéines intracellulaires est possible au niveau des tissus non insulino-dépendants. L'hyperglycémie peut induire une augmentation intracellulaire de sucres comme le fructose, le glucose-6-phosphate et les composés réactifs dicarbonylés. Il se forme alors des AGE à partir des protéines cytosoliques et de ces sucres. La glycation du bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) dans les cellules endothéliales affecte son activité mitogénique⁸⁶.

Les LDL subissent aussi une glycation lors d'hyperglycémie prolongée. La glycation des LDL est souvent accompagnée d'une oxydation. Cette oxydation contribue à l'accumulation de LDL oxydées pro-athérogènes dans le sang. Cette glycation empêche leur reconnaissance par les récepteurs aux LDL et ainsi elle diminue leur clairance. De plus, la glycation des HDL a

pour conséquence la baisse de l'activité de la paraoxonase. La paraoxonase prévient l'oxydation des LDL et l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales de l'aorte, ces deux paramètres sont des évènements initiaux clés dans la formation de la plaque d'athérome. De plus, la présence d'AGEs au niveau du collagène des parois artérielles permet de piéger les LDL et/ou d'autres protéines plasmatiques favorisant ainsi la formation de la plaque d'athérome⁸⁴. Au niveau endothélial, les AGEs sont capables de piéger le monoxyde d'azote puissant vasodilatateur⁶¹.

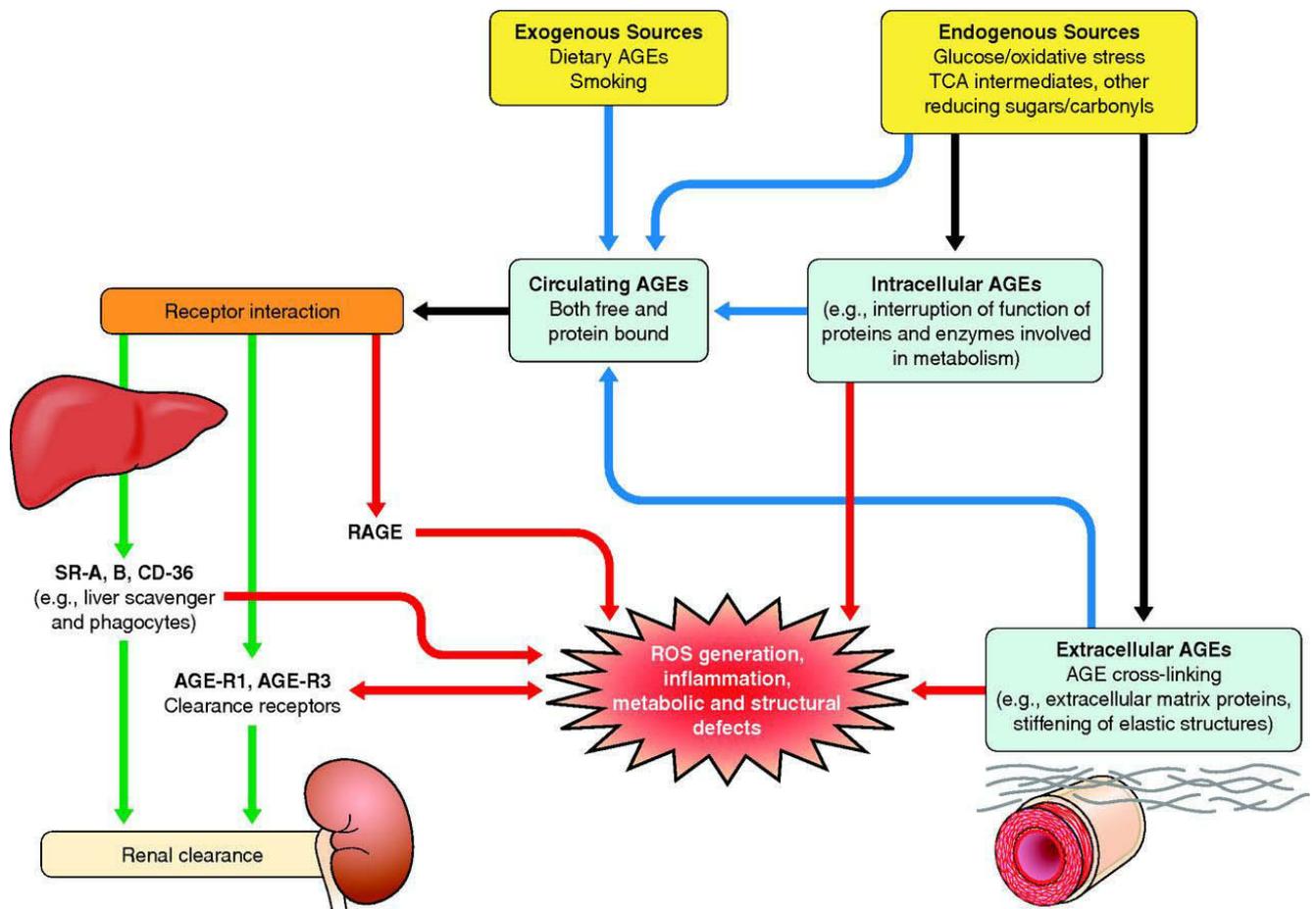


Figure n°14 : Produits avancés de Glycation – Sources et implications physiopathologiques²⁰

4.2.3. Les Récepteurs aux AGEs.

4.2.3.1 Les différents récepteurs aux AGE.

Les AGEs ont la capacité de se lier à différentes protéines membranaires spécifiques : les RAGE (receptor for advanced glycation end products), les AGE récepteurs 1 (protéine OST48 du complexe oligosaccharyl-transférase), les AGE récepteurs 2 (protéine 80K-H, substrat membranaire de protéines kinases), les AGE récepteurs 3 (galectine-3) et les récepteurs scavengers de classe A et B^{87,88}. Les récepteurs scavengers internalisent les AGE et peuvent fixer les LDL glycoxydées⁸⁹.

4.2.3.2 Le Récepteur RAGE

Le RAGE est un récepteur multi-ligands transmembranaire appartenant à la super famille des immunoglobulines. Le RAGE est une protéine de 45 kDa présente à la surface de nombreuses cellules comme les cellules endothéliales, les lymphocytes, les monocytes, les polynucléaires et les neurones⁶⁸. Il est constitué d'une région extracellulaire comprenant un domaine V variable et de deux domaines C et C' constants, d'un seul domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique court (moins de 50 acides aminés)⁸¹.

Il existe plusieurs isoformes de RAGE (figure n°15)^{90,91,88} :

- Les RAGE membranaires peuvent être entiers ou tronqués. Les formes tronquées ne transmettent pas le signal. Les RAGE entiers transmettent un signal pathogène à la cellule.
- Les RAGE solubles (sRAGE) sont présents dans la circulation sanguine. Les sRAGE sont le résultat d'un clivage des RAGE membranaires par des métalloprotéinases⁸². Les RAGE solubles ont la propriété de se lier aux AGE circulants, et donc de limiter leurs effets pathologiques. Les diabétiques de type 2 ont un taux circulant de sRAGE diminué par rapport à une personne non diabétique.
- Les esRAGE (endogenous secretory RAGE) sont le résultat d'un épissage alternatif de la partie C-terminale de RAGE. Les esRAGE ne possèdent pas de domaines membranaires et cytoplasmiques.

- Les DN-RAGE (Dominant Negative RAGE) présents au niveau de la membrane plasmique. Cette forme de RAGE présente une partie extracellulaire identique à celle du RAGE mais est dépourvue de site d'action cytoplasmique empêchant toute transduction du signal.

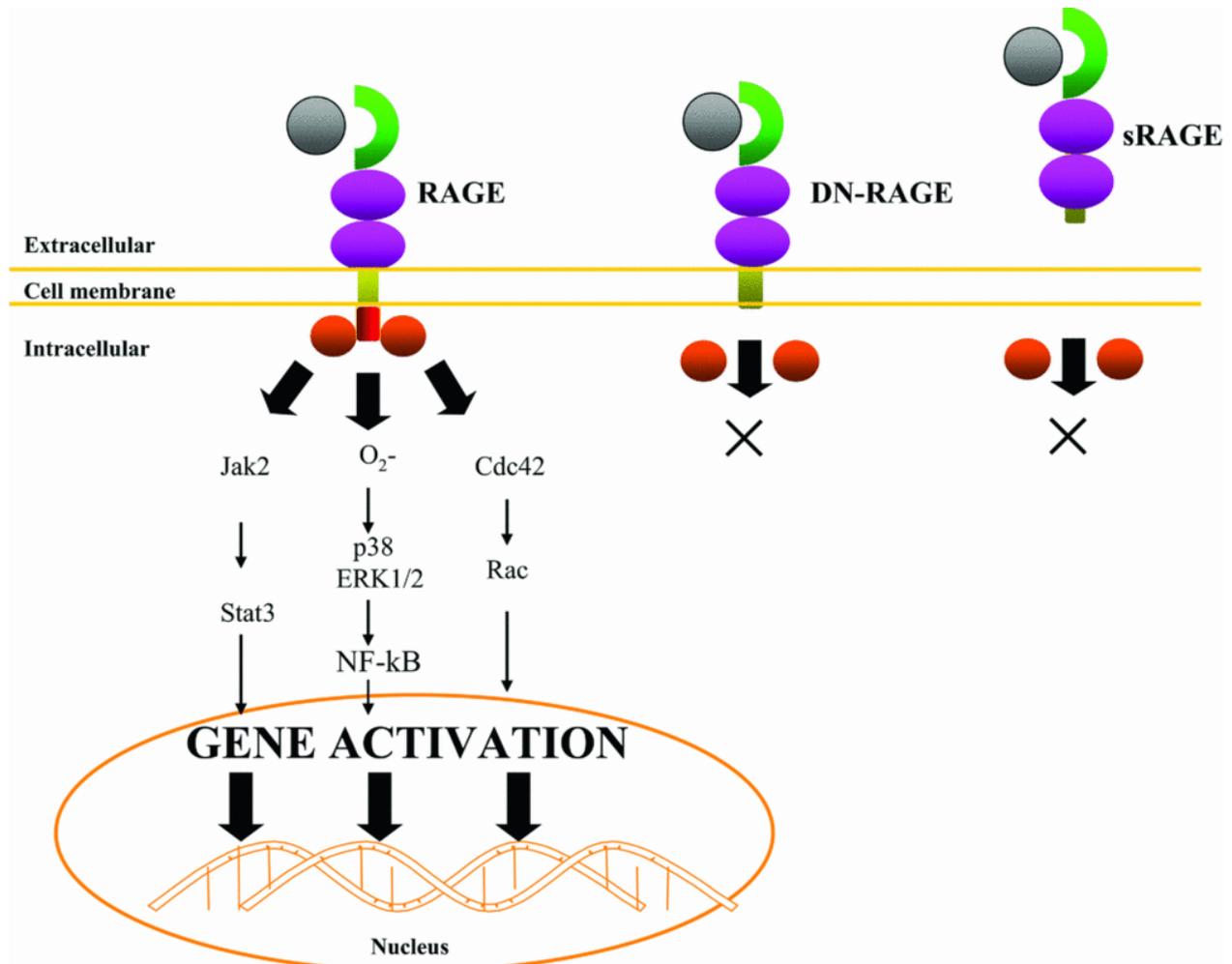


Figure n°15 : Récepteurs RAGE – Principales Isoformes⁸⁸

4.2.3.3. Les ligands de RAGE

Il existe cinq familles de ligands aux RAGE :

- Les AGEs ou produits terminaux de glycation.
- La famille des S100/calgranulines dont le polypeptide EN-RAGE. Ce sont des polypeptides capables de déclencher une réponse pro-inflammatoire et prooxydante⁹².

- Les AOPPs (produits d'oxydation protéiques avancés). Ils sont le résultat de l'action du stress oxydant sur les protéines. Par exemple, l'albumine glyquée interagit avec le RAGE et conduit à l'augmentation de la production d'IL-8 (interleukine-8) et de MCP-1 dans les cellules épithéliales rétinienne pigmentaires. En agissant en synergie avec une cytokine inflammatoire, le TNF- α , déclenche une voie de signalisation impliquant Raf et les MAP Kinases. L'albumine glyquée stimule la synthèse de la matrice extracellulaire en activant la production de facteurs de croissance comme le TGF- β 1 par l'intermédiaire de la voie de la PKC et des MAPK de type ERK. Dans les cellules musculaires lisses, elle induit l'augmentation de la sécrétion de NO via la NO synthase inducible⁹³.
- Le peptide β -amyloïde. Il est le produit de clivage de la protéine APP (amyloid protein precursor). Il est impliqué dans la maladie d'Alzheimer⁹⁴.
- L' HMGB1 (high mobility group box-1) ou amphotérine. Elle est décrite comme une protéine nucléaire de type non histone. Elle favorise la croissance des neurites au cours du développement. En situation de stress ou de stimulation, les cellules libèrent cette protéine. L'HMGB-1 est capable de modifier les propriétés des cellules qui expriment les RAGE tels que les cellules inflammatoires (lymphocytes, monocytes, macrophages, cellules dendritiques), les cardiomyocytes en inhibant les canaux potassiques ainsi que les canaux calciques de type L, les neurones et les cellules cancéreuses. L'inhibition de la signalisation induite par l'interaction RAGE-amphotérine inhibe la croissance et la capacité invasive des cellules tumorales gliales⁹⁵.

4.2.3.4 Transduction du signal des AGE par les RAGE

Les mécanismes de transduction du signal et d'activation du récepteur RAGE sont décrits sur la figure n°16⁹⁶.

Les récepteurs des AGE sont dépourvus de domaine tyrosine kinase. Une homodimérisation des RAGE est essentielle à la transduction du signal. Les sRAGE peuvent inhiber l'homodimérisation des RAGE et ainsi empêcher la transduction du signal^{68,89}. La fixation des AGE sur le RAGE déclenche une signalisation entraînant un stress oxydant intracellulaire. Le

stress oxydant est renforcé par l'activation de la NADPH oxydase. La NADPH oxydase catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$). De plus, cette fixation induit l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire entraînant le recrutement des MAP Kinases, et l'activation du facteur de transcription NFκB. Le facteur de transcription NFκB stimulé pénètre dans le noyau et se lie à son élément de réponse sur le promoteur des gènes cibles^{68,89}.

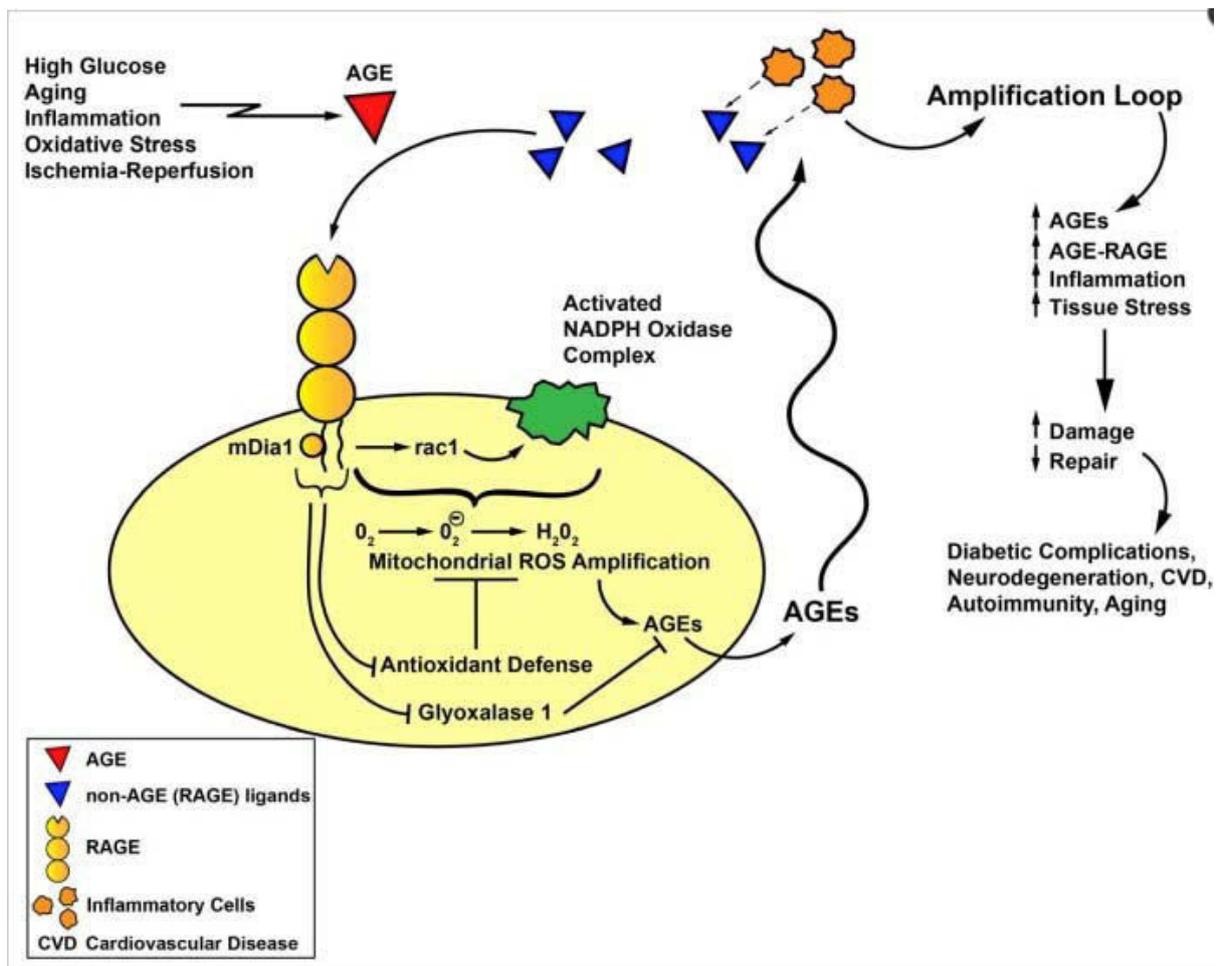


Figure n°16 : Effets cellulaires de l'activation du RAGE – Transduction du Signal⁹⁶

Le domaine intra-cytoplasmique du RAGE interagit avec la protéine mammalian diaphanous1 (mDia-1) appartenant à la famille des formines. La protéine mDia-1 est essentielle à la transduction du signal aboutissant à la migration cellulaire⁹⁶.

La stimulation des RAGE induit aussi une baisse d'activité des glyoxalases 1. Les glyoxalases sont des enzymes qui métabolisent les composés pré-AGE (MGO). Cette baisse d'activité a pour conséquence une amplification de la formation des AGE, des LDL oxydées et autres AOPPS⁹⁶.

Au niveau des reins, les RAGE sont fortement exprimés à la surface des podocytes. La stimulation des RAGE sur les podocytes conduit à leur apoptose et à la libération de facteurs inflammatoires comme NFκB et MCP1. La stimulation des RAGE des podocytes induit aussi une surexpression du VEGF (vascular endothelial growth factor). Ces facteurs libérés vont être en relation avec la sclérose du glomérule. Ceci a pour conséquence la perte d'intégrité de la membrane basale et ainsi favorise l'albuminurie^{68,96} retrouvées dans la néphropathie diabétique.

Au niveau endothélial, la fixation des AGE sur le RAGE entraîne l'activation de la production de cytokines telles que l'IL1-β, l'IL-6 ou le TNF-α et de chimiokines tels que le MCP-1. Ces molécules induisent en retour l'expression de molécules d'adhésion telles que ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) et VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) impliquées dans le recrutement des leucocytes. Les cellules ainsi recrutées libèrent des cytokines (S100/calgranulines, MAC-1 et HMGB-1) ligands des RAGE. De plus, NFκB induit une augmentation de l'expression des RAGE. La réponse inflammatoire est alors auto entretenue, elle devient chronique et prolongée contribuant à l'augmentation du stress cellulaire et aux lésions cellulaires que l'on peut observer dans les complications du diabète, le vieillissement, les tumeurs et autres maladies neurodégénératives. De plus, le facteur NFκB induit un état pro-coagulant par l'augmentation de la synthèse du facteur tissulaire FT et de la thrombomoduline⁹⁶.

A travers cette partie bibliographique, nous avons pu montrer qu'au cours du diabète de type 2, l'hyperglycémie chronique associée à un syndrome métabolique était à l'origine d'un stress oxydatif important lié à une forte production endogène de ROS. L'hyperglycémie associée à ce stress oxydatif est à l'origine de modifications post-translationnelles importantes des protéines circulantes par des mécanismes de glycation et d'oxydation combinés regroupés sous le terme de glycoxydation. Cette glycoxydation amène à la formation de peptides et de protéines modifiées appelés AGEs.

Les complications cardiovasculaires du diabète sont liées à un phénomène de dysfonction endothéliale. Ce dysfonctionnement endothélial initial aux atteintes vasculaires chroniques du diabète est dû à des mécanismes physiopathologiques mêlant à la fois réaction inflammatoire et stress oxydatif. Ces atteintes oxydatives de l'endothélium vasculaires sont dues aux effets directs des ROS, des radicaux libres et aussi des AGEs circulant sur ces cellules qui sont en contact direct avec l'environnement plasmatique. La capture du NO par l' $O_2^{\cdot-}$ semble être l'événement majeur de la dysfonction endothéliale. L'activation combinée par les AGEs du RAGE présent à la surface des cellules endothéliales induit des effets pro-oxydants et pro-inflammatoires. Le stress oxydant, la production associée de ROS et d'AGE au cours du diabète de type 2 et l'activation du RAGE constituent donc l'hypothèse physiopathologique dominante des complications cardiovasculaires du diabète.

Dans la partie expérimentale de ces travaux, nous avons donc cherché dans un premier temps à caractériser et à quantifier les modifications structurales et fonctionnelles des protéines au cours du diabète et plus particulièrement celles de l'albumine, protéine circulante la plus abondante et aux propriétés antioxydantes majeures. Nous avons ensuite étudié l'implication potentielle des formes modifiées d'albumine dans la physiopathologie des complications vasculaires du diabète à travers une étude cellulaire *in vitro*. Pour finir, nous avons évalué l'intérêt potentiel de ces formes modifiées comme biomarqueurs de ces complications dans une étude clinique pilote préambule à un projet de recherche clinique prospectif de plus grande ampleur.

OBJECTIF DU TRAVAIL

Au cours de ces travaux, notre objectif a été de caractériser les modifications structurales et fonctionnelles des protéines, et plus particulièrement l'albumine, au cours de la pathologie diabétique. En effet, l'hyperglycémie chronique et le stress oxydant, rencontrés au cours du diabète de type 2, sont à l'origine de modifications glycoxydatives des protéines circulantes. Si des modifications de l'albumine ont bien été caractérisées à partir de modèles de glycation *in vitro* en présence de glucose ou de méthylglyoxal (MGO), les modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine rencontrées *in vivo* ont nécessité des études spécifiques, objets de ce mémoire.

Le laboratoire GEICO a développé ces dernières années des compétences propres en matière d'extraction et de purification d'albumine à partir de plasma humain. Nous nous sommes donc appuyés sur cette expertise pour étudier de manière plus approfondie les modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine purifiée issue de plasmas de patients diabétiques de type 2 en comparaison avec différentes formes d'albumines, commerciales ou purifiées, glyquées *in vitro*. Ces travaux font l'objet de la première partie de l'étude expérimentale de ce rapport.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets de l'albumine de patients diabétiques sur des modèles cellulaires de macrophages et d'adipocytes. Ces cellules sont impliquées dans les mécanismes physiopathologiques du diabète et de ses complications cardiovasculaires. L'albumine, protéine la plus abondante du plasma joue un rôle essentiel de tampon du stress oxydant en raison de ses propriétés antioxydantes. L'albumine est profondément modifiée par l'hyperglycémie chronique et le stress oxydant au cours de la pathologie diabétique. Ces modifications peuvent amener l'albumine de patient diabétique à jouer un rôle de mémoire du stress oxydant en étant elle-même à l'origine de la production de ROS et par là-même jouer un rôle direct dans la physiopathologie des complications vasculaires du diabète de type 2.

Pour finir, au travers d'une étude clinique pilote descriptive ERM IES Alb-Ox, s'appuyant sur les données d'inclusion du projet de recherche clinique régional d'éducation thérapeutique ERM IES, nous avons évalué les niveaux de concentration plasmatique de plusieurs produits de glycation, de glycoxydation issus de l'albumine dans une population de patients diabétiques de type 2 anciens fortement déséquilibrés présentant à l'inclusion des typologies de complications vasculaires hétérogènes. L'objectif de ce projet pilote est de montrer si des différences significatives existent entre les concentrations plasmatiques des marqueurs de glycation et de glycoxydation à des niveaux différents d'atteintes vasculaires, et ainsi déterminer s'ils pourraient constituer des biomarqueurs d'intérêt dans le suivi ou le dépistage des complications vasculaires du diabète.

PARTIE EXPERIMENTALE

1. ETUDES DES MODIFICATIONS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DE L'ALBUMINE AU COURS DU DIABETE DE TYPE 2

1.1. Introduction

L'Albumine est la protéine la plus abondante du plasma ou du sérum humain. Cette protéine est en effet présente à des concentrations plasmatiques allant de 30 à 50 G/L. Elle représente à cet égard environ 60% des protéines plasmatiques. La sérum-albumine humaine (HSA) a un poids moléculaire de 66.7 kDa et est composée d'une chaîne polypeptidique de 585 acides aminés réarrangés par 17 ponts disulfure⁹⁷. La partie N-terminale de l'albumine ainsi que ses 59 lysines et 24 arginines sont autant de sites de glycation potentiels de cette protéine puisqu'ils présentent des résidus amines libres cibles de la réaction de Maillard. Il est à noter cependant que tous ces résidus amines libres présents sur cette protéine ne présentent pas tous la même capacité à être glyqués⁷⁹.

L'albumine présente 3 fonctions principales. Premièrement ses propriétés physico-chimiques et son importante concentration plasmatiques permettent de maintenir la pression osmotique et le pH plasmatique. L'albumine possède également 2 sites de liaison non spécifiques lui conférant une très importante capacité de transport pour des substances endogènes (hormones de bas poids moléculaire, acide gras) et de nombreux xénobiotiques (médicaments, métabolites,...)^{97,79}. Cette propriété influe sur les déterminants pharmacocinétiques et plus particulièrement le volume de distribution de nombreux médicaments qui sont fortement liés à l'albumine.

La troisième propriété de l'albumine, qui nous apparaît ici comme étant la plus importante, est son rôle de protection contre le stress oxydant⁶⁴. En effet, l'albumine, comme de nombreuses protéines présentant une fonction thiol libre, a la capacité de piéger et de neutraliser les ROS. Ce thiol libre est représenté par une cystéine présente en position 34 de la protéine. L'albumine agit donc comme un tampon contre le stress oxydant au niveau

plasmatique et permet de limiter les réactions en chaîne de production de ROS dans la circulation sanguine.

Cette fonction antioxydante de l'albumine est donc mise à rude épreuve au cours du diabète, maladie chronique au cours de laquelle nous retrouvons au niveau plasmatique à la fois une hyperglycémie chronique et un stress oxydant profond marqué par une production accrue de radicaux libres oxygénés. L'albumine au cours du diabète peut donc être sujette à plusieurs modifications post-traductionnelles liée d'une part à des mécanismes de glycation sur ces résidus amines libres et d'autre part à des mécanismes oxydatifs.

Si des modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine ont pu être mises en évidence à partir de sérum albumine humaine (SAH) au moyen de modèles de glycation *in vitro* comme une exposition prolongée à un excès de glucose ou à du méthylglyoxal (MGO), ces modèles restent aujourd'hui largement discutés puisque les états hyperglycémiques utilisés (glucose 100mM) sont largement supérieurs à ceux retrouvés au niveau physiologique (5mM) ou même au cours d'un diabète déséquilibré (25 mM)⁶³. Egalement, les phénomènes de glycation et de stress oxydant rencontrés *in vivo* sont à priori largement plus complexes et pourraient limiter sinon accentuer les phénomènes rencontrés *in vivo*.

Cette étude s'est donc portée premièrement sur la caractérisation des modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine au cours de la pathologie diabétique. Nous avons pour cela comparé les propriétés structurales et fonctionnelles d'albumines extraites et purifiées de patients diabétiques à celles extraites de patients non diabétiques ainsi qu'à de la sérum albumine humaine commerciale modifiées ou non par glycation *in vitro* (glucose ou MGO). Ces travaux ont fait l'objet de deux articles publiés présentés ci-dessous en résultats^{98,99}.

1.2. Résultats

Article 1 : Structural modifications of human albumin in Diabetes. Diabetes and Metabolism. 2011; 38 :171-178. **A. Guerin-Dubourg, A. Catan, E. Bourdon ; P. Rondeau.**

Original article

Structural modifications of human albumin in diabetes

A. Guerin-Dubourg^{a,b}, A. Catan^a, E. Bourdon^a, P. Rondeau^{a,*}

^a Laboratoire de biochimie et génétique moléculaire (LBGM), groupe d'étude sur l'inflammation chronique et l'obésité (GEICO), université de La Réunion, 15, avenue René-Cassin, BP 7151, 97715 Saint-Denis Messag cedex 09, Réunion

^b Unité fonctionnelle de recherche biochimie, centre hospitalier Félix-Guyon, 97405 Saint-Denis, Réunion

Received 7 July 2011; accepted 9 November 2011

Abstract

Aim. – Albumin, a major protein in the blood circulation, can undergo increased glycation in diabetes. From recent studies, it has become evident that glycation has important implications for albumin actions and impact on cell functioning. This study compares the structural and functional properties of albumin glycosylated by glucose and methylglyoxal (MGO) with those of albumin purified from diabetic patients.

Methods. – Human serum albumin (HSA) was purified from diabetic patients and control subjects using affinity chromatography, and oxidation parameters in various albumin preparations were determined. Tryptophan and 1-anilino-8-naphthalene sulphonic acid (ANSA) probe fluorescence, redox state, antioxidant and copper-binding capacities of the different preparations of albumin were also determined and compared.

Results. – Occurrence of oxidative modifications was enhanced in albumin whether purified from diabetic patients, or glycosylated by glucose or MGO, after determination of their fructosamine and free thiol and amino group contents, carbonyl content and antioxidant activities. Whereas more quantitative changes in oxidative and structural parameters were observed in the glucose- and MGO-modified albumins, significant impairment of albumin function (free-radical-scavenging and copper-binding capacities) were demonstrated in the HSA purified from diabetics. These findings reveal different structural and functional features of diabetic HSA compared with *in vitro* models.

Conclusion. – This study provides new information supporting albumin as an important biomarker for monitoring diabetic pathophysiology. In addition, it reconfirms the influence of experimental conditions in which advanced glycation end-products (AGEs) are generated in tests designed to mimic the pathological conditions of diabetes.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Albumin; AGEs; Oxidative stress; Diabetes

Résumé

Modifications structurales de l'albumine au cours du diabète.

But. – Le stress oxydant et les modifications oxydatives des protéines sont directement impliqués dans les complications du diabète. Un facteur puissamment protecteur contre le stress oxydant, produit par notre organisme, n'est autre que l'albumine, protéine la plus abondante du plasma. Mais, en particulier chez les diabétiques, la structure de l'albumine se trouve modifiée par des phénomènes de glycation qui confèrent à la protéine des propriétés biologiques néfastes. Dans cette étude, nous avons cherché à comparer les modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine glycosylée *in vitro* avec celles de l'albumine purifiée à partir de patients diabétiques.

Méthodes. – L'albumine humaine a été purifiée à partir de patients diabétiques ou de témoins en utilisant la chromatographie d'affinité. La glycation *in vitro* d'albumine humaine a été effectuée par des incubations en présence de méthylglyoxal (MGO) ou de glucose. Les statuts structuraux et fonctionnels (pouvoir antioxydant) des différentes préparations d'albumine ont été déterminés et comparés au moyen notamment de mesures de propriétés électrophorétiques, de fluorescence, de capacités de liaison de métaux ou de neutralisation de radicaux libres.

Abbreviations: AAPH, 2,2'-azobis 2-amidinopropane; AGEs, Advanced glycation end-products; HRP, Horseradish peroxidase; HSA, Human serum albumin; HSA-C, Commercial human serum albumin; HSA-ND, Human serum albumin from non-diabetic patients; HSA-D, Human serum albumin from diabetic patients; mPAGE, Phenylboronate polyacrylamide electrophoresis; PBS, Phosphate-buffered saline; -SH, Sulfhydryl group; SMBG, Self-monitoring of blood glucose; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid.

* Corresponding author.

E-mail address: rophil@univ-reunion.fr (P. Rondeau).

Résultats. – Une augmentation importante et significative des modifications de type oxydatif a été observée à la fois au niveau des préparations d'albumine glyquée *in vitro* par le glucose ou le MGO, mais également dans la protéine lorsqu'elle purifiée à partir de patients diabétiques. En particulier, une altération des propriétés antioxydantes de piégeage des radicaux libres et de fixation des métaux a été mise en évidence pour l'albumine provenant de diabétiques.

Conclusion. – Ce travail contribue à montrer l'importance de l'albumine comme un biomarqueur majeur à privilégier pour le développement de stratégies nutritionnelles ou pharmaceutiques afin de limiter les désordres inhérents à la pathologie diabétique.

© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Albumine ; Produits de glycation avancée ; Stress oxydant ; Diabète

1. Introduction

Non-enzymatic glycation is one of the underlying modification factors that contribute to various alterations of intrinsic protein functions. It is the result of covalent binding of glucose to amino groups of circulating proteins, such as haemoglobin (HbA_{1c}) and albumin, or proteins present in the extracellular matrix (such as collagen and laminin) [1]. Because of its long half-life (about 21 days) compared with other proteins and its high concentrations in the circulatory system, serum albumin is a plasmatic protein that is highly sensitive to glycation. Elevated levels of glycated albumin (two- to threefold increases) in cases of diabetes mellitus can lead to irreversible damage associated with metabolic disorders such as retinopathy, nephropathy, neuropathy and coronary artery disease [2,3]. The development of these diabetic complications is attributed to the formation of deleterious and irreversible conjugates called “advanced glycation end-products” (AGEs) during the glycation process [3].

The two main clinical parameters used for chronic glycaemic control are glycated HbA_{1c} levels and SMBG [4]. Measurement of glucose in blood, a short-term indicator, reflects the diabetic status over a 24-hour period, while the HbA_{1c} value represents a long-term glycaemic indicator. However, the HbA_{1c} is not always a relevant indicator of glycaemic control in patients with diabetes-associated pathologies that affect erythrocyte lifespan, such as haemolytic or renal anaemia and liver cirrhosis [5,6]. In such cases, glycated albumin appears to be an alternative marker for glycaemic control: the glycated albumin level is thought to indicate blood glucose status over a short period (2 to 4 weeks), while HbA_{1c} reflects the glycaemic state over a longer period (2 months). Indeed, numerous studies support the use of glycated albumin levels in the detection of short-term changes in glycaemic control [7–9].

Albumin is known to have a set of diverse beneficial functions, including oncotic pressure regulation, and binding and transport capacities for a wide variety of metabolites, including those of therapeutic drugs [10,11]. For this reason, albumin can play an important role in drug disposition and efficacy [12]. However, the most prominent property of albumin is its major antioxidant activity in a circulatory system that is constantly subjected to powerful oxidative stress [13]. Previous reports from our group have demonstrated impairment of these properties with the glycation process [14,15]. In these studies, modified albumin *in vitro* exhibited different structural and functional properties attributed to the heterogeneous products formed by glycation, depending on the nature of albumin used (bovine or

human), the nature and concentration of carbohydrates (glucose, methylglyoxal [MGO]) and the duration of incubation (3 weeks or more) [16]. These heterogeneous glycation products derived from albumin are often used as glycation models in studies dealing with the involvement of AGEs in cellular pathophysiology in the context of diabetes. However, the question remains as to whether these glycated albumins *in vitro* constitute relevant models in diabetes-associated cellular disorders. For this reason, it was important to compare the structural and functional differences between *in vitro* glycated albumins and albumin purified from diabetic patients.

The present study examined the differential structural and functional aspects of albumin purified from diabetic and non-diabetic subjects. The study was also extended to compare commercial albumin glycated by glucose and MGO incubation.

2. Methods

2.1. Materials

The biconchonic acid, albumin from human serum (96 to 99%), MGO solutions (40% aqueous), anti-DNPH (dinitrophenyl hydrazine) antibody, 2,2'-azobis-(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine liquid substrate system for the enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) tests were all obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). ECLTM anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) and HRP-linked whole antibody (from donkey) were purchased from GE Healthcare Ltd (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), and the monoclonal anti-AGE antibody was from Cosmo Bio Co., Ltd (Tokyo, Japan).

2.2. Purification of albumin

Blood was obtained from a pool of diabetic patients and non-diabetic subjects, and anticoagulated in EDTA tubes (BD Vacutainer[®]) in the biochemistry laboratory of our institution in Saint-Denis, Réunion. Albumin purification was conducted using pooled serum from 15 diabetic patients (HbA_{1c}: 12.0 ± 1.8%) and 38 non-diabetic subjects (HbA_{1c}: 5.3 ± 0.3%). Included in the diabetic pool were only those patients with high albuminaemia levels (>40 g/L) but no acute inflammatory syndrome (C-reactive protein [CRP] levels <2 mg/L), acute coronary syndrome (troponin I <0.03 µg/L) and high hypertriglyceridaemia (>3.5 g/L) in the 2 months prior to the analysis (Table S1, Supplementary data). Patients with HbA_{1c}

abnormalities and/or hyperleukocytosis were excluded from the plasma pool.

Purification of serum albumin from fresh human plasma was based on extensive dialysis against 50 mM Tris/HCl (pH 7.4) followed by affinity chromatography using Cibacron Blue 3G linked to agarose (Amersham catalogue number 17-0948-01) as a ligand for albumin. A 1.5-M NaCl (pH 7.4) buffer was used for the desorption of bound albumin from Cibacron Blue–agarose, following the elution of other plasma proteins using a 50-mM Tris/HCl (pH 7.4) buffer. Each fraction of eluate was examined by gel electrophoresis, and the most purified and concentrated extracts were pooled before extensive dialysis against phosphate buffered saline (PBS), then stored at -80°C .

2.3. Preparation of advanced glycation end-products (AGEs)

AGEs were prepared, as described elsewhere [15], by incubating 0.37 mM of HSA-C and purified HSA from a HSA-ND pool without and with glucose (100 mM) in PBS (pH 7.4) under sterile conditions at 37°C for 3 weeks or with MGO (10 mM) for 2 days. The proteins were dialysed against PBS, sterile-filtered with a 0.2- μm Millipore filter and stored at -80°C .

2.4. Fructosamine assay and albuminaemia

Albumin concentrations were determined using an albumin reagent kit (ALB2, COBAS[®]) based on a colorimetric assay at 570 nm of albumin mixed with bromocresol green (BCG, 3',3'',5',5''-tetrabromo-m-cresolsulphonephthalein) [17]. Fructosamine was determined by the method developed by Johnson et al. [18] using a commercial reagent kit (FRA, COBAS[®]). The results were expressed as mmol/L of 1-deoxy-1-morpholino-d-fructose (DMF), a synthetic ketoamine used as a primary standard.

2.5. Quenching of tryptophan and 1-anilino-8-naphthalene sulphonic acid (ANSA) fluorescences

Fluorescence spectra were carried out on a Perkin-Elmer LS55 spectrometer with protein samples at a concentration of 10 μM in PBS. Tryptophan emission spectra were obtained in the range of 250 to 600 nm under excitation at 270 nm. All fluorescence spectra were corrected for their different respective absorptions.

1-anilino-8-naphthalene sulphonic acid (ANSA) was dissolved in 5- μM albumin samples at an ANSA/albumin ratio of approximately 0.4 (mol/mol) to ensure that the dye was linked to the hydrophobic sites of albumin. ANSA–protein complex emission fluorescence spectra were performed in the range of 350 to 700 nm under an excitation wavelength of 470 nm.

2.6. Oxidative modification of –SH

Thiol groups in native and modified albumin were measured by Ellman's assay using 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) [19], as has been well described elsewhere [14].

Various concentrations of L-cysteine (10 to 100 nmol) were used to perform the standard curve. Thiol group content was measured by reading the absorbance at 412 nm. Results were expressed as the number of free–SH groups per mol of bovine serum albumin (BSA).

2.7. 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) assay

The TNBS assay is a sensitive method for determining the primary free amino groups in proteins [20]. Again, this method has been described in detail elsewhere [16].

2.8. Methacrylamido phenylboronic acid (MPBA) polyacrylamide gel

Discriminating analysis between glycosylated and non-glycosylated albumin has previously been performed using MPBA polyacrylamide electrophoresis [21]. MPBA-resolving acrylamide gels were prepared by adding 1% (w/v) of MPBA (provided by J. van den Elsen, Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, UK) to 8% acrylamide solution. The 4% stacking acrylamide gel was prepared without boronic acid. Albumin samples (20 μg) were applied to the gel in denaturing sodium dodecyl sulphate (SDS) and reductive dithiothreitol (DTT) buffers.

2.9. Copper-binding affinity

The capacity of albumin to bind copper ions can be measured spectrophotometrically using bathocuproinedisulphonic acid (BCS, Fluka #11870) [22,23]. AGE preparations (40 nmol in 0.15 M of NaCl) were incubated in triplicate for 2 h with 50 nmol CuSO_4 in a final volume of 500 μL . The unbound ligand fractions were separated from the albumin-linked ligand fractions by ultrafiltration, using the Amicon[®] Ultra system (Millipore, Billerica, MA, USA), with centrifugation at 3000 g for 20 min. The concentration of copper bound to albumin was determined by adding BCS (1.2 mM) diluted in 1 mM of sodium ascorbate solution, followed by an absorbance reading at 480 nm after 5 min of incubation at room temperature. The concentrations of copper bound to modified albumins were calculated using a calibration standard curve by increasing the amount of CuSO_4 up to 100 nmol.

2.10. Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) quantification of carbonylated proteins

The degree of carbonylation of glycosylated albumin was determined by carbonyl Elisa assay based on recognition of protein-bound DNPH in carbonylated proteins with an anti-DNP antibody. This method has been described in detail in previous published studies from our group [16,24].

2.11. Haemolysis test

Each well of a 96-well plate was filled with 100 μL (about 1.10^8 erythrocytes; final concentration: 400,000 cells/ μL) of a

diluted solution of red blood (1/10 in 0.15 M of NaCl). Different albumin samples (final concentration: 10 μ M) were added in triplicate. Haemolysis was initiated by adding 100 μ L of 0.45 M of AAPH solution to each well. Turbidimetry at 450 nm was recorded at 10-min intervals using a 37 °C thermostated microplate reader. Results were expressed as 50% of maximum haemolysis time (HT₅₀) in min.

2.12. Statistical analysis

Data were expressed as the means \pm standard deviation (SD) of a minimum of three experiments. Statistical significances

were determined using one-way analysis of variance (Anova) followed by Tukey's test for multiple comparisons, with a *P* value < 0.05 required for significance.

3. Results

3.1. Biochemical characterizations of human serum albumin (HSA) samples

Clinical and biochemical characteristics of the diabetic plasma samples are presented in [Table S1, Supplementary data](#). All purified albumin samples exhibited approximately

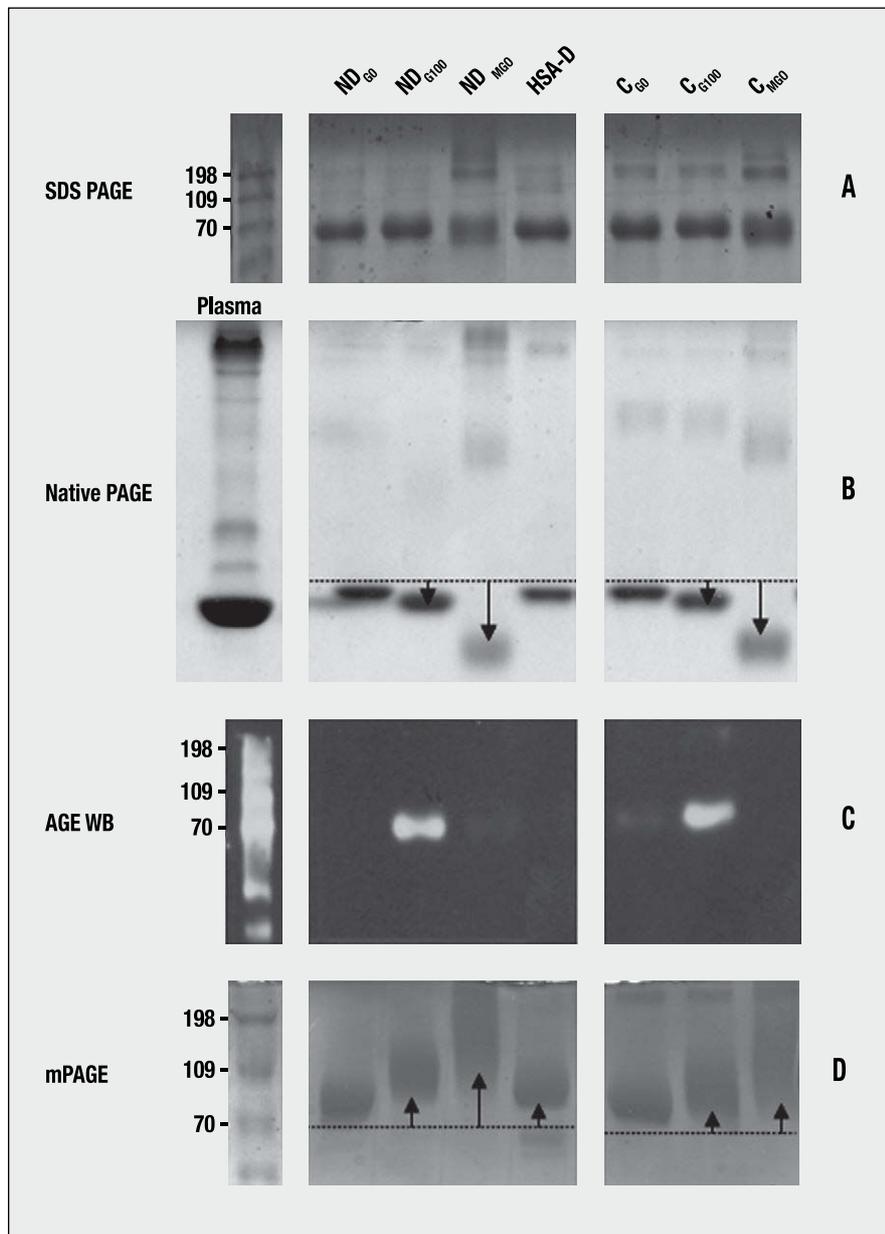


Fig. 1. Characterization of purified human serum albumin from non-diabetic patients (HSA-ND) and human serum albumin from diabetic patients (HSA-D) and commercial human serum albumins (HSA-C) modified by glycation; a: coomassie staining of human serum albumin (HSA) samples separated by sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (12%); b: electrophoretic migration profile of native polyacrylamide gel electrophoresis (12%); c: advanced glycation end-product (AGE) content of human serum albumin samples as assessed by Western blotting (WB); d: separation of human serum albumin samples using phenylboronate acrylamide gel electrophoresis (mPAGE).

identical molecular weights (about 66 kDa), with a slight variation of a few Daltons for modified HSA corresponding to attachment to the protein of one or several glucose (162 Da) or MGO (54 Da) units (Fig. 1a). In contrast, these albumins differed in their net charge, as confirmed by native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE, Fig. 1b). In this situation, the protein charge constituted the main factor affecting its migration. A higher migration was observed for albumins (HSA-ND and HSA-C) modified by glucose and MGO compared with native HSA. Indeed, electrophoretic migration was dramatically enhanced for albumin modified by MGO. Such enhanced migrations for HSA-ND and HSA-C modified by glucose and MGO vs native HSA indicate impairment of the isoelectric point of albumin following glycation. Also, there was a decrease in cationic charges in albumin after glycation that could be attributed to the involvement of positively charged residues (arginine and lysine) in condensation with carbohydrate [14].

The end stage of the glycation process gives rise to irreversible conjugates known as AGEs [3]. Of these AGEs, N^ε-carboxymethyl-lysine (CML) and N^ε-carboxyethyl-lysine (CEL) were formed during the incubation of albumin with glucose and MGO, respectively. Western blotting (Fig. 1c) revealed that using antibodies directed against AGEs showed enhanced signals only for HSA modified by 100 mM of glucose, whereas no signal was observed for HSA purified from the plasma of diabetic patients. The lack of signal for MGO-modified albumin suggests that our AGE antibody was directed against CML rather than CEL.

Several oxidative parameters in our albumin preparations are shown in Table 1. As expected, levels of free thiol and amino groups decreased significantly in albumin after glycation by glucose and MGO. For both parameters, the decrease was more evident with MGO HSA-ND (HSA-C) modification than with glucose, although such severe decreases with MGO have been previously reported [25]. Similarly, the increase in carbonyl rate, attributed to enhanced oxidation of albumin HSA-ND (HSA-C) with *in vitro* modification, was more marked with MGO than

with glucose. Significant differences in the levels of free thiol and amino groups and carbonyl rate were also found between albumin from non-diabetic subjects (HSA-ND_{G0}) and diabetic patients (HSA-D). Their free amino group modification level and carbonyl rate values were similar to the values obtained for HSA-ND_{G100}. In contrast, free thiol content was more affected in diabetic albumin than in MGO-modified albumin *in vitro* compared with non-modified and non-diabetic albumins.

Fructosamine levels (μg/g of HSA) were significantly enhanced in albumin from diabetic patients compared with the controls. In comparison to diabetic albumin, fructosamine levels increased markedly with modification by glucose *in vitro* and, to a lesser extent, by MGO of both albumins (HSA-ND and HSA-C). The lower fructosamine level for HSA_{MGO} can be explained by the higher reactivity of MGO compared with glucose, thereby giving rise more quickly to AGE formation.

In numerous studies, boronate affinity chromatography has proved its efficacy in separating Amadori products (ketoamine) from non-modified albumin [14,27]. According to Morais et al. [21], Amadori products such as fructosamine can also be directly characterized by using phenylboronate incorporated into acrylamide gel electrophoresis. Phenylboronic acid has also shown its capacity to function as a saccharide receptor in the aqueous solution of many sensory systems [26,27].

In mPAGE gel profiles (Fig. 1d), a shift in the main protein band to a higher molecular weight (> 90 kDa) was observed for modified commercial and purified HSA, and accompanied by broadening for MGO-modified HSA. A slight shift in the protein band (≈ 80 kDa) was observed for diabetic HSA.

3.2. Fluorescence studies

Tryptophan fluorescence emission (at 350 nm) decreased in both modified HSA (HSA-ND_{G100} and HSA-ND_{MGO}) and diabetic HSA (HSA-D). The quenching of fluorescence was stronger for HSA-ND_{MGO} than for HSA-ND_{G100} in comparison

Table 1
Oxidation parameters for various albumin preparations from three independent experiments.

| Methods | Fructosamine/human serum albumin (HSA) (μg/g) | Thiols/human serum albumin (HSA) (mol/mol) | Free amino groups (% /control) | Carbonyl rate increase (% /control) |
|------------------------------------|---|--|--------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Purified HSA-ND^a</i> | | | | |
| HSA-ND _{G0} | 1.96 ± 0.08 | 0.483 ± 0.023 | 100.00 ± 4.70 | 100.00 ± 5.72 |
| HSA-ND _{G100} | 45.77 ± 1.83*** | 0.371 ± 0.019* | 60.39 ± 6.72*** | 87.12 ± 11.25 |
| HSA-ND _{MGO} | 31.02 ± 1.24*** | 0.307 ± 0.016** | 29.43 ± 1.39*** | 593.76 ± 16.39*** |
| <i>Purified HSA-D^a</i> | | | | |
| HSA-D _{G0} | 5.65 ± 0.10*** | 0.263 ± 0.003*** | 79.07 ± 3.20** | 195.66 ± 19.39*** |
| <i>Commercial HSA^b</i> | | | | |
| HSA-C _{G0} | 2.62 ± 0.23 | 0.372 ± 0.004 | 100.00 ± 5.05 | 100.00 ± 7.96 |
| HSA-C _{G100} | 47.54 ± 1.90*** | 0.325 ± 0.006** | 61.45 ± 2.35*** | 86.55 ± 8.13 |
| HSA-C _{MGO} | 29.76 ± 1.19*** | 0.329 ± 0.008* | 21.99 ± 3.39*** | 348.13 ± 22.33*** |

Fructosamine levels were obtained by nitroblue tetrazolium (NBT assay); free thiol group content was assessed by Ellman's method; unmodified primary amino group content in proteins was by trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) assay; carbonyl rate (%) was assessed by Elisa carbonyl assay; all data are expressed as means ± SD; *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

^a Effect of glycation or diabetes in purified human serum albumin (HSA) (vs HSA-ND_{G0}).

^b Effect of glycation in commercial human serum albumin (vs HSA-C_{G0}).

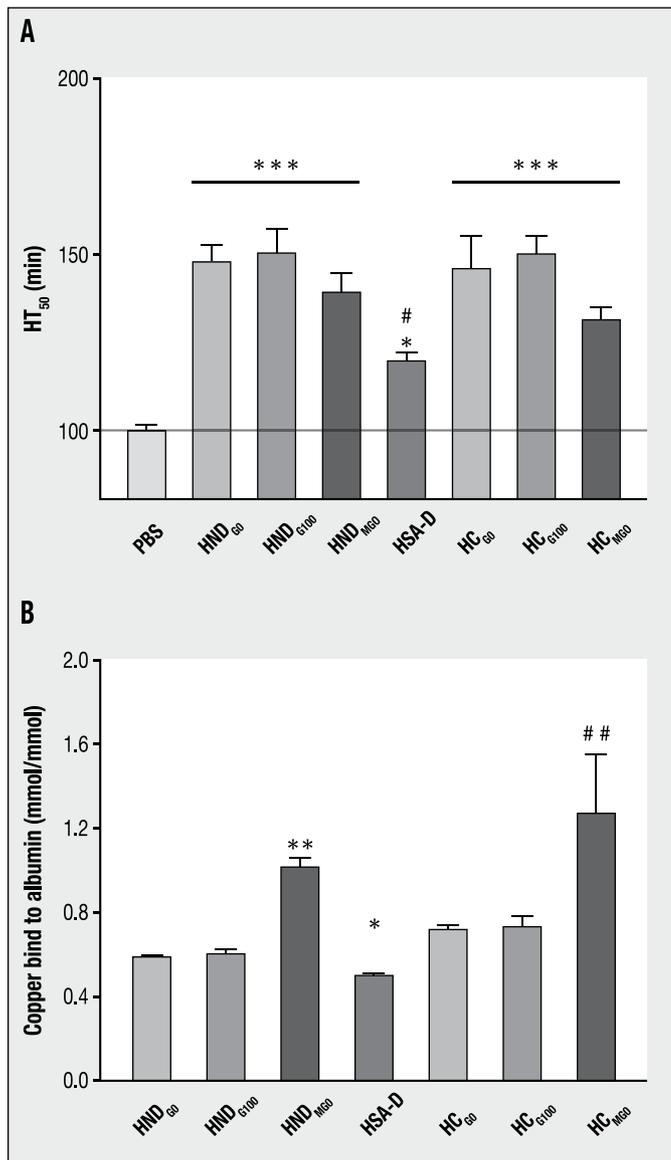


Fig. 2. Impairment of functional albumin properties in diabetes; a: antioxidant activities as assessed by free-radical-mediated blood haemolysis test (HT): histograms represent haemolysis test half-time (HT₅₀ in min) expressed as the means \pm SD of three separate experiments. The thin line allows comparison with controls (no albumin). Statistical analyses were performed using one-way Anova for multiple comparisons. * Effect of HSA-ND or HSA-C (vs. control): *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; effect of glycation in commercial human serum albumin (vs HSA-CG0); b: copper-binding capacity of human serum albumin (HSA) samples as assessed by the bathocuproinedisulphonic (BCS) method: histograms represent copper-binding capacity of modified albumin (nmol/ μ mol albumin). Data are expressed as means \pm SD ($n = 3$); statistical analyses were performed using one-way Anova for multiple comparisons. Effect of glycation or diabetes in purified human serum albumin (vs HSA-ND_{G0}): ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. Effect of glycation in commercial human serum albumin (vs HSA-C_{G0}): ### $P < 0.01$.

to native HSA-ND, while HSA-D samples had an intermediate fluorescence emission that was in between those of both glycosylated HSA-ND samples (Supplementary data, Fig. S1a). While the emission fluorescence spectra (Supplementary data, Fig. S1b) showed extrinsic fluorescence quenching at 300 nm for MGO-modified HSA and diabetic HSA, glycation by glucose

enhanced ANSA fluorescence in comparison to non-modified albumin. These data show the differential conformational changes induced by glucose- and MGO-induced glycation.

3.3. Functional properties

To assess the effect of glycation on the antioxidant properties of albumin, their free-radical-scavenging properties were investigated in a free-radical-induced haemolysis test. In the test, the intrinsic capacity of albumin to protect erythrocytes from haemolysis induced by free radicals was evidenced by a higher haemolysis half-time (HT₅₀) vs a PBS control (Fig. 2a). While *in vitro* glycoxidation of both albumins by glucose and MGO did not significantly affect their anti-radical activity, this protective effect was partially lost in the case of diabetic HSA. Compared with HSA-ND_{G0}, a reduction of about 20% ($P < 0.05$) in HT₅₀ for HSA-D was observed.

The antioxidant capacity of albumin is also related to its affinity to several metals. Copper deserves special consideration as most mammalian albumins bind to this cation more tightly and more specifically than in other animals [28]. Copper absorbed through the intestines is transported by albumin in the portal circulation before being incorporated in ceruloplasmin in the liver [29]. While glucose-mediated glycation did not affect albumin affinity for copper (0.5 mol of copper per mol of albumin), modification by MGO drastically increased albumin capacity to bind to the metal (1.1 mol of copper per mol of albumin; Fig. 2b). Albumin affinity for copper was also significantly affected in cases of diabetes. HSA-D showed a significant decrease (–16%, $P < 0.05$) in its copper affinity compared with non-diabetic HSA.

4. Conclusion

Glycation-induced albumin structural and functional changes are of particular interest as numerous studies *in vivo* have reported the strong involvement of glycosylated albumin in the development and progression of chronic diabetes complications. Most of these studies were focused on the structural and functional changes of commercial BSA-induced glycoxidation *in vitro*. However, only a few studies compared the structural and functional changes between models of glycoxidation of human albumin *in vitro* with albumin in hyperglycaemia *in vivo*. For this reason, the present study was undertaken to evaluate the suitability of *in vitro* models of glycation mimicking diabetic pathology.

Using different techniques, modifications in intrinsic properties were studied in HSA induced by glycation *in vitro* with glucose (100 mM) and with MGO (10 mM). Comparison of these modifications with those observed in diabetic albumin could constitute a key factor in helping investigators to choose the most suitable glycation model for cellular physiology studies. Of albumin properties, the redox state, scavenging capacity and binding affinity of the protein were also investigated. As expected and consistent with previous studies, the incubation of human albumin with glucose and MGO *in vitro* contributed

to the increase in fructosamine and carbonyl rates, indicating the formation of Amadori products accompanied by an oxidation process. This increase in oxidative state was confirmed by the impaired redox states of the single thiol group in albumin (Cys 34). The glycation of albumin also induced a decrease in free amino group levels, indicating the involvement of several exposed negatively charged lysine and arginine residues that were neutralized by glucose and MGO during glycation. The increase in the net negative electrical charge has already been described for oxidized lipoproteins increasingly involved in atherosclerosis [30]. The tertiary structure is also partially affected by *in vitro* glycation by glucose or a derivative, as confirmed by tryptophan and ANSA fluorescence results. Overall modification of the three-dimensional structure was also induced by glycation with, in particular, a conformation change in hydrophobic pockets. Consequently, these structural changes associated with modification of the redox state have a direct bearing on the intrinsic biological functionality of albumin, including its free-radical-scavenging properties and copper-binding affinity. In albumin, the single reduced cysteine unit constitutes an important redox regulator in extracellular compartments [31,32]. Under our experimental conditions, glucose-mediated glycation did not affect albumin antioxidant activity, as assessed by the haemolysis test, as also observed elsewhere [16]. On the other hand, in MGO-modified albumins, alteration of the protective effect of albumin was consistent with the redox state of cysteine. These results could be attributed to the different tertiary structures of HSA_{G100} and HSA_{MGO}, as revealed by the fluorescence results of the ANSA probe. The partial unfolding of hydrophobic pockets of albumin induced by incubation with glucose revealed specific amino acids, previously buried in the native conformation of HSA, to be potential free-radical scavengers.

The antioxidant capacity of albumin also depends on the protein's capacity to bind copper ions. HSA contains one high-affinity site for copper, the N-terminal tripeptide Asp-Ala-His [33]. Protein sequestration of copper ions has been shown to prevent reactive oxygen species (ROS)-generating reactions [34]. Given that albumin conformation plays a key role in its transport capacity, the significant increase in affinity for copper observed in MGO-modified albumin can be attributed to the specific tertiary structure induced by glycation.

Regarding the data for diabetic HSA, the fundamental question to emerge was: are the structural and functional properties of models *in vitro* relevant to diabetic HSA characteristics? While most quantitative changes in oxidative and structural parameters were observed in glucose- or MGO-modified albumins, significant impairment of albumin function (free-radical-scavenging and copper-binding capacities) was demonstrated in HSA purified from diabetics. However, these findings showed different structural and functional features in diabetic HSA compared with *in vitro* models.

As for structural and biological results, glycated albumin *in vivo* appears to be the most relevant model for mimicking hyperglycaemia or diabetes. The diabetic model of HSA *in vivo* may be more suitable than *in vitro* cellular physiology studies examining the relationship between albumin status and diabetes-associated

cardiovascular complications. Also, activated macrophage cells lines, key elements of atherosclerosis development, may be the most suitable cell model for evaluating the physiological impact of the *in vivo* diabetic albumin model. While considering glycated HbA_{1c} levels from SMBG as the best indicator of diabetic status, glycated albumin would appear to be a suitable marker for the monitoring of diabetes-associated complications.

Albumin plays an important role in the systemic distribution of many therapeutic drugs [35,36]. A reduced affinity of albumin for drugs with a narrow therapeutic index can result in their toxic effect because of an increase in concentrations in their free forms and the impact of their pharmacological properties. It would be of great interest to extend the present study to an analysis of albumin affinity for specific therapeutic drugs relevant to diabetes to obtain a better understanding of the impact of diabetes on the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of these drugs.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgements

This work was supported by the *Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche* (Department for Higher Education and Research), the *Ministère de l'Outre-Mer* (Department of Overseas Territories), the Regional Council of Réunion and the University of Réunion.

Author contributions: A. Guerin-Dubourg researched data, contributed discussion, reviewed the manuscript. A. Catan researched data. E. Bourdon contributed discussion, reviewed the manuscript. P. Rondeau researched data, wrote, reviewed and edited the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material (Table S1 and Fig. S1) associated with this article can be found at <http://www.sciencedirect.com>, at doi:10.1016/j.diabet.2011.11.002.

References

- [1] Charonis AS, Reger LA, Dege JE, Kouzi-Koliakos K, Furcht LT, Wohlhueter RM, et al. Laminin alterations after *in vitro* nonenzymatic glycosylation. *Diabetes* 1990;39:807–14.
- [2] Brownlee M. The pathological implications of protein glycation. *Clin Invest Med* 1995;18:275–81.
- [3] Cohen MP. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. *Arch Biochem Biophys* 2003;419:25–30.
- [4] Roohk HV, Zaidi AR. A review of glycated albumin as an intermediate glycation index for controlling diabetes. *J Diabetes Sci Technol* 2008;2:1114–21.
- [5] Ichikawa H, Nagake Y, Takahashi M, Nakazono H, Kawabata K, Shikata K, et al. What is the best index of glycemic control in patients with diabetes mellitus on hemodialysis? *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 1996;38:305–8.

- [6] Panzer S, Kronik G, Lechner K, Bettelheim P, Neumann E, Dudczak R. Glycosylated hemoglobins (GHb): an index of red cell survival. *Blood* 1982;59:1348–50.
- [7] Yoshiuchi K, Matsuhisa M, Katakami N, Nakatani Y, Sakamoto K, Matsuoka T, et al. Glycated albumin is a better indicator for glucose excursion than glycated hemoglobin in type 1 and type 2 diabetes. *Endocr J* 2008;55:503–7.
- [8] Okumura A, Mitamura Y, Namekata K, Nakamura K, Harada C, Harada T. Glycated albumin induces activation of activator protein-1 in retinal glial cells. *Jpn J Ophthalmol* 2007;51:236–7.
- [9] Nagayama H, Inaba M, Okabe R, Emoto M, Ishimura E, Okazaki S, et al. Glycated albumin as an improved indicator of glycemic control in hemodialysis patients with type 2 diabetes based on fasting plasma glucose and oral glucose tolerance test. *Biomed Pharmacother* 2009;63:236–40.
- [10] Scatchard G, Batchelder AC, Brown A. Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation. Vi. The osmotic pressure of plasma and of serum albumin. *J Clin Invest* 1944;23:458–64.
- [11] Waldmann TA. Albumin structure, function and uses. In: Rothschild MAE, editor. New York: Pergamon Press; 1977.
- [12] Kratz F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release* 2008;132:171–83.
- [13] Halliwell B. Albumin – an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol* 1988;37:569–71.
- [14] Chesne S, Rondeau P, Armenta S, Bourdon E. Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine serum albumin on its structure and on cultured adipose cells. *Biochimie* 2006;10:1467–77.
- [15] Rondeau P, Singh N, Caillens H, Bourdon E. Oxidative stresses induced by glycated human or bovine serum albumins on human monocytes. *Free Radic Biol Med* 2008;45:799–812.
- [16] Rondeau P, Navarra G, Cacciabaudo F, Leone M, Bourdon E, Militello V. Thermal aggregation of glycated bovine serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:789–98.
- [17] Rodkey FL. Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. *Clin Chem* 1965;11:478–87.
- [18] Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clinica Chimica Acta* 1983;127:87–95.
- [19] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70–7.
- [20] Snyder SL, Sobocinski PZ. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Anal Biochem* 1975;64:284–8.
- [21] Morais MP, Mackay JD, Bhamra SK, Buchanan JG, James TD, Fossey JS, et al. Analysis of protein glycation using phenylboronate acrylamide gel electrophoresis. *Proteomics* 2009;10:48–58.
- [22] Argirova MD, Ortwerth BJ. Activation of protein-bound copper ions during early glycation: study on two proteins. *Arch Biochem Biophys* 2003;420:176–84.
- [23] Bourdon E, Loreau N, Lagrost L, Blache D. Differential effects of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin. *Free Radic Res* 2005;39:15–20.
- [24] Ramful D, Tarnus E, Rondeau P, Robert Da Silva C, Baborun T, Bourdon E. Citrus fruit extracts reduce advanced glycation end products (AGEs)- and H₂O₂-induced oxidative stress in human adipocytes. *J Agric Food Chem* 2010;58:11119–29.
- [25] Faure P, Troncy L, Lecomte M, Wiernsperger N, Lagarde M, Ruggiero D, et al. Albumin antioxidant capacity is modified by methylglyoxal. *Diabetes Metab* 2005;31:169–77.
- [26] James TD. Boronic acids in organic synthesis and chemical biology. In: Hall DG, editor. Weinheim: Wiley-VCH; 2005.
- [27] James TD, Shinkai S. Artificial receptors as chemosensors for carbohydrates. *Top Curr Chem* 2002;218:159–200.
- [28] Peters TJ. All about albumin – biochemistry, genetics and medical applications. San Diego: Academic Press; 1996.
- [29] Gordon DT, Leinart AS, Cousins RJ. Portal copper transport in rats by albumin. *Am J Physiol* 1987;252(3 Pt 1):E327–33.
- [30] Bourdon E, Loreau N, Davignon J, Bernier L, Blache D. Involvement of oxysterols and lysophosphatidylcholine in the oxidized LDL-induced impairment of serum albumin synthesis by HEPG2 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2643–50.
- [31] Carbball S, Alvarez B, Turell L, Botti H, Freeman BA, Radi R. Sulfenic acid in human serum albumin. *Amino Acids* 2007;32:543–51.
- [32] Gutteridge JM. Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochim Biophys Acta* 1986;869:119–27.
- [33] Laussac JP, Sarkar B. Characterization of the copper (II)- and nickel (II)-transport site of human serum albumin. Studies of copper (II) and nickel (II) binding to peptide 1-24 of human serum albumin by ¹³C and ¹H NMR spectroscopy. *Biochemistry* 1984;23:2832–8.
- [34] Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett* 2008;582:1783–7.
- [35] Kragh-Hansen U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol Rev* 1981;33:17–53.
- [36] Otagiri M. A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20:309–23.

SUPPLEMENTARY DATA

| | Non diabetics (ND) | Diabetics (D) |
|------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| N (females) | 38 (21) | 15 (8) |
| Age (years) | 46.2 ± 18.5 | 48.5 ± 16 |
| HbA1c (%) | 5.3 ± 0.3 | 12.0 ± 1.8 ^{***} |
| Fructosamines (ng/mL) | 202.1 ± 17.1 | 419.1 ± 90.0 ^{***} |
| Creatinin (µmol/L) | 79.8 ± 13.9 | 97.3 ± 29.5 ^{**} |
| Albumin (g/L) | 43.5 ± 3.4 | 40.5 ± 4.6 [*] |
| Total proteins (g/L) | 73.1 ± 6.1 | 71.6 ± 5.9 |
| CRP (mg/L) | 5.6 ± 6.8 | 14.0 ± 14.2 ^{**} |

Table S1: Clinical and biochemical characteristics of diabetic and non diabetic patients and plasma samples.

Data are expressed as means ± SD and are compared using Student's t test for unpaired samples. ^{***}p<0.001, ^{**}p<0.01, ^{*}p<0.05.

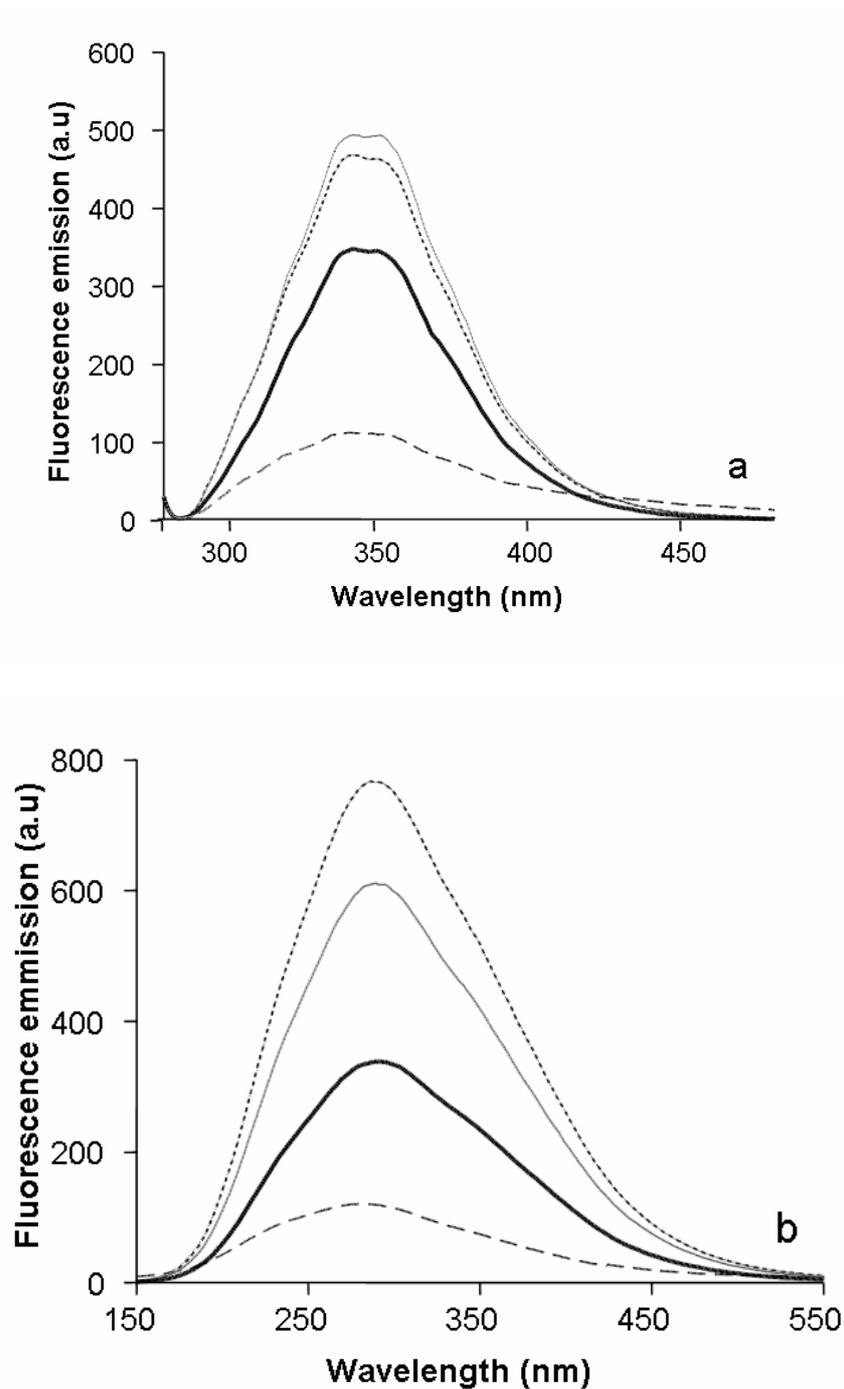


Figure S1: a) Fluorescence spectra of tryptophan with excitation wavelength at 270 nm; b) ANSA emission fluorescence spectra at excitation wavelength of 470 nm for HSA-ND_{G0} (—), HSA-ND_{G100} (·····), HSA-ND_{MGO} (---) and HSA-D (- -). Fluorescence spectra of all samples are shown after having normalized the data.

Article 2: Impaired drug binding capacities of *in vitro* and *in vivo* glycated albumin. *Biochimie* 2012 ; 94 : 1960-1967. **J. Baraka-Vidot, A. Guerin-Dubourg, E. Bourdon, P. Rondeau.**



Research paper

Impaired drug-binding capacities of in vitro and in vivo glycated albumin

Jennifer Baraka-Vidot^a, Alexis Guerin-Dubourg^{a,b}, Emmanuel Bourdon^a, Philippe Rondeau^{a,*}^a Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO), Structure fédérative Environnement Biodiversité Santé-FED4126, Université de La Réunion, Plateforme CYROL, 15, avenue René Cassin • BP 7151, 97715 Saint Denis Messag Cedex 09, La Réunion, France^b Unité fonctionnelle de recherche Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire Félix Guyon, Saint Denis de La Réunion, France

a r t i c l e i n f o

Article history:

Received 13 February 2012

Accepted 9 May 2012

Available online 22 May 2012

Keywords:

Human albumin

Diabetes

Warfarin

Ketoprofen

Glycation

a b s t r a c t

Albumin, the major circulating protein in blood, can undergo increased glycation in diabetes. One of the main properties of this plasma protein is its strong affinity to bind many therapeutic drugs, including warfarin and ketoprofen. In this study, we investigated whether or not there were any significant changes related to in vitro or in vivo glycation in the structural properties and the binding of human albumin to both therapeutic drugs. Structural parameters, including redox state and ketoamine contents of in vitro and in vivo glycated purified albumins, were investigated in parallel with their affinity for warfarin and ketoprofen. High-performance liquid chromatography was used to determine the free drug concentrations and dissociation constants according to the Scatchard method. An alternative method based on fluorescence spectroscopy was also used to assess drug-binding properties. Oxidation and glycation levels were found to be enhanced in albumin purified from diabetic patients or glycated with glucose or methylglyoxal, after determination of their ketoamine, free thiol, amino group and carbonyl contents. In parallel, significant impairments in the binding affinity of in vitro and in vivo glycated albumin, as indicated by the higher dissociation constant values and confirmed by higher free drug fractions, were observed. To a lesser extent, this alteration also significantly affected diabetic albumin affinity, indicated by a lower static quenching in fluorescence spectroscopy. This work provides useful information supporting in vivo diabetic albumin could be the best model of glycation for monitoring diabetic physiopathology and should be valuable to know if glycation of albumin could contribute to variability in drugs response during diabetes.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Diabetes has reached pandemic proportions and affects around 6% of the world's adult population in 2006. This disease is considered to be one of the world's most important causes of expenditure, mortality, disability, and lost economic growth. Diabetes mellitus is characterized by an elevated level of glucose in the blood, which can affect the main circulating proteins through a non-enzymatic process known as glycation or glycooxidation. This condensation reaction involves circulating proteins and glucose and leads to the formation of Amadori products, which can give rise to irreversible conjugates called advanced glycation end products (AGE) in the case of unchecked hyperglycemia [1]. Elevated levels of these

adducts induce irreversible damage associated with the metabolic disorders observed in diabetes mellitus, such as retinopathy, nephropathy, neuropathy, and coronary artery disease [2,3].

Among the blood proteins, hemoglobin and albumin are the most common proteins that are likely to be glycated. The glycated hemoglobin (HbA_{1c}) level is considered as one of the main clinical parameters used for monitoring chronic glycemic control via blood glucose measurements (Self-Monitoring of Blood Glucose, SMBG) [4]. With a shorter half-life than hemoglobin in blood, glycated human serum albumin (HSA) appears to be an alternative marker for glycemic control as it can indicate blood glucose status over a short period (2e4 weeks) [5,6]. In vivo, the proportion of glycated albumin in healthy people is in the range of between 1% and 10% [7,8], and in the case of diabetes mellitus, this proportion can increase two- to three-fold [9].

Human serum albumin (HSA), as the most prominent protein in plasma, is the major carrier of various endogenous and exogenous metabolites in blood throughout the body. This plasma protein could serve as a circulating depot for many drugs [10]. In particular, it could play a major role in affecting therapeutic drug absorption, distribution, metabolism, and excretion [11]. Indeed, binding to human

Abbreviations: AGE, advanced glycation end-products; HSA, human serum albumin; HSA-ND and HSA-D, purified human serum albumin from non-diabetic and diabetic patients, respectively; HbA_{1c}, glycated hemoglobin level; PBS, phosphate-buffered saline; SMBG, self-monitoring of blood glucose; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid.

* Corresponding author. Tel.: +33 262 262 93 86 48; fax: +33 262 262 93 82 37.

E-mail address: rophil@univ-reunion.fr (P. Rondeau).

albumin increases the lifetime of a drug before it is metabolized, and it also allows some hydrophobic drugs to become more soluble in blood [12,13]. After delivery by albumin, unbound drugs could easily reach target organs through the plasma. In contrast, bound drugs can hardly reach the action site through the blood without losing their pharmacological activities and toxicity. Among the therapeutic drugs, some have a narrow therapeutic index, such as warfarin, and are easily toxic in the unbound state. Indeed, it was established that Minimal Effective Concentration (MEC) of warfarin is comprised between 1 and 7 mg/mL, while its Minimal Toxic Concentration (MTC) is above 10 mg/mL [14]. Some pathological states, which impair liver or renal functions, triggering hypoalbuminemia, could increase the effects of drugs highly bound to albumin [15].

Albumin has two major binding sites for drugs called Sudlow site I and Sudlow site II [16]. Because of its large size and adaptability, site I tends to bind bulky heterocyclic compounds including sulfonamides, salicylate and coumarin compounds such as warfarin [17,18]. In contrast, site II, which is smaller and less flexible, induces the more stereospecific binding of aromatic carboxylic acids and profens such as ibuprofen or ketoprofen [19,20]. The interaction of drugs with albumin can be affected by modifications of the protein such as glycation or oxidation [21,22]. Several reports have found that the main glycation reactions occur near both Sudlow sites [23,24]. But conflicting results have been reported on the impact of the glycation of albumin on its affinity to several drugs including warfarin [11,25e27]. These contradictory findings have resulted from several differences in: the mode of albumin purification, the way that in vitro glycation is performed, and the methods used for the measurement of ligand binding. These previous studies highlight the importance of having accurate knowledge of the preparation of in vitro glycated albumin models and the necessity of using an in vitro model of albumin with biochemical characteristics typical of those expected of serum albumin in diabetics.

Few studies have reported the binding affinities of albumin in vivo, in case of chronic hyperglycemia, for many therapeutic drugs. Regarding these previous findings, the drug-binding properties of in vitro glycated albumin models should be investigated and compared with glycated albumin from diabetic patients. This drug-binding study should be performed on three different in vitro glycation models. Two of them, which are common glycated albumin models, are considered controversial and use supraphysiological concentrations of glucose (100 mM) or methylglyoxal (10 mM). The third model, which uses a pathological concentration of glucose (25 mM), is more typical of diabetic albumin. The binding parameters of these in vitro models should be compared with native and diabetic HSA. Two therapeutic drugs were selected for this study. Warfarin, an anti-coagulant drug, and ketoprofen (Fig. 1), a non-steroidal anti-inflammatory drug with analgesic and antipyretic effects, were chosen as site-selective probes for Sudlow sites I and II, respectively.

The aim of this study is to identify differences between in vitro and in vivo modified albumin models through the determination of their binding properties for two probes. The warfarin and ketoprofen binding characteristics obtained for our different albumin preparations, by using high-performance liquid chromatography and fluorescence spectroscopy, as well, could provide a better knowledge of albumin structural modifications during its glycation process.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

Aqueous methylglyoxal solutions (40%), D-glucose, anti-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) antibody, the 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine liquid substrate (TMB) system for ELISA, warfarin and ketoprofen were all purchased from Sigma.

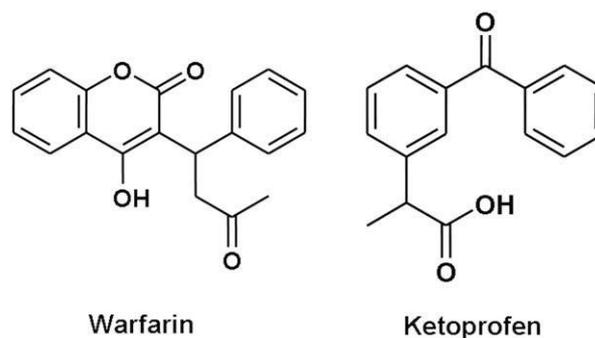


Fig. 1. Structures of warfarin and ketoprofen.

2.2. Human albumin purification

Blood was obtained from a pool of diabetic patients and non-diabetic subjects and anticoagulated in EDTA tubes (BD Vacutainer) at the Biochemistry laboratory of the Centre Hospitalier Universitaire (CHU, Saint-Denis, La Réunion). The procedures and the collection of human materials were approved by the local governmental French Ethical Committee. The albumin was purified using pooled serum from 39 diabetic (%HbA_{1C} = 11.0 ± 1.9) and 14 non-diabetic (% HbA_{1C} = 5.5 ± 0.4) patients. Pool of diabetics includes patients with both types of diabetes. Patients with a hemoglobin abnormality and/or hyperleukocytosis were excluded from the pool of plasma. All biological data related to both pools are given in Table 1.

The purification of serum albumin from fresh human plasma was based on extensive dialysis against Tris/HCl (pH 7.4; 50 mM) followed by affinity chromatography using Cibacron Blue 3G linked to agarose (Amersham cat# 17-0948-01) as a ligand for the albumin. A NaCl (pH 7.4; 1.5 M) buffer was used for the desorption of bound albumin from Cibacron Blue-agarose following the elution of other plasma proteins with a Tris/HCl (pH 7.4; 50 mM) buffer. Each fraction of eluate was examined by gel electrophoresis and the most purified and concentrated extracts were pooled before the remaining immunoglobulins were removed with sepharose-protein A, followed by extensive dialysis against PBS and then storage at 80 °C.

2.3. Preparation of in vitro glycated HSA

Advanced glycation end products (AGE) were prepared as previously described [28] by incubating 0.37 mM purified HSA from a non-diabetic pool (HSA-ND) without and with glucose (25 mM or 100 mM) in PBS, pH 7.4, under sterile conditions, at 37 °C for 3 weeks, or with methylglyoxal (10 mM) for 2 days. The proteins

Table 1
Clinical and biochemical characteristics of diabetic and non-diabetic patients and plasma samples.

| Compounds | Non diabetic (ND) | Diabetic (D) |
|-----------------------|-------------------|------------------|
| N (females) | 14 (7) | 39 (16) |
| Age | 33 ± 9 | 51.5 ± 20.1** |
| HbA _{1c} (%) | 5.5 ± 0.4 | 11.0 ± 1.9*** |
| Fructosamines (ng/mL) | 218.3 ± 10.9 | 390.0 ± 131.5*** |
| Creatinin (mmol/L) | 89.8 ± 12.3 | 88.0 ± 16.2 |
| Albumin (g/L) | 46.4 ± 2.6 | 38.8 ± 5.5*** |
| Total protein (g/L) | 73.8 ± 4.0 | 67.7 ± 7.7** |
| CRP (mg/L) | 2.6 ± 2.5 | 7.0 ± 8.0* |
| Cholesterol (mmol/L) | 4.6 ± 0.7 | 4.5 ± 1.3 |
| Triglycerides (g/L) | 0.9 ± 0.4 | 1.6 ± 1.0*** |

Data are expressed as means ± SD and were compared using the Student's t test for unpaired samples; ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05.

were dialyzed against PBS, sterile-filtered through a 0.2 mm Millipore filter and stored at -80°C .

2.4. Structural analysis of modified albumins

Fructosamine and ketoamine derivatives, useful index of diabetic control, were determined using the method developed by Johnson et al. [29] with the nitroblue tetrazolium (NBT) reagent. The thiol groups in native, modified albumin were measured by Ellman's assay using 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) [30], which was well described in a previous study [31].

The 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) assay is a sensitive method for determining the primary free amino groups in proteins [32]. This method was described in detail in a previous study by our group [33]. The degree of carbonylation of glycoxidized albumin was determined by the carbonyl ELISA assay based on the recognition of protein-bound DNPH in carbonylated proteins with an anti-DNP antibody. This method was described in detail in previous studies by our group [33,34].

2.5. Affinity study: experimental design for the HPLC method

The experimental design for this study drew its inspiration from a work conducted by Olsen about the drug-binding capacity of pharmaceutical grade albumins [35], and is described below.

Stock solutions of warfarin (100 mM) and ketoprofen (100 mM) were prepared in NaOH (0.1 M). A standard range of concentrations from 0.01 to 2 mM was prepared from these stock solutions in PBS 1X, for both drugs.

The samples were prepared in Eppendorf tubes, where 150 nmol of proteins of different albumin samples were incubated at 37°C , for 30 min with 60, 80, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 1500 and 3000 nmol of warfarin or ketoprofen. After incubation, the fractions of free drugs and drugs bound to albumin were separated by ultrafiltration using the Amicon® Ultra system (Millipore) and centrifugation for 20 min at 13,000 rpm. The percentage of free drug fractions recovered using this method was about 93% (± 2.1).

Then, the unbound (free) drug concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC), coupled to a UV spectrophotometer. A solution of acetonitrile/Tris-HCl (pH 7.4; 50 mM) (35:65, v/v) was used as the mobile phase, delivered at a flow rate of 1 mL/min in a LiChrospher 100 RP-18 column (250×4.6 mm i.d., s-5, 5 mm) (Merck, Darmstadt, Germany) at 30°C . The pump was maintained at 147 bars and the analysis was performed on 50 mL of each sample. The measurements took place at 254 nm.

2.6. Affinity study: experimental design of the fluorescence spectroscopy method

This method is based on the quenching of albumin fluorescence induced by its interaction with drugs [36]. The intrinsic fluorescence of human albumin is mainly attributed to the tryptophan

residue (Trp-214). Different series of assay solutions were prepared by mixing 10 mM of native or diabetic HSA with warfarin or ketoprofen at variable concentrations ranging from 5 to 70 mM. Each solution was heated for 5 min at 37°C and transferred into a quartz cell. The fluorescence spectra were recorded in the range of 250e500 nm under excitation at 283 nm. The binding parameters (i.e. the binding constant K_A and the binding site number n) for both drugs were obtained from the equation given below [37]:

$$\log \frac{(F_0 - F_C)}{F_C} = \log K_A + n \log [C]$$

where F_0 and F_C are the tryptophan fluorescence intensities in the absence and presence of a drug at concentration $[C]$, respectively, and K_A is the formation constant of the complex formed between the drug and albumin, expressed as L/mol.

2.7. Statistical analysis

The data are expressed as the means \pm standard deviation (SD) from a minimum of three experiments. Statistical significances were determined using one-way ANOVA (followed by the Student's t test) for multiple comparisons; a p value of less than 0.05 was required for significance.

3. Results

3.1. Biochemical characterization of the glycated HSA samples

Three in vitro models of glycated albumin were prepared and compared with native and in vivo diabetic albumin. The HSA-ND_{G25} and HSA-ND_{G100} models were prepared with 25 mM and 100 mM of glucose, while the HSA-ND_{MGO} model corresponded to HSA incubated with 10 mM of methylglyoxal, a side-product of different metabolic pathways, such as the degradation process of glucose. The group of Thornalley has shown that physiological glycation processes also involve the modification of proteins by reactive α -oxoaldehydes such as methylglyoxal. These derivatives could also be formed during glucose-induced protein glycation [38]. At the first step of glycation process, glucose modification of albumin gives rise to the formation of fructosamine while methylglyoxal induces the generation of another ketoamine derivative named as early glycation product.

As shown in Table 2, the glycated albumin obtained under typical hyperglycemia conditions (HSA-ND_{G25}) had a lower level of ketoamine, of 5.07 (± 0.35) mol/mol HSA, than the other in vitro glycated albumin models. These albumin models were prepared with supraphathological concentrations of glucose (HSA-ND_{G100}) or methylglyoxal (HSA-ND_{MGO}) and contained 12.43 (± 1.88) and 9.25 (± 1.46) mol of ketoamine/mol HSA, respectively. If its ketoamine level is significantly higher (2.13 ± 0.58 mol) than that of native albumin (HSA-ND_{G0}) (1.11 ± 0.12 mol), diabetic HSA (HSA-D) has

Table 2
Oxidation parameters in various albumin preparations.

| Methods | Ketoamine/HSA (mol/mol) | Thiols/HSA (mol/mol) | Free amino groups/HSA (mol/mol) | Carbonyl rate increase (%/control) |
|------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Purified HSA-ND | | | | |
| HSA-ND _{G0} | 1.11 \pm 0.12 | 0.609 \pm 0.013 | 13.36 \pm 0.98 | 100.00 \pm 7.35 |
| HSA-ND _{G25} | 5.07 \pm 0.35*** | 0.333 \pm 0.067** | 12.44 \pm 0.83 | 111.42 \pm 10.89 |
| HSA-ND _{G100} | 12.43 \pm 1.88*** | 0.286 \pm 0.011*** | 10.42 \pm 0.20** | 224.84 \pm 13.93*** |
| HSA-ND _{MGO} | 9.25 \pm 1.46*** | 0.250 \pm 0.026*** | 5.10 \pm 0.54*** | 455.67 \pm 69.68*** |
| Purified HSA-D | | | | |
| HSA-D _{G0} | 2.13 \pm 0.58* | 0.307 \pm 0.012*** | 10.38 \pm 0.80* | 95.66 \pm 3.90** |

1) Ketoamine levels obtained with the NBT assay; 2) free thiol group content as assessed by Ellman's method; 3) primary amino group contents in proteins by the TNBS assay; 4) percentage carbonyl rate as assessed by the ELISA carbonyl assay. All data are expressed as means \pm SD from three independent experiments. Effect of glycation or diabetes on purified HSA (vs. HSA-ND_{G0}); *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

a very low level of glycation in comparison to HSA-ND_{G25}. The relatively lower ketoamine level of HSA_{MGO}, in comparison to HSA-ND_{G100} could be explained by a higher reactivity of methylglyoxal, which gives rise to a more rapid formation of AGE.

Several oxidative parameters in these albumin preparations are also reported in Table 2. As expected, the levels of free thiol and amino groups significantly decreased in albumin with in vitro glycation by glucose or methylglyoxal and in vivo glycation, whereas the carbonyl level increased, except in diabetic albumin. The unexpected higher carbonylation level for HSA-ND_{G0}, in comparison with diabetic albumin, could be partially explained by the 3 weeks incubation of native HSA at 37 °C (diabetic albumin did not undergo this incubation step). During this incubation time, oxidation process could occur.

This oxidative state was more marked in the case of methylglyoxal-modified HSA. Similarly, the rate of increase of carbonyl, attributed to the enhanced oxidation of albumin with in vitro modification, was more marked with methylglyoxal than with glucose. As expected, the oxidative parameters observed for diabetic HSA corresponded to those obtained for albumin modified with 25 mM of glucose. Both types of albumin displayed quite similar global net charges, as attested by the electrophoretic migration profile in native page electrophoresis (data not shown).

3.2. Binding of both drugs to glycosylated albumins

As shown in Fig. 2a and b, warfarin and ketoprofen were highly bound to native human albumin with unbound drug fractions of 3.9 and 2.7% respectively. As noticed for both drugs, the free fractions were higher for both in vitro and in vivo glycosylated albumins. This increase, which was more marked for HSA-ND_{MGO}, was by approximately eight and seven times for warfarin and ketoprofen, whereas the diabetic albumin exhibited a free drug fraction of around twice higher as well for warfarin (7.3%) as for ketoprofen (5.4%) in comparison with native albumin.

Human albumin, glycosylated or not, has a lower affinity for ketoprofen than for warfarin. Deeper analyses were performed to obtain more information on the binding parameters for different glycosylated HSA samples with both drugs. Fig. 3 shows the results of the binding studies, in a Scatchard plot form, at various concentrations of warfarin (Fig. 3a) and ketoprofen (Fig. 3b) with HSA-ND_{G0}, HSA-ND_{MGO}, and HSA-D. The Scatchard plot was performed over a range of drug concentrations, giving an *r* value (mol number of bound drug per mol of albumin) of between 0.4 and 1.1, corresponding to the specific binding study. As seen in Fig. 3, the drug-binding yielded straight lines with correlation coefficients (*r*) above 0.985, which could indicate the number of specific binding sites (*n*) and the dissociation constant (*K_d*). These binding parameters for warfarin and ketoprofen are summarized in Table 3. The smaller is the dissociation constant, the stronger is the binding between the ligand (drug) and the receptor (albumin). As observed for previous unbound drug results, albumin exerted a higher affinity for ketoprofen (*K_d* = 6.98 mmol/L) than for warfarin (*K_d* = 9.52 mmol/L). These results also showed significant variations between native HSA and in vitro or in vivo glycosylated HSA. For both drugs, an increase in *K_d* values was observed with the in vitro glycation of albumin, which was more marked for HSA-ND_{MGO}, indicating a loss of affinity. The binding affinity for warfarin was reduced, according to an increase in *K_d* values and the number of binding sites (between 1.55 and 2.80). In contrast, the binding affinity for ketoprofen was affected, with glycation, but without significant changes in the number of binding sites (between 1.43 and 1.67). Similar to in vitro glycosylated albumin, but to a lesser extent, in vivo glycosylated albumin from diabetic patients had a lower affinity for both drugs with elevated dissociation constants for ketoprofen (*K_d* = 9.98 mmol/L)

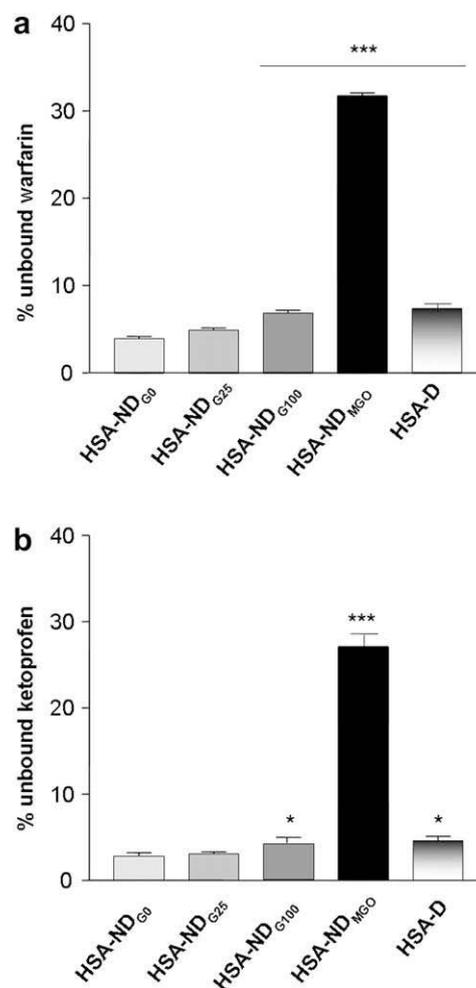


Fig. 2. Percentage of unbound warfarin and ketoprofen concentrations in various albumin preparations. All data are expressed as means \pm SD from three independent experiments. *Effect of glycation or diabetes on purified HSA (vs. HSA-ND_{G0}); ****p* < 0.001, **p* < 0.05.

and warfarin (*K_d* = 11.74 mmol/L). This partial loss of affinity was not accompanied by an increase in the number of binding sites (around 1.3 for both drugs).

3.3. Binding of both drugs to in vivo glycosylated albumin

In order to strengthen the previous findings, the interactions between warfarin and ketoprofen and the native and diabetic HSA were also investigated using an alternative method based on fluorescence quenching. Fluorescence quenching corresponds to a process that reduces the intensity of fluorescence. As shown in the fluorescence emission spectrum of Fig. 4a and b, the maximum fluorescence intensity of native albumin at 337 nm, attributed to tryptophan, decreased with increasing concentrations of warfarin and ketoprofen. Both drugs acted as quenchers via interactions with the protein. However, the maximum tryptophan emission wavelength of around 337 nm for native HSA without drugs (thick lines) was not affected in the presence of warfarin or ketoprofen. The log plots ((*F₀* - *F_c*)/*F_c*) of HSA-ND_{G0} and HSA-D versus drug concentration (log [*C*]) are shown in Fig. 5a for warfarin and Fig. 5b for ketoprofen. These plots exhibit a good linearity with the correlation coefficients (*r*) above 0.986 (Table 4). The numbers of binding site *n* and the binding constants *K_A*, listed in Table 4 for warfarin and ketoprofen, were calculated using these plots. The

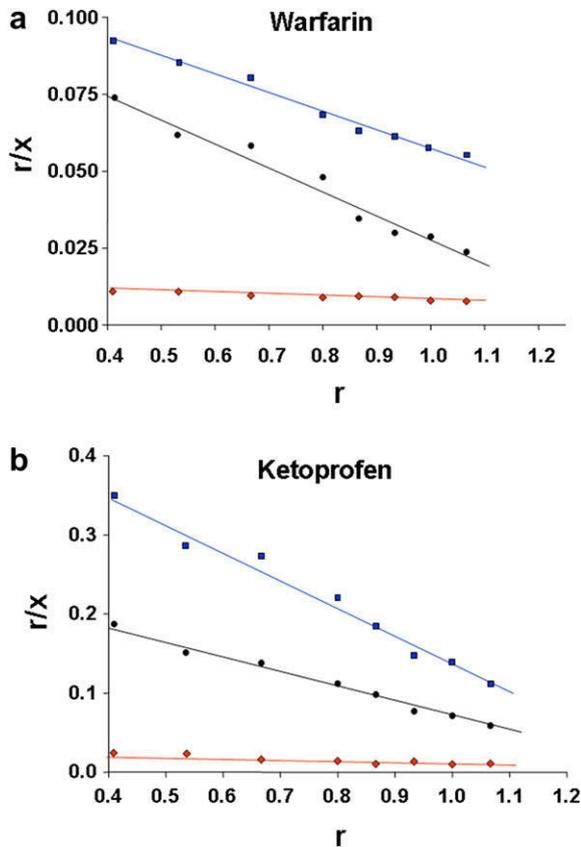


Fig. 3. Scatchard plots of warfarin and ketoprofen in various albumin preparations. Scatchard plot of: (a) warfarin and (b) ketoprofen binding in native human HSA-ND_{G0} (●), in vitro glycated albumin HSA-ND_{MGO} (▲) and diabetic albumin HSA-D (◆).

binding site n corresponds to the slope and $\log K_A$ to the intercept. The binding constant relative to native HSA with ketoprofen ($K_A = 6.15 \times 10^6$ L/mol) is higher than the one calculated for warfarin ($K_A = 2.23 \times 10^6$ L/mol), as was found with the HPLC method. In comparison to the native HSA, a decrease in the binding constant of diabetic albumin can be observed, which dropped considerably with both warfarin (120 times lower) and ketoprofen (200 times lower). These results suggest a partial loss in the affinity of diabetic albumin for both drugs, which was confirmed by the reduced number of binding sites to around $n = 1.03$ ($n = 1.08$) with the in vivo glycation of warfarin (ketoprofen) in comparison to the native albumin, which had around $n = 1.44$ ($n = 1.55$) binding sites.

Table 3
Binding parameters of warfarin and ketoprofen in various albumin preparations.

| | Dissociation constant K_d (mmol/L) | | Specific binding sites (n) | |
|------------------------|--------------------------------------|----------------|--------------------------------|-------------|
| | Warfarin | Ketoprofen | Warfarin | Ketoprofen |
| Purified HSA-ND | | | | |
| HSA-ND _{G0} | 9.52 ± 0.57 | 6.98 ± 1.49 | 1.55 ± 0.14 | 1.43 ± 0.1 |
| HSA-ND _{G25} | 13.3 ± 1.64** | 6.65 ± 2.19 | 1.60 ± 0.02 | 1.49 ± 0.02 |
| HSA-ND _{G100} | 24.0 ± 4.14*** | 14.3 ± 5.07* | 1.99 ± 0.06 | 2.10 ± 0.07 |
| HSA-ND _{MGO} | 120 ± 24.1*** | 58.5 ± 4.57*** | 2.80 ± 0.04 | 1.67 ± 0.13 |
| Purified HSA-D | | | | |
| HSA-D _{G0} | 11.74 ± 1.46* | 9.98 ± 1.86* | 1.31 ± 0.1 | 1.35 ± 0.1 |

The binding studies with warfarin and ketoprofen were performed with 0.5 mM albumin samples. The binding parameters: specific binding site (n) and dissociation constant K_d were calculated according to Scatchard. All data are expressed as means ± SD from four or five independent experiments.

Effect of glycation or diabetes on purified HSA (vs. HSA-ND_{G0}): *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

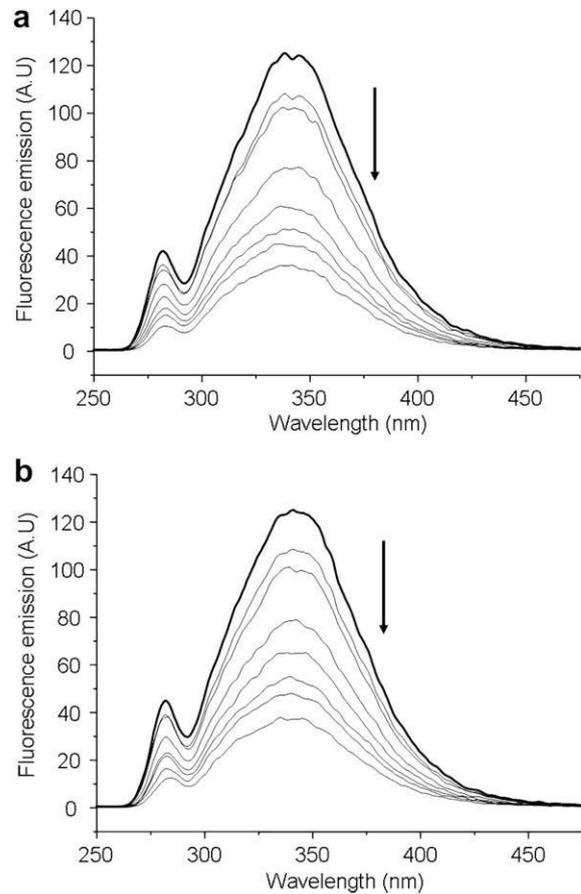


Fig. 4. Effects of warfarin and ketoprofen on the fluorescence emission spectrum of native HSA (HSA-ND_{G0}). Native albumin at 10 mM was incubated without (thick curve) and with different concentrations of (a) warfarin and (b) ketoprofen of between 5 and 70 mM at 37 °C for 5 min.

These binding site numbers are listed in Table 4 and are quite similar to those obtained by the HPLC method.

4. Discussion

Uncontrolled hyperglycemia in severely diabetic patients is the main cause of the advanced glycation process of plasma proteins such as hemoglobin and albumin. These glycation-induced structural and functional changes in albumin are of particular interest because numerous in vivo studies have reported the strong involvement of glycated albumin in the development and progression of chronic diabetic complications [2,3]. Furthermore, this enhanced glycation process could potentially contribute to an alteration of the binding properties of albumin for many drugs, with a consequent change in the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of these drugs. There are several causes for the decreased binding of albumin, such as high concentrations of bilirubin or free fatty acids, which can displace drugs from the binding sites of albumin, or also hypoalbuminemia [39]. This way, glycation is one of several mechanisms that could induce an increase in unbound circulating fractions of many albumin-bound drugs. The unbound drug, which is considered to be pharmacologically active, appears to be responsible for dose-related therapeutic effects and also the adverse drug reactions. Glycation, in the diabetic context, could induce an alteration in the pharmacological properties of albumin for many drugs associated with adverse consequences. This effect of glycation on albumin affinity could be more relevant

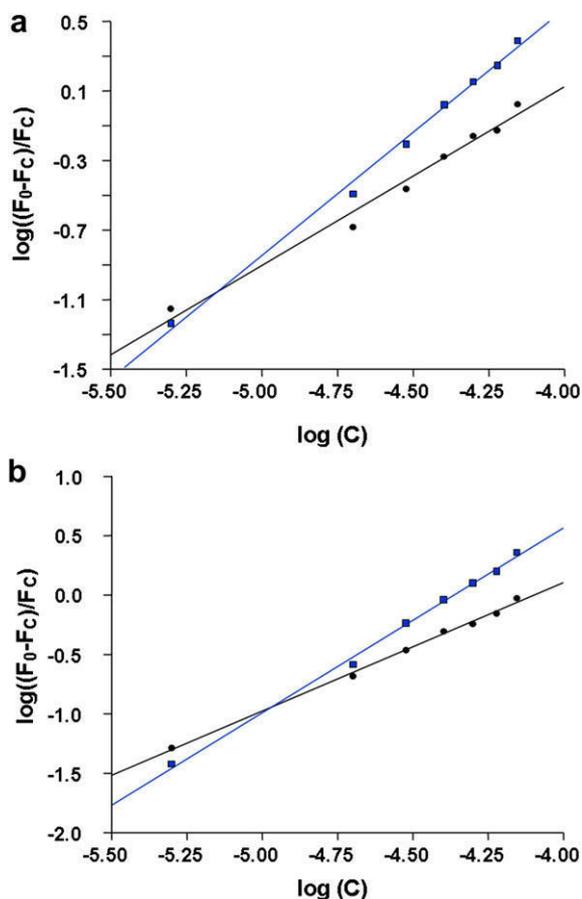


Fig. 5. The log plots $((F_0 - F_c)/F_c)$ vs. $\log [C]$ for warfarin and ketoprofen binding with native and diabetic albumin. F_0 and F_c are the tryptophan fluorescence intensities of native albumin, HSA-ND_{G0} (○) and diabetic albumin, HSA-D (●) in the absence and presence of (a) warfarin or (b) ketoprofen at different concentrations $[C]$.

for drugs that are highly bound (>95%) to albumin and have a low therapeutic index, such as warfarin. Warfarin is an anti-coagulant with a very low therapeutic index, which could trigger severe hemorrhaging if the correct degree of its pharmacological effect is not maintained. In contrast to warfarin, ketoprofen, a common medication for the treatment of inflammation or pain, has a wide therapeutic index. Major studies focused on the impact of glycation on the binding properties of albumin for therapeutic drugs were exclusively based on in vitro models of glycation, which do not necessarily meet the biological conditions expected in the context of diabetes. Moreover, among these numerous studies, some of them highlighted conflicting findings about the effect of glycation

Table 4

Binding parameters of warfarin and ketoprofen in native and diabetic albumin preparations obtained by spectroscopy.

| | Binding constant K_A (L/mol) | Binding sites (n) | Correlation coefficient (r) |
|----------------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Warfarin | | | |
| HSA-ND _{G0} | 2.23×10^6 | 1.44 ± 0.10 | 0.988 |
| HSA-D _{G0} | 1.77×10^4 | 1.03 ± 0.07 | 0.986 |
| Ketoprofen | | | |
| HSA-ND _{G0} | 6.15×10^6 | 1.55 ± 0.05 | 0.995 |
| HSA-D _{G0} | 2.97×10^4 | 1.08 ± 0.03 | 0.989 |

The binding studies of warfarin and ketoprofen were investigated with 10 mM albumin samples. The binding parameters: binding site number (n) and binding constant K_A were calculated as described in the Materials and methods section.

on the interaction between albumin and warfarin. For instance, in one study, the affinity of warfarin for the binding site I was shown to be unaffected in the case of human albumin glycosylated with glucose (2 mol glucose/mol albumin) [22], whereas a decrease in binding with early stage glycosylated albumin, which was attributed to conformational changes or to steric hindrance of the protein, was reported in other studies [40,41]. In contrast, an excessive glycation (60 days) of albumin with a large amount of glucose (9 mol glucose/mol albumin) was shown to enhance warfarin binding to recombinant albumin [26]. Only a few studies have focused on the drug-binding properties of in vivo glycosylated HSA.

In this study, we first characterized our different glycosylated albumin models (in vitro and in vivo) by checking their redox status via their thiol and carbonyl contents and by assessing the glycation level through ketoamine and TNBS assays. Then, we investigated the interaction between two therapeutic drugs and modified albumin models by using two completely different techniques.

Three in vitro glycation models were characterized and compared with unmodified albumin (native) and in vivo glycosylated albumin purified from a pool of plasma from diabetic patients with very high glycosylated hemoglobin levels ($HbA_{1C} = 11.0\% \pm 1.9$). The HSA-ND_{G25} model, prepared using pathological concentrations of glucose, closely reflects the conditions found in diabetes, whereas HSA-ND_{G100} and HSA-ND_{MGO} are widely used models that greatly differ from this pathological condition. As expected, both supraphysiological glycation models displayed a considerable level of glycation associated with an increased oxidative state. Furthermore, compared to the data obtained for in vivo glycosylated HSA (HSA-D), in vitro glycosylated HSA with 25 mM of glucose (HSA-ND_{G25}) appeared to be the most relevant in vitro model for mimicking hyperglycemia or the diabetes model. However, our in vivo glycosylated albumin remained the most suitable model for drug-binding studies.

The affinity of albumin for both therapeutic drugs was also evaluated with the help of binding parameters (dissociation constant and the number of binding sites) and the determination of free drug concentrations. The unbound fractions of warfarin and ketoprofen were measured by HPLC after ultrafiltration. An alternative would have been to perform an equilibrium dialysis instead of ultrafiltration in order to recover the unbound drug fraction. Lagrange et al. reported that both experimental modes generated quite similar data in the binding capacity of ketoprofen for HSA [20].

Although the experimental conditions used in our study were quite similar to those used by Olsen et al. [35], there were some differences in the results obtained for the interaction between native HSA and warfarin. Indeed, the free fraction of warfarin was five times higher (3.9%) than found by Olsen et al. in purified human albumin (0.7%). This difference could be attributed to the mode of purification of albumin in our study. After the chromatographic purification and immunoglobulin removal steps, our albumin samples were not defatted. Free fatty acids can reduce the binding affinity of albumin when they are bound to albumin. Besides this, the present study demonstrated that the increase in free drug fractions found for warfarin and ketoprofen with the glycation process was in agreement with the binding parameter values obtained by the Scatchard method. In parallel with an eight-fold increase in the free warfarin fraction for the HSA-ND_{MGO} model (vs. native HSA), there was an eleven-fold decrease in the strength of this binding, as indicated by the dissociation constant values. The significant decrease in binding for the most in vitro glycosylated albumins could be explained by the major structural changes in HSA after glycation. In particular, the tertiary structure conformation, as detected by tryptophan fluorescence, was significantly affected by glycation (data not shown). This structural modification has been shown to be accompanied by a partial opening of hydrophobic

pockets, as detected by 1-anilinoanthracene-8-sulfonate (ANS) fluorescence [42], among which are hydrophobic cavities in the subdomains IIA and IIIA of albumin, where Sudlow sites I and II are located. As expected, the glycation of albumin under conditions that most closely resemble those that occur in the blood during hyperglycemia led to fewer changes in the binding of both drugs compared to the suprapathological models. The reduced affinities for warfarin and ketoprofen observed in these latter glycation models featured conformational changes in the Sudlow binding sites I and II, respectively. These impairments, which occurred during the glycation process, resulted in an increased binding site number. Results in the literature have reported that warfarin and ketoprofen only bind to one highly specific binding site (Sudlow sites I and II, respectively) [16]. In this study, specific binding site values of between 1.43 and 1.55 were calculated, indicating the existence of a secondary binding site with a lower affinity. Several authors have suggested the existence of a secondary binding site for warfarin [43,44] and ketoprofen [20]. The increase in the number of binding sites for highly glycated albumin could indicate a displacement of drugs from their changed primary binding sites to binding sites with a lower specificity. In a recent study, we showed that albumin tertiary structure of albumin was more affected by methylglyoxal-induced glycation than by glucose [45]. We observed a drastic alteration in albumin tertiary structure associated with change in the protein hydrophobicity. This alteration could impair affinity of the Sudlow site I for warfarin in albumin and could lead to formation of a new unspecific binding site having low affinity.

Moreover, regarding diabetic albumin, our study highlights interesting findings. Indeed, the specific binding of warfarin was significantly reduced in diabetic albumin and was quite similar to the glycation model most typical of the conditions in diabetes (HSA-ND_{G25}). This partial loss of affinity was confirmed by a higher free warfarin fraction, which was more marked for diabetic albumin. This downward trend was also found for ketoprofen, except for HSA-ND_{G25}, which did not show a significant difference to native albumin with respect to the binding properties. Thus, these results are in agreement with a marked increase in the free fractions of both drugs, which were nearly doubled between the diabetic and native albumin. It could be hypothesized that, in the case of diabetes, this minor loss in affinity could significantly impact the biological responses of many drugs highly bound to albumin such as warfarin or ketoprofen. Up to now, no study has established any clinical relevance for this hypothesis in human pharmacology context. Warfarin constitutes a drug exhibiting narrow therapeutic window and important inter-individual and inter-ethnic differences in the dose required for its anticoagulation effect [46]. The main factors (40%) contributing to this inter-individual variation remain unknown [47]. Therefore, it is of utmost importance to determine the contribution of albumin modifications in these factors.

The effect of glycation on the interaction between both drugs and albumin was determined using the fluorescence quenching technique. The interaction of warfarin or ketoprofen with albumin molecules leads to a quenching of tryptophan fluorescence. There are many reasons to account for such quenching, including molecular rearrangement or a change in the microenvironment around tryptophan as a result of an unfolding process. For instance, the glycation process of albumin leads to a quenching of tryptophan fluorescence, as reported in numerous studies [9,33,45]. It can be noted that the sole tryptophan residue of human albumin is located in subdomain IIA near Sudlow site I [48]. In these interactions between the quencher (warfarin or ketoprofen) and the fluorophore (albumin), fluorescence quenching can occur via two different mechanisms: static and dynamic, respectively [49]. In the

static quenching mode there is a ground state formation of a non-fluorescence complex between the fluorophore and the quencher. In the dynamic quenching mode, following the collision of a quencher during the lifetime of the excited state, the fluorophore returns to ground state, without the emission of photons. Previous studies reported that the quenching mechanism of HSA by ketoprofen or warfarin was due to complex formation in the static mode rather than by dynamic collision [36,50].

In the presence of ketoprofen or warfarin, a quenching of tryptophan fluorescence occurred for both native and diabetic albumin without any shift in the maximum emission wavelength. This result suggests complex formation between the drugs and albumin, involving changes in the microenvironment around tryptophan. Furthermore, we found that the binding constant relative to native HSA with ketoprofen ($K_A = 6.15 \times 10^6$ L/mol) was markedly higher than the one calculated ($K_A = 1.17 \times 10^4$ L/mol) in a recent study by Bi et al. [36]. Though the experimental conditions were quite similar to those in our study, this large difference could be explained by the use of commercial HSA by this group instead of fresh, purified albumin from plasma. In previous studies we reported that commercial albumin is often more oxidized than fresh, purified albumin [28,45]. Oxidation is one of several deleterious effects that could impact on the binding properties of plasma proteins [21].

Using this methodology, we focused on the differences in the interaction between drugs and native albumin and diabetic albumin by assessing the number of binding sites and the affinity constant. In accordance with the binding results calculated in the Scatchard method, the *in vivo* glycated albumin affinities appeared to be significantly and considerably impaired. Indeed, a reduction in the binding constant associated with a lower number of binding sites was found for diabetic albumin. Finally, the higher affinity of albumin for ketoprofen compared to warfarin, as determined by fluorescence spectroscopy, was in agreement with the results obtained by the HPLC method (Table 2).

The present study demonstrated the reduced binding capacity of glycated human albumin for warfarin and ketoprofen, which were used as probes for the main drug-specific sites of this protein. These results could provide supplementary information about the impact of glycation on changes in the structure of albumin, particularly around both Sudlow sites. Moreover, the relevant findings obtained for glycated albumin and, in particular, for the *in vivo* glycated albumin, emphasize the importance to assess the biological response of many drugs in diabetic pathology. This could be of utmost importance for therapeutic drugs highly bound to albumin and with narrow therapeutic index, such as warfarin whose dosing adjustment remains challenging in pathological context.

Author contributions

J.B.V. researched data, contributed discussion, reviewed manuscript. A.G.D. researched data, contributed discussion, reviewed manuscript. E.B. contributed discussion, reviewed manuscript. P.R. researched data, wrote, reviewed and edited manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Ministère de l'Outre-Mer, the Conseil Régional de La Réunion and Europe, the Université de La Réunion and the fédération Environnement Biodiversité Santé-FED4126. The corresponding author particularly acknowledges Dr Bertrand Payet of LCSNSA for his valuable advice concerning HPLC techniques.

References

- [1] P. Rondeau, E. Bourdon, The glycation of albumin: structural and functional impacts, *Biochimie* 93 (2011) 645e658.
- [2] M. Brownlee, The pathological implications of protein glycation, *Clin. Invest. Med.* 18 (1995) 275e281.
- [3] M.P. Cohen, Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin, *Arch. Biochem. Biophys.* 419 (2003) 25e30.
- [4] H.V. Roohk, A.R. Zaidi, A review of glycated albumin as an intermediate glycation index for controlling diabetes, *J. Diabetes Sci. Technol.* 2 (2008) 1114e1121.
- [5] K. Yoshiuchi, M. Matsuhisa, N. Katakami, Y. Nakatani, K. Sakamoto, T. Matsuoka, Y. Umayahara, K. Kosugi, H. Kaneto, Y. Yamasaki, M. Hori, Glycated albumin is a better indicator for glucose excursion than glycated hemoglobin in type 1 and type 2 diabetes, *Endocr. J.* 55 (2008) 503e507.
- [6] H. Nagayama, M. Inaba, R. Okabe, M. Emoto, E. Ishimura, S. Okazaki, Y. Nishizawa, Glycated albumin as an improved indicator of glycemic control in hemodialysis patients with type 2 diabetes based on fasting plasma glucose and oral glucose tolerance test, *Biomed. Pharmacother.* 63 (2009) 236e240.
- [7] T.J. Peters, All about Albumin e Biochemistry, Genetics, and Medical Applications, Academic Press, San Diego, 1996.
- [8] N. Shklai, R.L. Garlick, H.F. Bunn, Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 3812e3817.
- [9] E. Bourdon, N. Loreau, D. Blache, Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin, *Faseb J.* 13 (1999) 233e244.
- [10] U. Kragh-Hansen, Structure and ligand binding properties of human serum albumin, *Dan Med. Bull.* 37 (1990) 57e84.
- [11] K.S. Joseph, D.S. Hage, The effects of glycation on the binding of human serum albumin to warfarin and L-tryptophan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 811e818.
- [12] G. Colmenarejo, In silico prediction of drug-binding strengths to human serum albumin, *Med. Res. Rev.* 23 (2003) 275e301.
- [13] F. Herve, S. Urien, E. Albengres, J. Duché, J. Tillement, Drug binding in plasma. A summary of recent trends in the study of drug and hormone binding, *Clin. Pharmacokinet.* 26 (1994) 44e58.
- [14] M. Schulz, A. Schmoltdt, Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics, *Pharmazie* 58 (2003) 447e474.
- [15] J.P. Tillement, F. Lhoste, J.F. Giudicelli, Diseases and drug protein binding, *Clin. Pharmacokinet.* 3 (1978) 144e154.
- [16] G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade, Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin, *Mol. Pharmacol.* 12 (1976) 1052e1061.
- [17] M. Dockal, D.C. Carter, F. Ruker, Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 3042e3050.
- [18] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari, P. Ascenzi, The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, *IUBMB Life* 57 (2005) 787e796.
- [19] P. Ascenzi, A. Bocedi, S. Notari, G. Fanali, R. Fesce, M. Fasano, Allosteric modulation of drug binding to human serum albumin, *Mini Rev. Med. Chem.* 6 (2006) 483e489.
- [20] F. Lagrange, F. Penhourcq, M. Matoga, B. Bannwarth, Binding of ketoprofen enantiomers in various human albumin preparations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 793e802.
- [21] K. Oettl, R.E. Stauber, Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties, *Br. J. Pharmacol.* 151 (2007) 580e590.
- [22] N. Okabe, N. Hashizume, Drug binding properties of glycosylated human serum albumin as measured by fluorescence and circular dichroism, *Biol. Pharm. Bull.* 17 (1994) 16e21.
- [23] A. Lapolla, D. Fedele, R. Reitano, N.C. Arico, R. Seraglia, P. Traldi, E. Marotta, R. Tonani, Enzymatic digestion and mass spectrometry in the study of advanced glycation end products/peptides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 496e509.
- [24] D.L. Mendez, R.A. Jensen, L.A. McElroy, J.M. Pena, R.M. Esquerro, The effect of non-enzymatic glycation on the unfolding of human serum albumin, *Arch. Biochem. Biophys.* 444 (2005) 92e99.
- [25] G. Fitzpatrick, P. Duggan, The effect of non-enzymic glycation on ligand binding to human serum albumin, *Biochem. Soc. Trans.* 15 (1987) 267e268.
- [26] K. Nakajou, H. Watanabe, U. Kragh-Hansen, T. Maruyama, M. Otagiri, The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants, *Biochim. Biophys. Acta* 1623 (2003) 88e97.
- [27] N. Okabe, T. Nakasaka, Drug binding properties of glycosylated bovine serum albumin as measured by circular dichroism, *Biol. Pharm. Bull.* 17 (1994) 1505e1507.
- [28] P. Rondeau, N. Singh, H. Caillens, E. Bourdon, Oxidative stresses induced by glycated human or bovine serum albumins on human monocytes, *Free Radic. Biol. Med.* 45 (2008) 799e812.
- [29] R.N. Johnson, P.A. Metcalf, J.R. Baker, Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control, *Clinica Chim. Acta* 127 (1983) 87e95.
- [30] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70e77.
- [31] S. Chesne, P. Rondeau, S. Armenta, E. Bourdon, Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine serum albumin on its structure and on cultured adipose cells, *Biochimie* 10 (2006) 1467e1477.
- [32] S.L. Snyder, P.Z. Sobocinski, An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines, *Anal. Biochem.* 64 (1975) 284e288.
- [33] P. Rondeau, G. Navarra, F. Cacciabauda, M. Leone, E. Bourdon, V. Militello, Thermal aggregation of glycated bovine serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* 1804 (2010) 789e798.
- [34] D. Ramful, E. Tarnus, P. Rondeau, C. Robert Da Silva, T. Bahorun, E. Bourdon, Citrus fruit extracts reduce advanced glycation end products (AGEs)- and H2O2-induced oxidative stress in human adipocytes, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 11119e11129.
- [35] H. Olsen, A. Andersen, A. Nordbo, U.E. Kongsgaard, O.P. Bormer, Pharmaceutical-grade albumin: impaired drug-binding capacity in vitro, *BMC Clin. Pharmacol.* 4 (2004) 4.
- [36] S. Bi, L. Yan, Y. Sun, H. Zhang, Investigation of ketoprofen binding to human serum albumin by spectral methods, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 78 410e414.
- [37] A. Marty, M. Boiret, M. Deumie, How to illustrate ligand-protein binding in a class experiment: an elementary fluorescent assay, *J. Chem. Educ.* 63 (1986).
- [38] N. Ahmed, P.J. Thornalley, J. Dawczynski, S. Franke, J. Strobel, G. Stein, G.M. Haik, Methylglyoxal-derived hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44 (2003) 5287e5292.
- [39] J. McKichan, Influence of protein binding and use of unbound (free) drug concentrations, in: Michael E. Burton, LMS, J.J.S, William E. Evans (Eds.), *Applied Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Principles of Therapeutic Drug Monitoring*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2006, pp. 82e120.
- [40] K. Koizumi, C. Ikeda, M. Ito, J. Suzuki, T. Kinoshita, K. Yasukawa, T. Hanai, Influence of glycosylation on the drug binding of human serum albumin, *Biomed. Chromatogr.* 12 (1998) 203e210.
- [41] K. Mera, K. Takeo, M. Izumi, T. Maruyama, R. Nagai, M. Otagiri, Effect of reactive-aldehydes on the modification and dysfunction of human serum albumin, *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 1614e1625.
- [42] N. Sattarahmady, A.A. Moosavi-Movahedi, F. Ahmad, G.H. Hakimelahi, M. Habibi-Rezaei, A.A. Saboury, N. Sheibani, Formation of the molten globule-like state during prolonged glycation of human serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta* 1770 (2007) 933e942.
- [43] G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade, The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin, *Mol. Pharmacol.* 11 (1975) 824e832.
- [44] J.P. Tillement, R. Zini, P. d' Athis, G. Vassent, Binding of certain acidic drugs to human albumin: theoretical and practical estimation of fundamental parameters, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 7 (1974) 307e313.
- [45] A. Guerin-Dubourg, A. Catan, E. Bourdon, P. Rondeau, Structural modifications of human albumin in diabetic context, *Diabetes Metab.* (2012).
- [46] H.J. Cho, K.H. Sohn, H.M. Park, K.H. Lee, B. Choi, S. Kim, J.S. Kim, Y.K. On, M.R. Chun, H.J. Kim, J.W. Kim, S.Y. Lee, Factors affecting the interindividual variability of warfarin dose requirement in adult Korean patients, *Pharmacogenomics* 8 (2007) 329e337.
- [47] D.E. Jonas, H.L. McLeod, Genetic and clinical factors relating to warfarin dosing, *Trends Pharmacol. Sci.* 30 (2009) 375e386.
- [48] X.M. He, D.C. Carter, Atomic structure and chemistry of human serum albumin, *Nature* 358 (1992) 209e215.
- [49] J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, 2006.
- [50] M. Thomas, G. Nelson, G. Patonay, I. Warner, Analysis of drug binding sites on human serum albumin using multidimensional fluorescence measurements, *Spectrochim. Acta Part B: At. Spectrosc.* 43 (1988) 651e660.

1.3. Discussion

Nous avons pu mettre en évidence dans ces deux articles de nombreuses modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine au cours de la pathologie diabétique. L'originalité de ces travaux a été de travailler essentiellement sur de l'albumine modifiée *in vivo*, extraite et purifiée de plasma de patients diabétiques. Si les modifications structurales et fonctionnelles observées présentent de nombreux points communs avec des modèles couramment utilisés d'albumine glyquée *in vitro* par du glucose ou encore du MGO, nous constatons que les niveaux d'expression de ces modifications se distinguent particulièrement *in vivo*.

En effet, si nous nous concentrons sur les modifications structurales l'albumine au cours du diabète, nous constatons premièrement un niveau de glycation élevé, exprimé par les dosages des résidus amines libres et des fructosamines, mais qui reste moindre sinon équivalent comparativement aux modèles de glycation par le glucose 100 mM ou le MGO. Ceci s'explique aisément par un niveau d'imprégnation glycémique des patients diabétiques qui, même s'ils sont en situation d'hyperglycémie chronique, reste bien inférieur à des concentrations de l'ordre de 100 mM d'hexose. En revanche, à niveau de glycation équivalent, les modifications d'ordre oxydatif, exprimées par le dosage de la cystéine (thiols libres) ou le dosage des résidus carbonyles, s'expriment beaucoup plus franchement pour l'albumine glyquée *in vivo*. Ces résultats sont en faveur de modifications oxydatives plus importantes d'albumine *in vivo* liées à des processus oxydatifs plus nombreux et plus complexes.

Les modifications des structures tridimensionnelles visualisées au travers des propriétés spectrales de l'albumine sont elles aussi majeures et s'expriment de manière plus intense sur l'albumine modifiée *in vivo*, étayant un peu plus l'hypothèse de réarrangement structuraux plus nombreux et plus complexes de cette protéine *in vivo*.

L'ensemble de ces observations confirme bien que les mécanismes combinés d'hyperglycémie et de stress oxydant observés au cours du diabète sont à l'origine de la

formation de très nombreuses formes d'albumine issues des phénomènes combinés de glycation et de réarrangements oxydatifs complexes et multiples. Nous retrouvons, en effet, en plus des formes fructosamines correspondant aux formes glyquées simple du type produit d'Amadori, très certainement de nombreuses formes glycoxydées d'albumine du type AGEs.

Si les techniques classiques d'électrophorèse en gel SDS-PAGE, ne permettent pas de séparer et quantifier ces différentes formes d'albumine aux masses moléculaires proches, des techniques plus résolutive comme l'HPLC-MS/MS ou encore l'électrophorèse capillaire, peuvent être utilisées pour séparer, identifier voir même quantifier ces formes modifiées d'albumine au cours du diabète^{100,101,102}.

L'étude des modifications fonctionnelles de l'albumine au cours du diabète montre elle aussi des résultats qui distinguent clairement les formes modifiées *in vivo* des formes modifiées *in vitro*. Nous avons étudié ici deux fonctions essentielles de l'albumine à savoir sa capacité de protection contre le stress oxydant et ses propriétés de transport.

La capacité de liaison de l'albumine est très impactée au cours du diabète. Nous observons en effet une très forte diminution de la capacité totale de fixation de l'albumine d'ions bivalents comme le Cu^{2+} parallèlement à une modification de l'affinité de l'albumine pour certains médicaments qui se lient sur le site I ou II de Sudlow.

Si les modifications de la capacité de liaison de l'albumine aux médicaments était attendue car l'albumine présente des sites glycation sur ses deux sites de liaison, la baisse de la capacité de liaison d'ions bivalents comme le Cu^{2+} est beaucoup plus marquée pour les formes d'albumine modifiées *in vivo*. Cette modification est à mettre en lien avec l'importance des réarrangements oxydatifs combinés à la glycation observés au cours du diabète. La capacité de liaison aux ions bivalents est en effet reliée au niveau d'oxydation de la partie N-terminale de la protéine et aussi au niveau d'oxydation de la Cys34 de l'albumine^{70,71}.

Ne disposant pas encore de méthode directe de séparation et de quantification des formes glycoxydées d'albumine en électrophores capillaire ou en HPLC-MS/MS au laboratoire, nous nous sommes appuyés dans la suite de nos travaux sur cette perte significative de capacité de liaison aux ions bivalents, pour apprécier indirectement la quantité d'albumine au cours du diabète. Pour cela nous nous sommes inspirés des travaux de Bar-Or *et al.* qui ont précédemment mis au point une méthode de quantification de l'albumine modifiée par l'ischémie (IMA : Ischemia Modified Albumin) au cours des syndromes coronariens aigus au moyen de la mesure de la capacité de liaison du Co^{2+} à l'albumine^{69,103}.

Concernant l'étude de la capacité antioxydante de l'albumine modifiée au cours du diabète, nous observons une diminution très importante de celle-ci pour l'albumine modifiée *in vivo*. Ces résultats sont en accord avec la proportion importante des réarrangements oxydatifs également observée sur l'albumine extraite de patients diabétiques. Cette diminution peut être également reliée à la baisse de la capacité de liaison de l'albumine aux ions bivalents, puisque l'on sait qu'ils jouent un rôle central dans la génération de ROS circulants. Cette baisse de capacité antioxydante de l'albumine modifiée *in vivo* témoigne bien de l'importance des réarrangements glycoxydatifs auxquels est confrontée l'albumine au cours du diabète.

1.4. Conclusion

Les différences observées entre l'albumine modifiée *in vivo* et les modèles de glycation *in vitro* couramment utilisés confirment bien l'hypothèse que ces modèles ne sont que très partiellement représentatifs des mécanismes de réarrangement glycoxydatifs observés au cours de la pathologie diabétique.

Nous nous sommes attachés dans la deuxième partie de nos travaux à caractériser les effets cellulaires de l'albumine modifiée au cours du diabète. En effet si les formes modifiées d'albumine peuvent constituer le reflet de la pression glycoxydative au cours du diabète notre objectif a été de définir si elles présentent des effets cellulaires distinctifs et si elles

peuvent avoir par conséquent un rôle dans la physiopathologie du diabète et de ses complications cardiovasculaires dont on sait que le stress oxydant joue un rôle central.

2. EFFETS CELLULAIRES DE L'ALBUMINE MODIFIEE AU COURS DU DIABETE

2.1. Introduction

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre la production de ROS et la capacité de défense antioxydante de l'organisme^{56,57}. Le stress oxydant est aujourd'hui identifié comme un des mécanismes menant à une dysfonction endothéliale. Au cours du diabète, le stress oxydant circulant est donc considéré comme étant au cœur des mécanismes physiopathologiques des complications cardiovasculaires puisqu'il est en contact direct avec l'endothélium vasculaire¹⁰².

De nombreuses études identifient ce stress oxydant comme une cible thérapeutique privilégiée. Une diminution de ce stress au cours du diabète pourrait limiter l'apparition des complications vasculaires chroniques du diabète de type 2, c'est pourquoi de nombreuses travaux portent aujourd'hui sur l'utilisation de molécules antioxydantes comme thérapeutiques adjudantes à la prise en charge habituelle des patients diabétiques de type 2⁶⁶.

L'albumine constitue une des principales défenses contre le stress oxydant circulant. Précédemment, nous avons pu montrer qu'au cours du diabète, l'albumine subit des modifications glycoxydatives avec formation de formes avancées de glycation. Ces formes modifiées d'albumine ont également une capacité de défense antioxydante fortement diminuée ce qui les place de façon indirecte dans les processus physiopathologiques menant à une dysfonction endothéliale puis à des complications chroniques cardiovasculaires^{98,99,63}.

L'objectif de l'étude suivante a été d'identifier si ces formes modifiées d'albumine au cours du diabète présentaient également des effets sur des cultures cellulaires d'adipocytes et de macrophages. Ces cellules, impliquées dans la physiopathologie du diabète et de ses complications sont connues pour réagir en présence d'AGEs via une réponse inflammatoire régulée par le récepteur RAGE¹⁰⁴. Là encore, nous avons comparé les effets cellulaires

observés en présence d'albumine modifiée *in vivo* au cours du diabète de type 2 à ceux produits par des formes d'albumines humaines de patients non diabétiques modifiées ou non *in vitro*.

2.2. Résultats

Article 3: New insights into deleterious impacts of *in vivo* glycation on albumin antioxidant activities. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013 ; 1830 : 3342-3351. **J. Baraka-Vidot, A. Guerin-Dubourg, F. Dubois, B. Payet, E. Bourdon, P. Rondeau.**



New insights into deleterious impacts of in vivo glycation on albumin antioxidant activities



Jennifer Baraka-Vidot^a, Alexis Guerin-Dubourg^{a,b}, Fanny Dubois^a, Bertrand Payet^c, Emmanuel Bourdon^a, Philippe Rondeau^{a,*}

^a Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO), Structure fédérative Environnement Biodiversité Santé-FED4126, Université de La Réunion, Plateforme CYROI, Saint Denis de La Réunion, France

^b Unité fonctionnelle de recherche biochimie, Centre Hospitalier Universitaire Félix Guyon, Saint Denis de La Réunion, France

^c Laboratoire de chimie des substances naturelles et sciences des aliments, Université de La Réunion, Saint Denis de La Réunion, France

article info

Article history:

Received 16 December 2012

Received in revised form 17 January 2013

Accepted 18 January 2013

Available online 31 January 2013

Keywords:

Albumin

Glycation

Advanced glycation end-products

Diabetes

Antioxidant

Inflammation

abstract

Background: Albumin constitutes the most abundant circulating antioxidant and prevents oxidative damages. However, in diabetes, this plasmatic protein is exposed to several oxidative modifications, which impact on albumin antioxidant properties.

Methods: Most studies dealing on albumin antioxidant activities were conducted on in vitro modified protein. Here we tried to decipher whether reduced antioxidant properties of albumin could be evidenced in vivo. For this, we compared the antioxidant properties of albumin purified from diabetic patients to in vitro models of glycated albumin.

Results: Both in vivo and in vitro glycated albumins displayed impaired antioxidant activities in the free radical-induced hemolysis test. Surprisingly, the ORAC method (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) showed an enhanced antioxidant activity for glycated albumin. Faced with this paradox, we investigated antioxidant and anti-inflammatory activities of our albumin preparations on cultured cells (macrophages and adipocytes). Reduced cellular metabolism and enhanced intracellular oxidative stress were measured in cells treated with albumin from diabetics. NF- κ B-mediated gene induction was higher in macrophages treated with both type of glycated albumin compared with cells treated with native albumin. Anti-inflammatory activity of native albumin is significantly impaired after in vitro glycation and albumin purified from diabetics significantly enhanced IL6 secretion by adipocytes. Expression of receptor for advanced glycation products is significantly enhanced in glycated albumin-treated cells.

Conclusions and general significance: Our results bring new evidences on the deleterious impairments of albumin important functions after glycation and emphasize the importance of in vivo model of glycation in studies related to diabetes pathology.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Free radicals are essential to the physiological control of living organisms [1]. But at high concentrations, free radicals become hazardous and lead to damages in all major biological constituents [2]. Oxidative damages are frequently observed in numerous states of diseases. Oxidative stress occurs when reactive oxygen species (ROS) production overpass antioxidant defenses. Antioxidants can either be of exogenous origin, such as active molecules present in foods or endogenously produced by

our body and contribute to maintain the intracellular redox homeostasis. Among endogenous antioxidants, albumin represents a very abundant and important circulating antioxidant in plasma [3,4], a body compartment known to be exposed to continuous oxidative stress [5]. But in particular in vivo situation, albumin can incur some damage that affects its antioxidant properties [6,7]. These modifications could occur in diabetes mellitus which is one of the pathological conditions associated with early occurrence of vascular complications, together with functional alterations of albumin [8]. In this complex pathology, albumin undergoes increased glycation. This phenomenon corresponds to the non-enzymatic attachment of a glucose molecule to a free primary amine residue. Amadori rearrangement of the glycated protein gives rise to the deleterious advanced glycation end products (AGEs) [9]. It is now very well established that interaction of AGEs with their receptors (RAGE) induces several cellular phenomena potentially relating to diabetic complications [10,11]. Many study have evidenced an AGEs-mediated inflammatory responses in circulating cells involving up-regulating multiple signaling

Abbreviations: AGE, advanced glycation end-products; HSA, human serum albumin; HSA-ND and HSA-D, purified human serum albumin from non-diabetic and diabetic patients, respectively; HbA_{1c}, glycated hemoglobin level; PBS, phosphate-buffered saline

* Corresponding author at: GEICO-Université de La Réunion 15, avenue René Cassin, BP 7151-97715 Saint Denis Messag Cedex 09, La Réunion, France. Tel.: + 33 262 93 86 48; fax: + 33 262 93 82 37.

E-mail address: rophil@univ-reunion.fr (P. Rondeau).

pathways via RAGE [12,13]. These studies generally use glycated albumin as the source of AGEs. If plethora of studies focuses on AGE–cell interactions, very few try to elucidate the impact of in vivo glycation phenomenon on albumin antioxidant activities.

Here, for the first time and by using several complementary biological tests, we investigated whether in vitro or in vivo glycation of human serum albumin (HSA) might alter its antioxidant properties in cellular and in non cellular assays.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Human SW872 liposarcoma cells were purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD). Mouse macrophage RAW-Blue cells were purchased from InvivoGen (San Diego). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose, fetal bovine serum (FBS) and all medium nutrients were purchased from PAN Biotech GmbH (Aidenbach).

The rabbit polyclonal anti human RAGE antibody, methylglyoxal solutions (40% aq.), D-glucose, 2, 2'-azobis (2-methylimidinopropane) or AAPH (440914), fluorescein, p-nitrophenyl-phosphate (PNPP), dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), were all provided from Sigma-Aldrich.

2.2. Patient's recruitment

Plasma samples were obtained from thirty nine diabetic patients (% HbA_{1c} = 11.0 ± 1.9) and another pool was from fourteen non-diabetic subject (% HbA_{1c} = 5.5 ± 0.4) at the Biochemistry laboratory of the Centre Hospitalier Universitaire (CHU, Saint-Denis, La Réunion). Diabetic panel included DID (n = 6) and DNID (n = 33) patients with a diagnosis established for more than one year. All diabetic patients followed an antidiabetic treatment. The procedures and the collection of human materials were approved by the local governmental French Ethical Committee. Patients with a hemoglobin abnormality and/or hyperleukocytosis, acute coronary syndrome, renal failure, infectious or inflammatory syndrome were excluded. All biological data related to both pools are given in Table S1 (Supplementary data).

2.3. Human albumin preparations

The purification of serum albumin from fresh human plasma was based on extensive dialysis against 50 mM-Tris/HCl, pH 7.4, followed by affinity chromatography using Cibacron Blue 3G linked to agarose (Amersham cat# 17-0948-01) as a ligand for the albumin. A 1.5 M NaCl, pH 7.4 buffer was used for the desorption of bound albumin from Cibacron Blue-agarose following the elution of other plasmatic proteins with a 50 mM-Tris/HCl, pH 7.4 buffer. Each fraction of eluate was examined by gel electrophoresis and the most purified and concentrated extracts were pooled before the remaining immunoglobulins were removed with sepharose-protein A, followed by extensive dialysis against PBS and then storage at -80 °C. Advanced glycation end products (AGE) were prepared as previously described [14] by incubating 0.37 mM commercial human serum albumin (HSA-C) and purified HSA from a non-diabetic pool (HSA-ND) without and with glucose (25 mM and 100 mM) in PBS, pH 7.4, under sterile conditions, at 37 °C for 3 weeks, or with methylglyoxal (10 mM) for 2 days. The proteins were dialysed against PBS, sterile-filtered through a 0.2 µm Millipore filter and stored at -80 °C.

2.4. Biochemical characterization of human albumin preparations

Fructosamine was determined using the method developed by Johnson et al. [15] using the nitroblue tetrazolium (NBT) reagent. The protocol was described in a previous study from our group [16]. The

results are expressed as mmol/L of 1-deoxy-1-morpholinofructose (DMF), which is a synthetic ketoamine used as a primary standard.

TNBS (2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid) assay allows the quantification of primary free amino groups in proteins [17]. This method was described in detail in a previous study by our group [18]. Various concentrations of L-glycine (10 to 200 nmol) were used to define the standard curve.

Thiol groups in native or modified albumin were measured by Ellman's assay using 5, 5'-dithiobis, 2-nitrobenzoic acid (DTNB) [19] as described previously [20]. A standard curve was performed using various concentrations of L-cysteine (10 to 100 nmol) (Sigma). The content of thiol groups for HSA sample was measured in duplicate on two different quantities of BSA by reading the absorbance at 412 nm. Results are expressed as the number of free SH groups per mol of HSA.

Protein carbonylation was determined by the carbonyl ELISA assay based on the recognition of protein-bound DNPH in carbonylated proteins with an anti-DNP antibody. This method was described in detail in previous studies [18,21].

AGE-related modifications were determined by the measure of glycochore [14,22] and tryptophan fluorescence [23]. The fluorescence spectra were carried out on Horiba Scientific Fluoromax-4 spectrometer. The formation of glycochore was monitored at 355 nm excitation wavelength and in 360–600 nm emission range. The results were expressed as %increase of glycochore level and calculated as follow:

$$\% \text{Glycochore increase} = \frac{(F_1 - F_0)}{(F_0)} * 100$$

where F₀ is the maximum fluorescence of HSA-ND_{G0} and F₁ is the maximum fluorescence of in vitro or in vivo glycated albumin.

Tryptophan emission spectra were obtained in the range of 280–430 nm emission wavelength range after excitation at 270 nm [24,25].

2.5. Mass spectroscopic analysis

All mass spectroscopic measurements were performed at the Molecular Biophysics Unit (MBU) of the Indian Institute of Science (Bangalore, India). Average molecular weights of both glycated albumin samples were determined by electrospray ionization mass spectrometry (ESI/MS). ESI/MS was performed on Agilent 1100 LC coupled to Bruker Esquire3000plus operating in positive ion mode. Complete ESI/MS settings were: high voltage capillary, 4000 V; high voltage end plate offset, -500 V; nebulizer gas pressure, 28 psi; dry gas flow rate, 7.00 l/min; dry gas temperature, 340 °C and capillary exit, 196.0 V; Trap Drive, 120.6. Mass spectra were processed by using deconvolution algorithm in order to reveal peaks with apparent m/z ration for main components.

2.6. Red blood cell hemolysis test

The antioxidant properties of modified albumins were examined with the free radical-induced blood hemolysis test [26]. Human blood samples were obtained from the Biochemistry department of the local hospital center (CHU Felix Guyon) and were taken on EDTA substrate as anticoagulant. Then plasma was removed and erythrocytes were washed with an isotonic solution (NaCl 0.15 M). Each well of a 96 well-plate was filled with 100 µl (about 1.10⁸ erythrocytes, 400,000 cells/µl final concentration) of diluted solution of red blood (1/10 in 0.15 M NaCl). Different albumin samples (10 µM final concentration) were added in triplicates. Hemolyses were started by adding 0.45 M of AAPH in each well. Turbidimetry at 450 nm was recorded in every 10 min using a 37 °C-thermostated microplate reader. Results were expressed as 50% of maximal hemolysis time (HT₅₀ in min) which represents the total defense against free radicals in human and animal models submitted to oxidative stress [27].

2.7. ORAC test

The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) developed by Ou et al. [28] assay has been widely accepted as a standard tool to measure the antioxidant activity in the nutraceutical, pharmaceutical, and food industries [29]. The ORAC assay using fluorescein as the fluorescent probe measures the antioxidant capacity of samples to protect fluorescein from AAPH-induced oxidative damage. The automated ORAC assay was carried out on an Infinite M200 pro spectrofluorometric analyzer (TECAN) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. The reaction was carried out in phosphate buffer (75 mM, pH 7.4) containing each albumin sample (25 μ l) in six replicates and fluorescein solution (80 nM, 150 μ l). Trolox solutions at different concentration (6–50 μ M) were used as calibration standards. The fluorescence kinetic of fluorescein was followed for 1 h at 37 °C after adding automatically AAPH solution (150 mM, 25 μ l) in each well. The fluorescence was recorded every 2 min. Antioxidant curves (fluorescence vs. time) were first normalized to the curve of the blank (phosphate buffer instead of samples or trolox). Then the area under the fluorescence decay curve (AUC) was determinate. The antioxidant activity (ORAC value) of samples was calculated by using trolox calibration standards as follow:

$$\text{ORACvalue} = \frac{(\text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}})}{(\text{AUC}_{\text{trolox}(50\mu\text{M})} - \text{AUC}_{\text{blank}})} * ([\text{Trolox}] = [\text{Sample}]):$$

2.8. Culture of SW872 and RAW-Blue™ cells

Human SW872 liposarcoma cells were cultured in completed DMEM medium (10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 U/ml) and L-glutamine (2 mM)). Cells were grown in a 5% CO₂ incubator at 37 °C. Mouse macrophages RAW-Blue™ cells derived from RAW 264.7 were maintained in same conditions supplemented with 100 mg/ml of Zeocin (invivogen). For MTT and DCF experimentations cells were cultured 24 h in 96-well plate (10,000 cells/well) with 200 μ l DMEM containing 1% FBS and treated with modified albumin samples (20 μ M or 80 μ M) for 24 h.

2.9. MTT proliferation assay

The MTT-assay, using the standard 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sigma), was chosen to evaluate the effect of modified albumin samples (20 μ M or 80 μ M) on cell proliferation [30]. This assay is based on the cleavage of yellow tetrazolium salt MTT into purple formazan by metabolically active cells, which can be photometrically quantified. An increase in the number of living cells results in an increase in total metabolic activity, which leads to a higher color formation. After overnight of cell incubations in the presence of different reagents (treatment with H₂O₂ (500 μ M) or/and modified albumin samples (20 μ M or 80 μ M)), 20 μ l of the MTT dye (5 mg/ml) was added into each well followed by 4 h of incubation. After discarding the media, 200 μ l of DMSO was added into each well and plates were agitated in the dark for 30 min to solubilize dark blue formazan crystals. The plates were read using a microplate reader at a wavelength of 595 nm. The negative control well (medium alone with no cell and no reagent) was used for zeroing absorbance.

2.10. Hematoxylin–eosin staining

SW 872 cells were seeded on glass cover slips in 4 well plates and treated with 80 μ M of HSA samples (control cells were untreated). After 24 h of treatment, cells were fixed in p-formaldehyde 4% at room temperature for 20 min and stained with hematoxylin solution (Vector®). Cells were washed 10 times in 2% glacial acetic solution, rinsed with water and

stained by incubation with eosin solution for 7 min. Cells were imaged using a Nikon eclipse microscope and NIS-Element software (Nikon).

2.11. Determination and quantification of intracellular ROS levels

After 24 h of treatment, cells were washed twice with PBS, and incubated with 10 μ M dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) at 37 °C. After 30 min, cells were washed once with PBS, and the fluorescence intensity of the oxidized form of DCF was measured in a microplate-reader at 492 nm (excitation) and 520 nm (emission). Fluorescence values were calculated after background subtraction (using identical conditions without DCF). Intracellular generation of ROS was also evaluated by fluorescence microscopy in precultured SW872 cells on glass cover slips incubated with 10 μ M of DCF-DA at 37 °C for 1 h following by a stimulation with 80 μ M of HSA samples (HSA-ND_{G0} and HSA-ND_{MGO}) for 20 min.

2.12. NF- κ B and AP-1 activation

RAW-Blue™ cells (invivogen, France) have been stably transfected RAW 264.7 macrophages with a construct in which NF- κ B and API activations lead to the secretion of secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP). RAW-Blue™ cells were maintained in DMEM supplemented with FBS 10% and 100 mg/ml Zeocin in a 5% CO₂ incubator. RAW-Blue™ cells previously plated in 96-well plate (100,000 cells/well) were exposed to normal culture medium (FBS 1%) or treated with LPS (1 μ g/ml) or/and modified albumin samples (20 μ M or 80 μ M) at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for 24 h. After incubation, 1 · 10⁻³ M of p-nitrophenyl-phosphate (PNPP) (dissolved in 0.1 M glycine buffer containing 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, pH 10.4) was added to 40 μ l of each supernatant at 37 °C for 120 min.

PNPP + H₂O in the presence of SEAP are converted to para-nitrophenol (PNP) + Phosphate. PNP is yellow in alkaline medium and assayed to determine SEAP levels using a spectrophotometer at 460 nm.

2.13. Quantification of RAGE expression by real time q-PCR

After treatment, total RNA was extracted from cell cultures using Trizol reagent (Invitrogen). 6 μ g of RNA was reversed transcribed to cDNA using Random primers (Sigma) and Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV, Invitrogen). The cDNA was amplified by PCR on an ABI PRISM 7000 thermal cycler (Applied Biosystems, France) using the SYBR green master-mix (Eurogentec, Belgium) and specific human RAGE primers purchased from Eurogentec. Each PCR cycle was conducted for 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. RNA amounts were calculated with relative standard curves for each mRNA of interest and 18S ribosomal RNA (rRNA) gene as reference. Normalization to 18S was conducted to account for variability in quality and concentration of total RNA, and RT efficiency. The results were analyzed using ABI Prism 7000 SDS software. The primer sequences used were as follows:

18S

Forward primer: 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT-3'

Reverse primer: 5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTC-3'

RAGE

Forward primer: 5'-GCCAGAAGGTGGAGCAGTAG-3'

Reverse primer: 3'-CCAGTGGATTGAGGAGAGG-5'

2.14. Flow cytometry analysis

Cells were cultured in 6-wells plate at a density of 3 · 10⁵ cells/well with 20 μ M of glycated albumin samples or with PBS for 6 h in DMEM/FBS 1%. Cells were then washed with PBS, detached and

incubated with blocking buffer (PBS/BSA 1%) for 30 min, followed by an incubation with rabbit anti-RAGE polyclonal antibody (1: 200 dilution in PBS/BSA 1%) for 1 h and an incubation with PE-conjugated secondary IgG (Molecular Probes) for 30 min. After a last wash, SW872 cells were analyzed by flow cytometry using FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). Cells were gated for analysis based on light-scattering properties and fluorescence intensity (FL2) was assayed after counting 10,000 events. The results were expressed as the median fluorescence of labeled cells with respect to the signal obtained for control (SW872 cells incubated with PBS).

2.15. Secreted interleukin-6 quantification

The proinflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6) secreted in SW872 media after 24 h of treatment with LPS (1 µg/ml) in the presence of modified albumin samples (20 µM) was quantified using a Human IL-6 ELISA Kit (eBioscience).

2.16. Statistical analysis

Data were expressed as the means ± standard deviation (SD) from a minimum of three experiments. Statistical significances were determined using one-way ANOVA (followed by a student's test) for multiple comparisons, with a P value of less than 0.05 required for significance.

3. Results

This study was conducted on three albumin preparations reflecting different *in vitro* glycation models and compared with albumin purified from diabetic or control subjects. Two of our *in vitro* glycation preparations constitute common glycosylated albumin models and use supraphysiological concentrations of glucose (100 mM) or methylglyoxal (10 mM). The third model, which uses a pathological concentration of glucose (25 mM), is more typical of diabetic albumin. The carbonyl levels, free amino and thiol groups and fructosamine contents in the different preparations of albumin are reported in Table 1.

Significant modifications were measured especially in albumin glycosylated with supraphysiological concentrations of glucose, with MGO and also (at a lower extent) in albumin purified from diabetics in comparison with native albumin.

Similarly, enhanced REM and aggregation of high molecular bands were observed on native PAGE gel for albumin glycosylated with supraphysiological concentrations of glucose, with MGO and, at a lower extent, in albumin purified from diabetics in comparison with native albumin (Fig. S1 see supplementary data).

Fluorescence study was performed in order to monitor the formation of glycosylated albumin and the quenching of tryptophan fluorescence in albumin preparations (Fig. 1). As evident in Fig. 1a, the fluorescence spectra revealed that *in vitro* modified HSA (HSA-ND_{G25} and HSA-ND_{MGO}) undergo a decrease in the tryptophan fluorescence emission around 340 nm

(shifted up to 430 nm for HSA-ND_{MGO}). This could be attributed to alteration in albumin conformation following glucose- or methylglyoxal-induced glycation. Concerning diabetic albumin, no quenching of fluorescence is observed. AGE fluorescence in our samples is reported in Fig. 1b. For HSA-ND_{G25} and HSA-D, an increase in glycosylated albumin fluorescence is observed at 450 nm, while a shift of the maximum is evident for HSA-ND_{MGO} which exhibits two major fluorescence emissions at 392 nm and 513 nm. These data attest the increase of AGE level for *in vitro* and *in vivo* glycosylated albumins as indicated in Table 1.

Average molecular weights of main HSA samples (HSA-ND_{G0}, HSA-ND_{G25}, HSA-ND_{MGO} and HSA-D) were assessed by ESI/MS (Table 2 and Fig. S2). As expected, *in vitro* glycation of albumin with glucose or methylglyoxal induces an increase in average molecular weight of HSA. In comparison with molecular mass of native albumin (66,567 Da), HSA-ND_{G25} and HSA-ND_{MGO} exhibit the most abundant species molecular mass at respectively 66,734 Da (+ 167) and 66,733 Da (+ 166), corresponding to albumin attachment with about one glucose unit (162 Da for glucose) and three methylglyoxal units (54 Da for MGO). With an average molecular weight of 66,623 Da, the most abundant species for diabetic HSA was increased to approximately 56 Da. Moreover, *in vitro* and *in vivo* glycosylated albumins present many very high molecular mass species (above 67,000 Da) corresponding to highly modified albumin forms (Fig. S2 see supplementary data).

The antioxidant properties of these glycosylated HSA samples were first investigated using two non cellular assays. One test is based on the intrinsic capacity of albumin to protect erythrocytes from free radical-induced hemolysis. Results reported in Fig. 2a show a higher hemolysis half-time (HT₅₀) for unmodified HSA (vs. PBS control), which attests of the antioxidant capacity exerted by native albumin in this test. This protective action of native HSA is partially (−64% p<0.05 for HSA-ND_{G100}) or totally (−100% p<0.001 for HSA-ND_{MGO}) lost when the protein was *in vitro* glycosylated. A marked and significant decrease (−87% p<0.001) in albumin antioxidant properties were observed for the protein purified from diabetics (HSA-D). The second non cellular test named ORAC showed rather a strengthening of albumin antioxidant properties with glycosylation modifications (Fig. 2b). Enhanced ORAC values are about 50% for HSA-ND_{MGO} (+ 49.7% p<0.001) and around 15% for diabetic HSA (+ 15.6% p<0.001) when compared with native HSA. Secondly, actions of our different glycosylated HSA samples were investigated on cellular systems constituted by adipocytes and macrophages. The MTT assay method enables evaluation of cell proliferation by quantification of relative cellular metabolic activity.

We choose two types of cell types present in the adipose tissue exerting a determinant role in inflammation associated to diabetes/obesity disorders: adipocytes (SW872 cells line) and macrophages (RAW cell line) [14,31,32]. As observed in Fig. 3, both cellular models display different biological responses when stimulated with HSA samples. If a protective role albumin is noticed in adipocyte model, this property is not evidenced in macrophages. SW872 and RAW cells showed significant lower metabolic activity when incubated in

Table 1
Oxidative parameters in the different albumin preparations.

| Methods | Carbonyl rate increase (%control) | Free amino groups/HSA (mol/mol) | Ketoamine/HSA (mol/mol) | Thiols/HSA (mol/mol) | Glycosylated albumin fluorescence increase (%control) |
|------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------------|----------------------|---|
| HSA-ND _{G0} | 100.0 ± 7.3 | 13.3 ± 0.98 | 1.11 ± 0.12 | 0.609 ± 0.013 | 100 |
| HSA-ND _{G25} | 111.4 ± 10.8 | 12.4 ± 0.83 | 5.07 ± 0.35*** | 0.333 ± 0.067** | 249 |
| HSA-ND _{G100} | 224.8 ± 13.9 | 10.4 ± 0.20** | 12.4 ± 1.88*** | 0.286 ± 0.011*** | |
| HSA-ND _{MGO} | 455.6 ± 69.6 | 5.10 ± 0.54*** | 9.25 ± 1.46*** | 0.250 ± 0.026 | 205 & 203 |
| HSA-DG0 | 95.6 ± 3.9** | 10.4 ± 0.80* | 2.13 ± 0.58* | 0.307 ± 0.012*** | 259 |

1) Percentage carbonyl rate as assessed by the ELISA carbonyl assay; 2) primary amino group contents in proteins by the TNBS assay; 3) ketoamine levels obtained with the NBT assay; 4) free thiol group content as assessed by Ellman's method; and 5) increase of AGE level obtained by maximum glycosylated albumin fluorescence emission at excitation wavelength of 355 nm. All data are expressed as means ± SD from three independent experiments. *Effect of glycation or diabetes on purified HSA (vs. HSA-ND_{G0}). *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05.

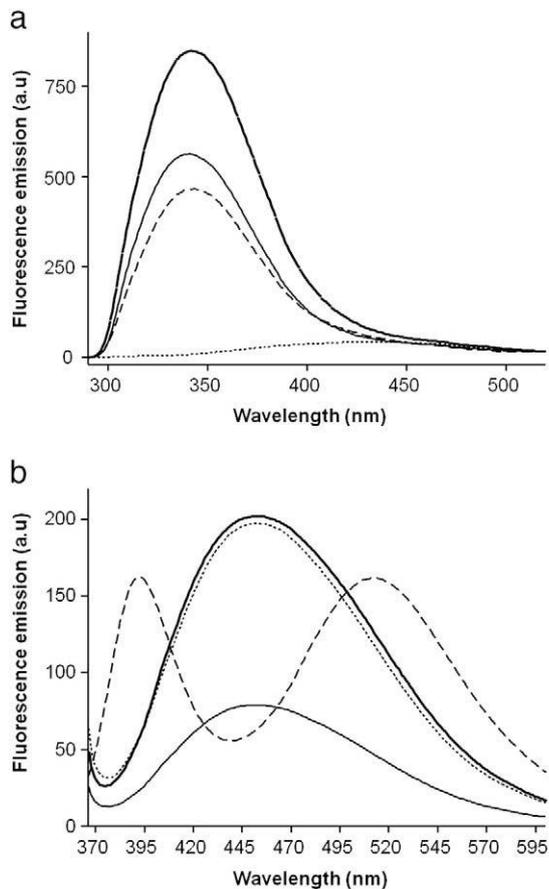


Fig. 1. a) Fluorescence spectra of tryptophan (270 nm excitation wavelength); b) Glycoprotein emission fluorescence spectra (370 nm excitation wavelength) for HSA-ND_{G0} (—), HSA-ND_{G25} (⋯), HSA-ND_{MGO} (---) and HSA-D (-·-). Fluorescence spectra of all samples are shown after data normalization according to tryptophan maximal absorption.

the presence of 80 μM diabetic albumin in comparison with cells incubated with native albumin (Fig. 3a and b). As shown in Fig. 4, MTT assay indicated also the protective role exerted by native HSA for preventing partially cellular death in the presence of H₂O₂ (250 μM or 500 μM) in both cell lines. If this beneficial role is partially lost upon *in vitro* glycooxidation, it was not significantly modified for diabetic albumin (vs native albumin) in adipocyte cells (Fig. 4b). In macrophagic cells, the protective role of albumin is altered for HSA-ND_{MGO} and for HSA-D, as well (Fig. 4a).

SW872 cell morphology appears modified when incubated in the presence of glycooxidized albumin. HSA-ND_{MGO} or HSA-D adipocytes lose their typical fibroblastic morphology (observed with HSA-ND_{G0}) and exhibit a more round shape (Fig. 4c).

Table 2
ESI mass analysis of *in vitro* and *in vivo* HSA.

| | HSA-ND _{G0} | HSA-ND _{G25} | HSA-ND _{MGO} | HSA-D |
|---|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------|
| Number of components | 6 | 13 | 16 | 9 |
| Molecular mass of major components (Da) | | | | |
| A | 66,567 | 66,734 | 66,733 | 66,623 |
| B | 66,756 | 66,910 | 66,626 | 67,901 |
| C | 66,453 | 67,007 | 66,570 | 66,557 |
| Average molecular mass (Da) | 66,679 | 66,905 | 68,065 | 66,751 |

Average molecular mass (Da) of the different preparations of HSA was obtained by ESI/MS. Number of component with the molecular masses (Da) was determined for each sample. Average molecular mass determination takes into account all the components and their respective abundances.

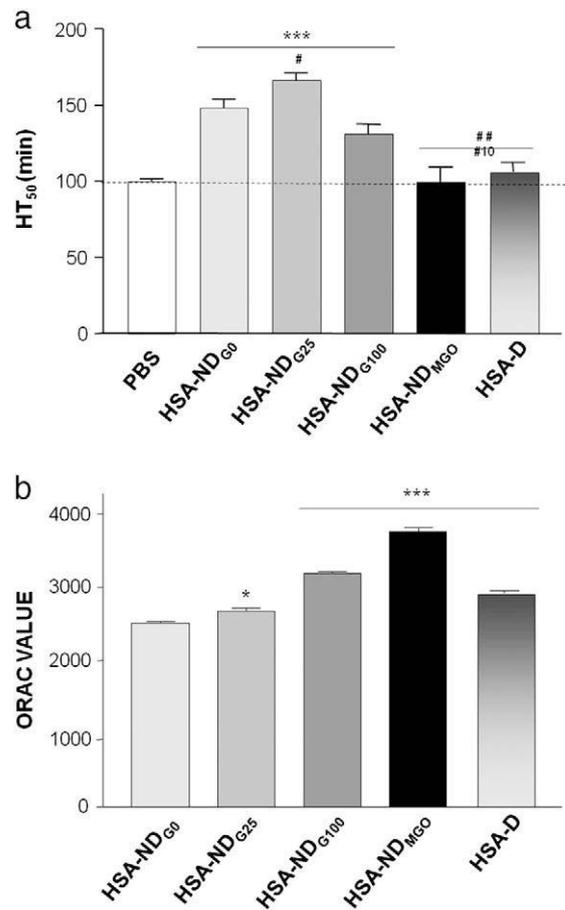


Fig. 2. Differential effect of glycooxidized albumin in two *in vitro* free radical-scavenging activity tests. a) Effect of *in vitro* or *in vivo* glycooxidation on antiradical properties of albumin was assessed by the free radical-mediated blood hemolysis test. Histograms represent half-time hemolysis (HT₅₀ in min) expressed as means \pm sd (n = 3). b) Antioxidant properties of glycooxidized albumin were assessed using the ORAC test. Histograms represent ORAC values expressed as means \pm sd (n = 6).

To assess the effect of glycooxidized albumin in intracellular free radical generation, we measured dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) fluorescence in adipocyte cells treated with 20 μM native or glycooxidized HSA. As shown in Fig. 5a, under normal conditions (with 20 μM of native HSA), SW 872 and RAW 264.7 cells exhibited lower ROS levels than control cells (PBS). Treatment with 20 μM of glycooxidized albumin for 24 h significantly increased intracellular ROS levels, this was particularly observed in adipocytes treated with HSA-ND_{G100} (+ 7.2% p b0.05 vs. HSA-ND_{G0}) and with HSA-D (+ 8.1% p b0.05 vs. HSA-ND_{G0}). This intracellular ROS increase in SW 872 incubated with 80 μM of HSA-ND_{MGO} was also observed by fluorescence microscopy (Fig. 5c). Similar increase in intracellular ROS formation is observed in macrophages treated with *in vitro* glycooxidized HSA and HSA-D (+ 18.2% p b0.05 vs. HSA-ND_{G0}) (Fig. 5b).

Because glycooxidized HSA samples stimulate intracellular ROS production, NF- κ B activation was measured in the RAW-Blue™ cell line. RAW-Blue™ cells are derived from RAW 264.7 macrophages with chromosomal integration of a secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) reporter construct inducible by NF- κ B and AP-1. As shown in Fig. 6, cell incubation in the presence of 20 μM or 80 μM glycooxidized albumins or LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) significantly induced NF- κ B activation. The most significant enhancements in NF- κ B activation were measured in cells treated with albumin glycooxidized with 100 mM of glucose and also with albumin purified from diabetics.

The impact of glycooxidation on albumin anti-inflammatory properties was also evaluated in LPS-treated cells through the SEAP assay. As shown in Fig. 7, NF- κ B activation induced by LPS was significantly reduced in

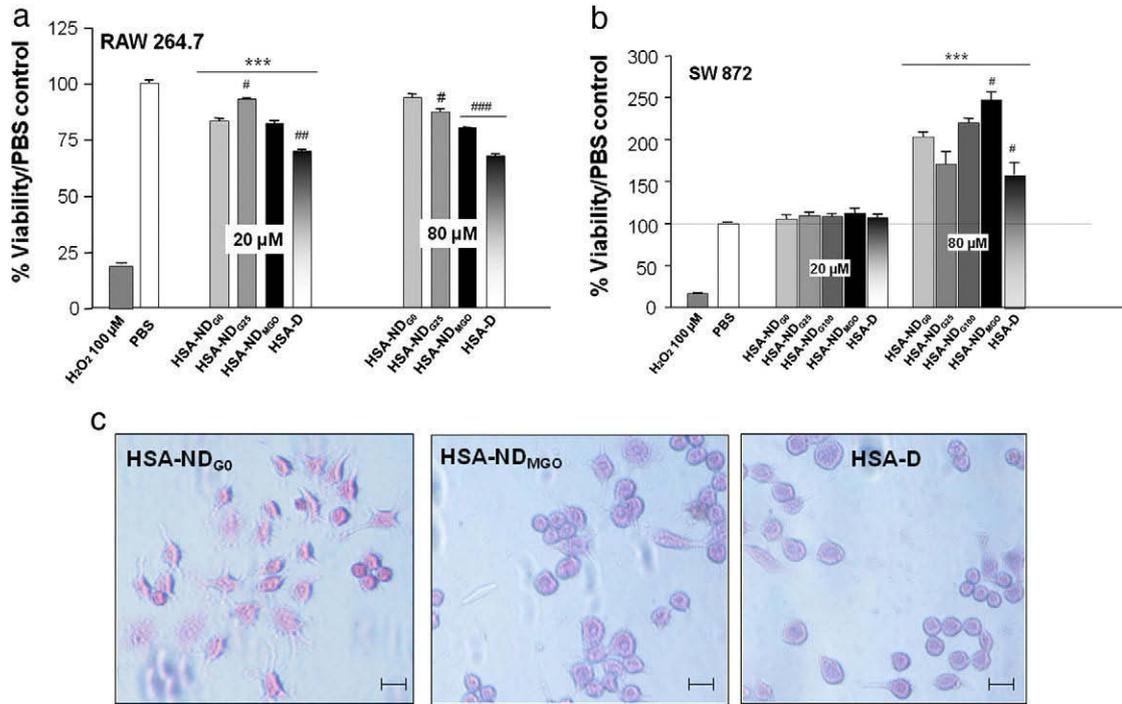


Fig. 3. Albumin from diabetics impaired cellular viability and morphology. The relative viability (%) of cells (vs. control PBS) incubated 24 h with 20 μM or 80 μM of HSA-ND, HSA-AGEs or HSA-D was determined by MTT assay. a) in RAW 264.7 macrophage cells; b) in SW 872 adipocyte cells; c) H&E staining of a 70% confluence culture of SW 872 incubated with 80 μM of HSA-ND, HSA-ND_{MGO} or HSA-D. Scale bars correspond to 20 μm.

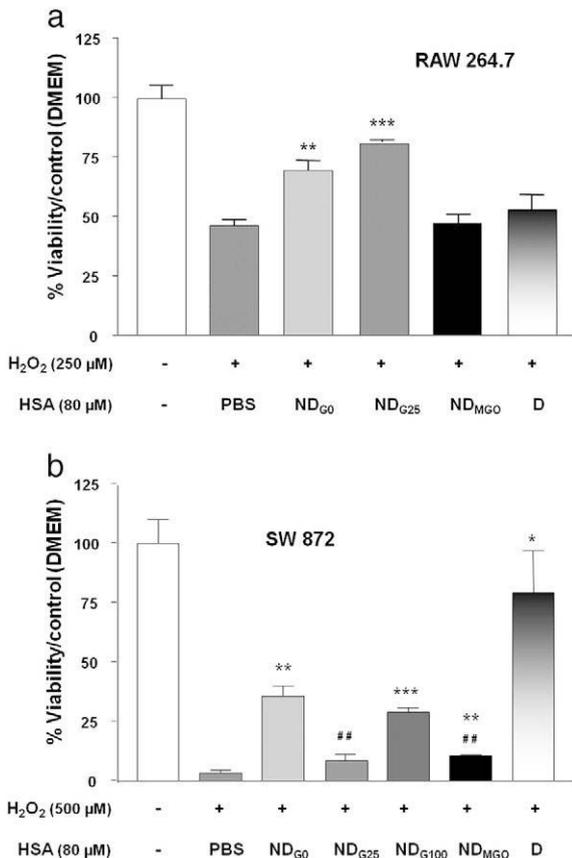


Fig. 4. Impaired protective action of albumin after glycation. The relative viability (%) of cells (vs. control DMEM w/o H₂O₂) incubated 24 h with 80 μM of HSA samples in presence of H₂O₂ (250 μM or 500 μM) was determined by MTT assay. a) in RAW 264.7 cells; b) in SW 872 cells.

RAW-Blue™ cells incubated with 20 μM of native albumin (-24% p 0.05 vs. LPS control), evidencing the protective anti-inflammatory property of the protein. As previously observed in the red blood hemolysis test, this protective effect is progressively lost after in vitro albumin glycation. In our experimental conditions (20 μM HSA) albumin purified from diabetics do not show significant modification on LPS-induced NFκB induction. But both in vitro glycated albumin and albumin purified from diabetics exert significant enhancement in LPS-induced IL-6 secretions by cells (Fig. 8).

The previous data revealed an inflammatory effect of glycated HSA involving NFκB transcription factor. The possible role of RAGE in inflammatory response of SW 872 upon derived HSA-AGE stimulation was investigated through its gene expression by real time PCR and its cell surface protein expression by flow cytometry.

As shown in Fig. 9a, RAGE gene expression is significantly enhanced in adipocytes incubated with diabetic albumin (+ 193% vs. HSA-ND₀, p 0.05). To our knowledge, RAGE expression at the surface of liposarcoma SW 872 cells has never been reported before.

Regarding RAGE protein expression determined by FACS, typical dot-plot graphs for different modified-HSA treated SW 872 cells and corresponding median RAGE fluorescence values are reported in Fig. 9b and c, respectively. If after 24 h treatment in the presence of HSA-ND₂₅, the percentage of cells which expressed RAGE did not vary significantly compared to native albumin condition, the corresponding overall events exhibit a significant higher median fluorescence value (+ 20% vs. HSA-ND₀, p 0.05). In contrast, the majority of SW 872 treated with HSA-ND_{MGO} bound RAGE antibody on their surface thereby attesting a high expression of this receptor in this condition. This elevated expression is confirmed by the corresponding median fluorescence value which is 4-times higher in comparison with other albumin conditions (Fig. 9c).

4. Discussions

Albumin is the major antioxidant and the most abundant protein in the circulatory system (for comprehensible reviews on albumin

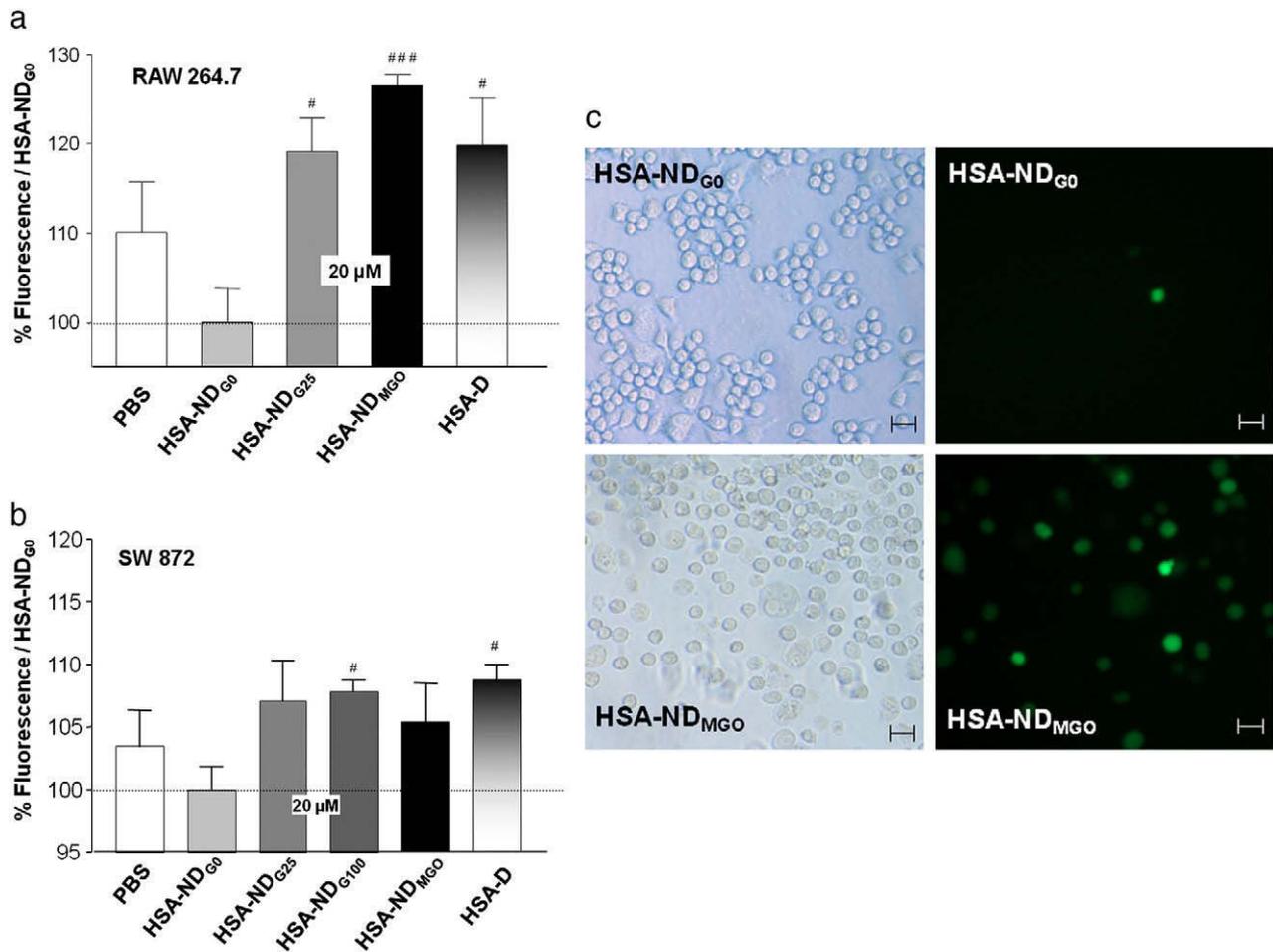


Fig. 5. Albumin from diabetics enhanced intracellular oxidative stress. Intracellular ROS production in macrophages and adipocyte cells was determined by DCF fluorescence assay. The relative increase (%) of DCF fluorescence (vs. HSA-ND_{G0}) was determined for cells incubated 24 h with 20 μM of HSA-ND, HSA-AGEs or HSA-D. Data are expressed as mean ± sd (n = 6). a) in RAW 264.7 cells; b) in SW 872 cells; c) fluorescence of DCF produced by SW 872 in the presence of HSA-ND_{MGO} (80 μM for 20 min) and captured by fluorescence microscopy. Scale bars correspond to 20 μm.

structure–function relationships: [3,4]). The high lysine and arginine residue contents in albumin primary structure make the protein a high potential target for glycooxidation. Most studies have rather focused on the biological impact of albumin derived AGE than the glycation effect on the intrinsic antioxidant or anti-inflammatory properties of the plasmatic protein. This study was undertaken to

investigate and discuss the potential impairment of antioxidant properties of human albumin after in vitro and in vivo glycation.

Previous results, just based on the red blood hemolysis test have reported a strengthening of radical trapping capacities in bovine serum albumin glycated with glucose [8,14,18] whereas an impairment of these properties was noticed upon aggregation process [33]. In the present study using the same assay, supraphathological conditions of glucose or methylglyoxal induce the lost of albumin antioxidant properties, which could be partially relied to the aggregative state induced by the protein glycation process. Faure et al. have already reported deleterious effects of methylglyoxal on bovine albumin [34]. This impairment is also associated with the redox state of the only one reduced cysteine (Cys-34) which is prone to oxidation upon glycation process and is able to scavenge hydroxyl radicals [35]. If in vivo diabetic albumin is similarly affected, its equivalent in vitro model has rather a more marked antiradical property. Conclusion arising from this first set of data is that the red hemolysis test is not sufficient to assess the overall antioxidant action of the protein. The oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) method, which is considered as a standard tool in the measurement of antioxidant activity in nutraceutical, pharmaceutical, and food areas [29], gives contrary results. According to the data obtained by this method, glycation process influences positively the antioxidant activity of albumin, for in vitro and in vivo models, as well. These conflicting results obtained by these methods based also on the free radical theory suggested that the scavenging properties of albumin depend not only on the redox status of Cys-34, but also on the structural conformation of the protein. The conformational structure of glycated HSA revealed

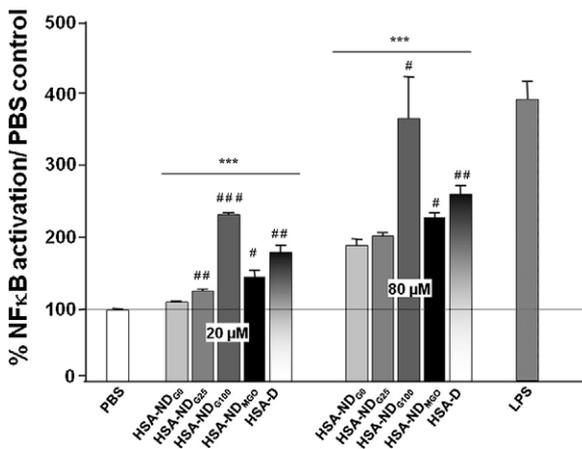


Fig. 6. Albumin from diabetics enhanced NFκB activation. NFκB activation was determined in RAW-Blue cells after 24 h of incubation with 20 μM or 80 μM of HSA-ND, HSA-AGEs or HSA-D. Data are presented as % control (PBS) and are expressed as mean ± sd (n = 3).

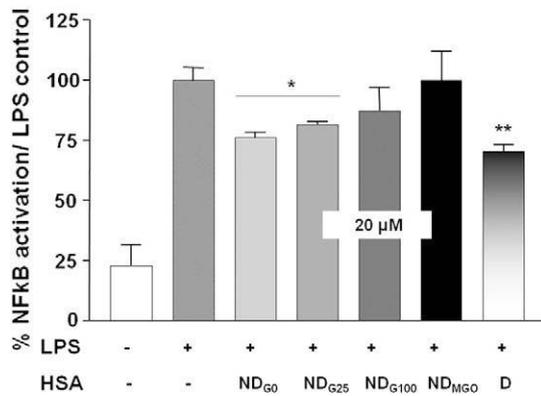


Fig. 7. Impaired anti-inflammatory activity of albumin after glycation. NFκB activation was measured in RAW-Blue cells after a 24 h incubation with LPS (1 μg/ml) plus 20 μM of HSA-ND, HSA-AGEs or HSA-D. Data is presented as %control (with only LPS) and are expressed as mean ± sd (n = 3).

specific amino acids, previously buried in native conformation, which can improve the free radicals trapping capacity of the protein as assayed in ORAC test. However, the antagonist results showed by ORAC method seem to be in accordance with previous studies which have reported an involvement of Maillard products in the increase in antioxidant activity in many food systems [36–38]. Nevertheless, the paradoxical results raised the question of the clinical relevance of the ORAC method. It is necessary to perform cellular assays, such as viability test to get more information on how antioxidant activity of albumin is impacted.

Through MTT assay, it is well established that albumin contributes to the metabolic activity of SW872 cells deprived of SVF and also protects against H₂O₂ deleterious effect. This enhanced metabolic activity observed for some glycation models, should not be considered as a protective action of glycation. Indeed, the MTT assay also evidenced a lost of protective effect of albumin upon in vitro glycation. The oxidative stress induced by some glycation models which trigger the cellular metabolic activity could explain this increase of cell viability. This hypothesis is comforted by the simultaneous intracellular oxidative stress and metabolic activity enhancements observed in cells incubated in the presence of HSA_{G100}.

Several studies have reported that glycation products are related to the increase of systemic levels of inflammatory mediators such as TNF-α or IL-6 [39,40]. The inflammatory response of these cytokines mediated through the activation of the transcription factors NF-κB and AP-1, support the clinical relevance of the involvement of AGE in many pathological processes. Here, the SEAP activity induced in RAW-Blue™ cells clearly show that albumin can prevent from NF-κB activation

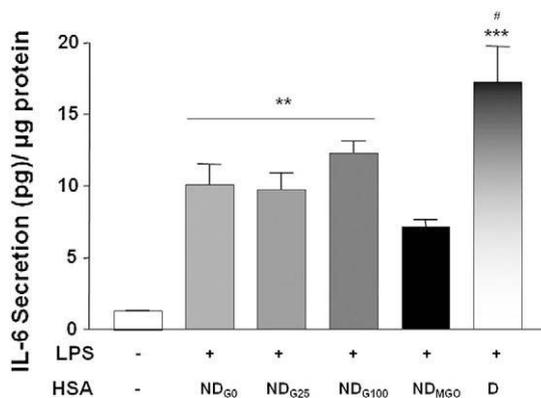


Fig. 8. Albumin from diabetics enhanced IL6 secretion by adipocytes. IL6 secretion was measured in SW872 cells after 24 h incubation with LPS (1 μg/ml) plus 20 μM of HSA-ND, HSA-AGEs or HSA-D. Data is presented as %control (with only LPS) and are expressed as mean ± sd (n = 3).

induced by LPS and this protective role seems to be affected upon glycation. On one hand, supraphysiological glycation models and diabetic albumin could induce an activation of NF-κB quite similar to LPS, on the other hand and contrary to native albumin, these same in vitro models could not hold down the inflammation induced by LPS. These data are in accordance with the increased intracellular oxidative stress observed previously and support the idea that albumin AGE could upregulate cellular inflammation through the ROS pathway and the activation of NF-κB and AP-1 [41]. It is important to notice that in vivo diabetic albumin is the only glycation model which does not exhibit paradoxical results. Indeed, with the lowest antioxidant activities determined by red blood cells and ORAC tests, in vivo glycation of HSA induces a decrease of cell viability associated with an increase of oxidative stress and a NF-κB activation. Such deleterious impairments in albumin important functions after in vivo glycation, emphasizes the importance of in vivo model of glycation in studies related to diabetes pathology. Indeed, most of the available in vitro studies on the biological effects of glycation models, which do not reflect the physiopathology of a hyperglycemic situation. In order to obtain significant cellular responses, glycation models have been obtained by incubating albumin with an excessive amount of glucose (up to 1 M) beyond the physiological (5 mM) and pathological (25 mM) concentrations, which can be encountered in a normal subject or diabetic patients, respectively. For instance, Stolzing et al. focused on the ability of microglial cells to degrade extracellular AGE modified albumin prepared with 1 M of glucose [42]. In addition, the majority of the literature in this area reports the use of bovine serum albumin instead of the human form in an in vitro model of glycation. A recent comparative study reported the differential biological responses of monocyte cell lines treated with in vitro glycation models derived from both BSA and HSA [14]. In that particular study, glycation of BSA appeared to enhance proteolytic activities in THP-1 cells, whereas glycation of HSA induced an inhibition of these proteolytic activities.

Many studies dealing on cell activation by RAGE have employed albumin highly modified by AGEs (30–40 modified groups per protein). Proteins modified so highly are rarely found in tissues and body fluids in vivo [43].

In the present study, impaired anti-oxidant and anti-inflammatory properties were observed in albumin purified from diabetics in two different cellular models: adipocyte (SW872) and monocyte (RAW) cell lines. RAGE expression at the surface of liposarcoma SW872 cells has never been reported before. Here and for the first time, an enhanced expression of RAGE receptor was evidenced in both SW872 and RAW cells incubated with albumin purified from diabetics in comparison with cells treated with the protein purified from controls.

In conclusion, our results clearly highlight strong differences between in vitro and in vivo models of glycation evidenced by the differential impact of glycation in the antioxidant and anti-inflammatory properties of albumin. Importantly and for the first time very detrimental effects were evidenced for the in vivo glycation model of albumin contributing to the concept that oxidized form of the protein may act as a biomarker of oxidative stress in diabetes. Further studies are highly warranted to reach a better understanding of the impact of in vivo oxidative modification on albumin properties.

Author contributions

J.B.V. researched data, contributed to the discussion, and reviewed the manuscript.

A.G.D. researched data, contributed to the discussion, and reviewed manuscript.

F.D. researched data and reviewed the manuscript.

B.P. researched data and reviewed the manuscript.

E.B. contributed to the discussion, and reviewed and edited manuscript.

P.R. researched data, and wrote, reviewed and edited manuscript.

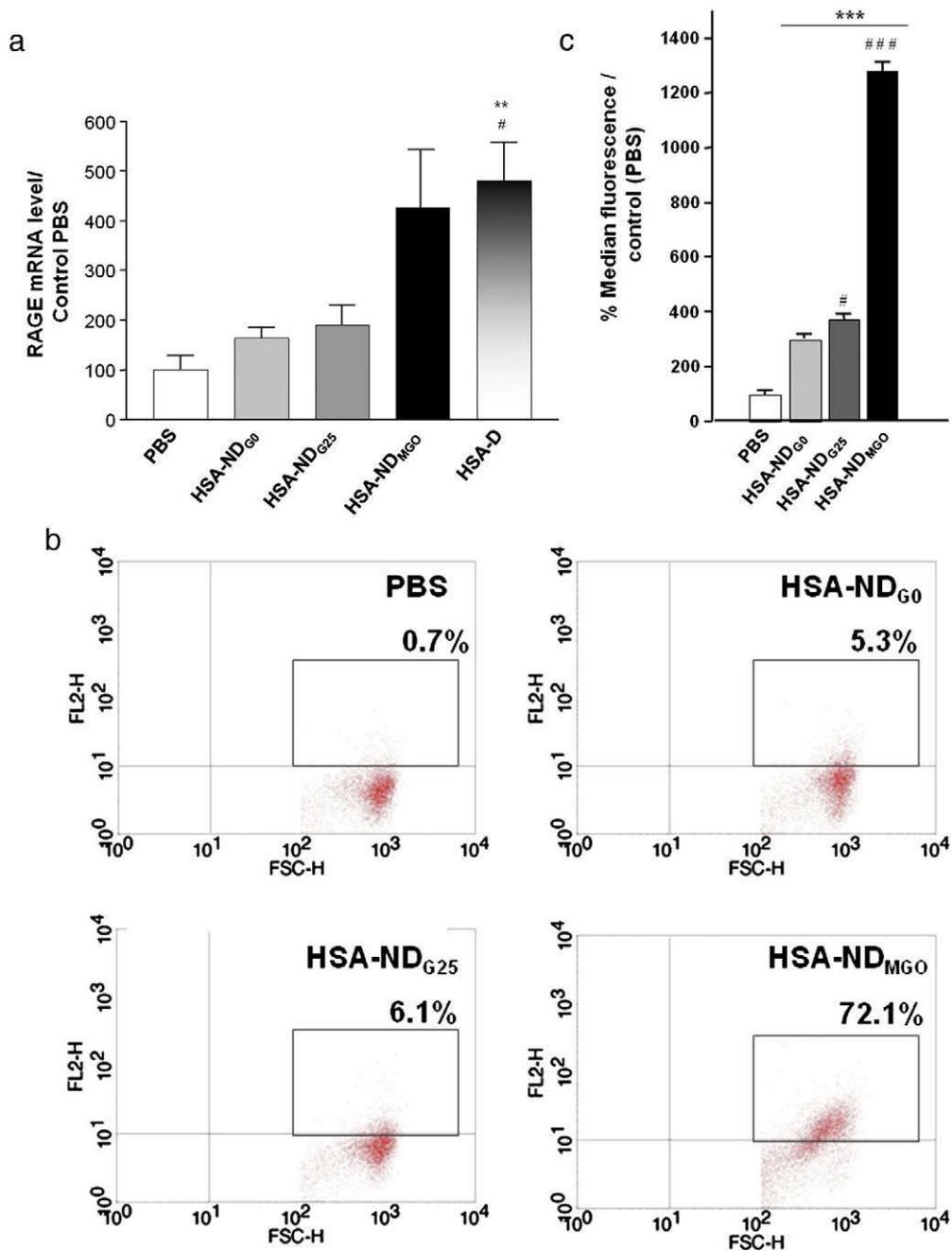


Fig. 9. RAGE signaling in inflammation pathway of glycoxidized HSA. a) RAGE mRNA expression levels determined by real time q-PCR; b) RAGE cellular surface expression induced by PBS, HSA-ND_{G0}, HSA-ND_{G25} and HSA-ND_{MGO} in SW872 cells. SW 872 cells are identified as events labeled with RAGE in a dot plot of FL2 vs. SSC; c) Relative quantification median fluorescence of RAGE surface expression determined by FACS. Data is presented as %control (PBS) and are expressed as mean \pm sd (n = 3).

Acknowledgements

This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Ministère de l'Outre-Mer, the Conseil Régional de La Réunion, the Université de La Réunion and l'Europe. JBV is supported by a fellowship from the Conseil Régional de La Réunion and l'Europe. Special thanks to A. September-Malaterre for her help and excellent expertise on the ORAC method.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.01.019>.

References

- [1] W. Droge, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 47–95.
- [2] H. Sies, Oxidative stress: from basic research to clinical application, *Am. J. Med.* 91 (1991) 31S–38S.
- [3] T.J. Peters, *All About Albumin – Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Academic Press, San Diego, 1996.
- [4] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, Human serum albumin: from bench to bedside, *Mol. Aspects Med.* 33 (2012) 209–290.
- [5] B. Halliwell, Albumin—an important extracellular antioxidant? *Biochem. Pharmacol.* 37 (1988) 569–571.
- [6] P. Atukeren, S. Aydin, E. Uslu, M.K. Gumustas, U. Cakatay, Redox homeostasis of albumin in relation to alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 3 (2010) 206–213.
- [7] M. Roche, P. Rondeau, N.R. Singh, E. Tarnus, E. Bourdon, The antioxidant properties of serum albumin, *FEBS Lett.* 582 (2008) 1783–1787.

- [8] E. Bourdon, N. Loreau, D. Blache, Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin, *FASEB J.* 13 (1999) 233–244.
- [9] P. Rondeau, E. Bourdon, The glycation of albumin: structural and functional impacts, *Biochimie* 93 (2011) 645–658.
- [10] S. Horiuchi, Y. Sakamoto, M. Sakai, Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins, *Amino Acids* 25 (2003) 283–292.
- [11] N. Shanmugam, Y.S. Kim, L. Lanting, R. Natarajan, Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 34834–34844.
- [12] H. Vlassara, The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 17 (2001) 436–443.
- [13] S.F. Yan, R. Ramasamy, Y. Naka, A.M. Schmidt, Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond, *Circ. Res.* 93 (2003) 1159–1169.
- [14] P. Rondeau, N. Singh, H. Caillens, E. Bourdon, Oxidative stresses induced by glycated human or bovine serum albumins on human monocytes, *Free Radic. Biol. Med.* 45 (2008) 799–812.
- [15] R.N. Johnson, P.A. Metcalf, J.R. Baker, Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control, *Clin. Chim. Acta* 127 (1983) 87–95.
- [16] A. Guerin-Dubourg, A. Catan, E. Bourdon, P. Rondeau, Structural modifications of human albumin in diabetic context, *Diabetes Metab.* 38 (2012) 171–178.
- [17] S.L. Snyder, P.Z. Sobocinski, An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines, *Anal. Biochem.* 64 (1975) 284–288.
- [18] P. Rondeau, G. Navarra, F. Cacciabardo, M. Leone, E. Bourdon, V. Militello, Thermal aggregation of glycated bovine serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta Protein Proteomics* 1804 (2010) 789–798.
- [19] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70–77.
- [20] S. Chesne, P. Rondeau, S. Armenta, E. Bourdon, Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine serum albumin on its structure and on cultured adipose cells, *Biochimie* 10 (2006) 1467–1477.
- [21] D. Ramful, E. Tarnus, P. Rondeau, C. Robert Da Silva, T. Bahorun, E. Bourdon, Citrus fruit extracts reduce advanced glycation end products (AGEs)- and H₂O₂-induced oxidative stress in human adipocytes, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 11119–11129.
- [22] T. Ogino, S. Okada, Oxidative damage of bovine serum albumin and other enzyme proteins by iron–chelate complexes, *Biochim. Biophys. Acta* 1245 (1995) 359–365.
- [23] M. Brownlee, H. Vlassara, A. Cerami, Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications, *Ann. Intern. Med.* 101 (1984) 527–537.
- [24] V. Vetri, V. Militello, Thermal induced conformational changes involved in the aggregation pathways of beta-lactoglobulin, *Biophys. Chem.* 113 (2005) 83–91.
- [25] V. Militello, V. Vetri, M. Leone, Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin, *Biophys. Chem.* 105 (2003) 133–141.
- [26] M. Prost, Process for the Determination by Means of Free Radicals of the Antioxidant Properties of a Living Organism or a Potentially Aggressive Agents, U.S. Patent 5,135,850, 1992. (USA).
- [27] F. Girodon, D. Blache, A.L. Monget, M. Lombart, P. Brunet-Lecompte, J. Arnaud, M.J. Richard, P. Galan, Effect of a two-year supplementation with low doses of antioxidant vitamins and/or minerals in elderly subjects on levels of nutrients and antioxidant defense parameters, *J. Am. Coll. Nutr.* 16 (1997) 357–365.
- [28] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R.L. Prior, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4619–4626.
- [29] D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J.A. Flanagan, R.L. Prior, High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4437–4444.
- [30] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [31] K.P. Karalis, P. Giannogonas, E. Kodela, Y. Koutmani, M. Zoumakis, T. Teli, Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress, *FEBS J.* 276 (2009) 5747–5754.
- [32] E. Tarnus, H. Wassef, J.F. Carmel, P. Rondeau, M. Roche, J. Davignon, L. Bernier, E. Bourdon, Apolipoprotein E limits oxidative stress-induced cell dysfunctions in human adipocytes, *FEBS Lett.* 583 (2009) 2042–2048.
- [33] P. Rondeau, S. Armenta, H. Caillens, S. Chesne, E. Bourdon, Assessment of temperature effects on beta-aggregation of native and glycated albumin by FTIR spectroscopy and PAGE: relations between structural changes and antioxidant properties, *Arch. Biochem. Biophys.* 460 (2007) 141–150.
- [34] P. Faure, L. Troncy, M. Lecomte, N. Wiernsperger, M. Lagarde, D. Ruggiero, S. Halimi, Albumin antioxidant capacity is modified by methylglyoxal, *Diabetes Metab.* 31 (2005) 169–177.
- [35] S. Carballeda, B. Alvarez, L. Turell, H. Botti, B.A. Freeman, R. Radi, Sulfenic acid in human serum albumin, *Amino Acids* 32 (2007) 543–551.
- [36] M.D. del Castillo, J.M. Ames, M.H. Gordon, Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3698–3703.
- [37] H.M. Woffenden, J.M. Ames, S. Chandra, M. Anese, M.C. Nicoli, Effect of kilning on the antioxidant and pro-oxidant activities of pale malts, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4925–4933.
- [38] Q. Zhang, J.M. Ames, R.D. Smith, J.W. Baynes, T.O. Metz, A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 754–769.
- [39] S.-S. Nah, L.-Y. Choi, B. Yoo, Y.G. Kim, H.-B. Moon, C.-K. Lee, Advanced glycation end products increases matrix metalloproteinase-1, -3, and -13, and TNF- α in human osteoarthritic chondrocytes, *FEBS Lett.* 581 (2007) 1928–1932.
- [40] Z. Rasheed, N. Akhtar, T.M. Haqqi, Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 by receptor for advanced glycation end product-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB in human osteoarthritis chondrocytes, *Rheumatology (Oxford)* 50 (2011) 838–851.
- [41] M.P. Cohen, E. Shea, S. Chen, C.W. Shearman, Glycated albumin increases oxidative stress, activates NF-kappa B and extracellular signal-regulated kinase (ERK), and stimulates ERK-dependent transforming growth factor-beta 1 production in macrophage RAW cells, *J. Lab. Clin. Med.* 141 (2003) 242–249.
- [42] A. Stolzing, R. Widmer, T. Jung, P. Voss, T. Grune, Degradation of glycated bovine serum albumin in microglial cells, *Free Radic. Biol. Med.* 40 (2006) 1017–1027.
- [43] P.J. Thornalley, S. Battah, N. Ahmed, N. Karachalias, S. Agalou, R. Babaei-Jadidi, A. Dawnay, Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry, *Biochem. J.* 375 (2003) 581–592.

SUPPLEMENTARY DATA

| Compounds | Non diabetic (ND) | Diabetic (D) |
|-----------------------|-------------------|------------------------------|
| N (females) | 14 (7) | 39 (16) |
| Age | 33 ± 9 | 51.5 ± 20.1 ^{**} |
| HbA1c (%) | 5.5 ± 0.4 | 11.0 ± 1.9 ^{***} |
| Fructosamines (ng/mL) | 218.3 ± 10.9 | 390.0 ± 131.5 ^{***} |
| Creatinin (µmol/L) | 89.8 ± 12.3 | 88.0 ± 16.2 |
| Albumin (g/L) | 46.4 ± 2.6 | 38.8 ± 5.5 ^{***} |
| Total protein (g/L) | 73.8 ± 4.0 | 67.7 ± 7.7 ^{**} |
| CRP (mg/L) | 2.6 ± 2.5 | 7.0 ± 8.0 [*] |
| Cholesterol (mmol/L) | 4.6 ± 0.7 | 4.5 ± 1.3 |
| Triglycerides (g/L) | 0.9 ± 0.4 | 1.6 ± 1.0 ^{***} |

Table S1: Clinical and biochemical characteristics of diabetic and non-diabetic patients and plasma samples.

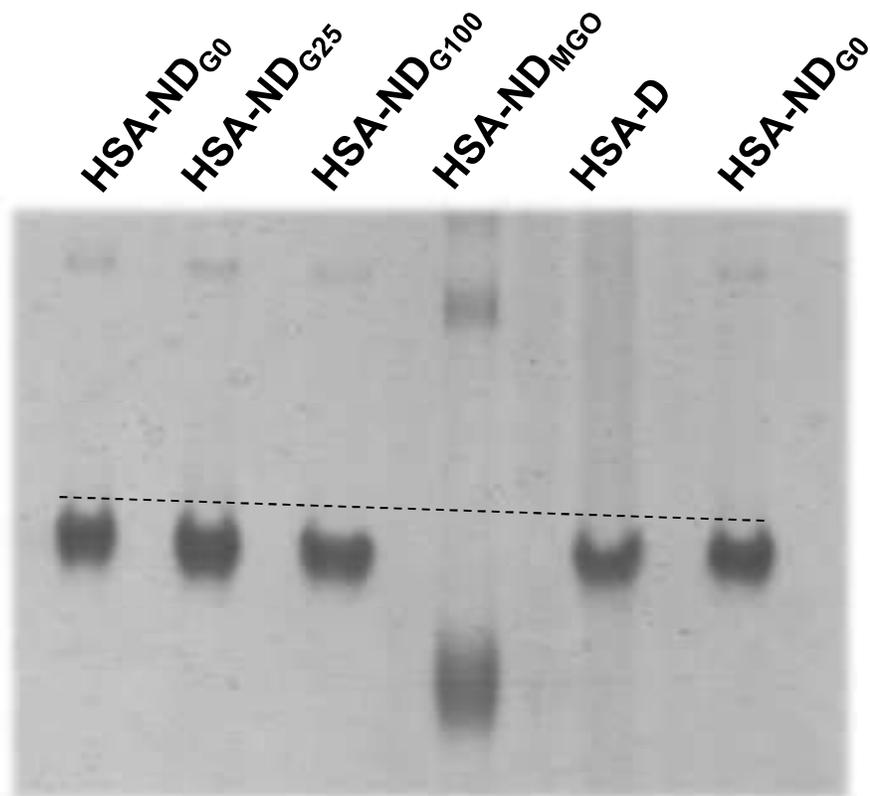
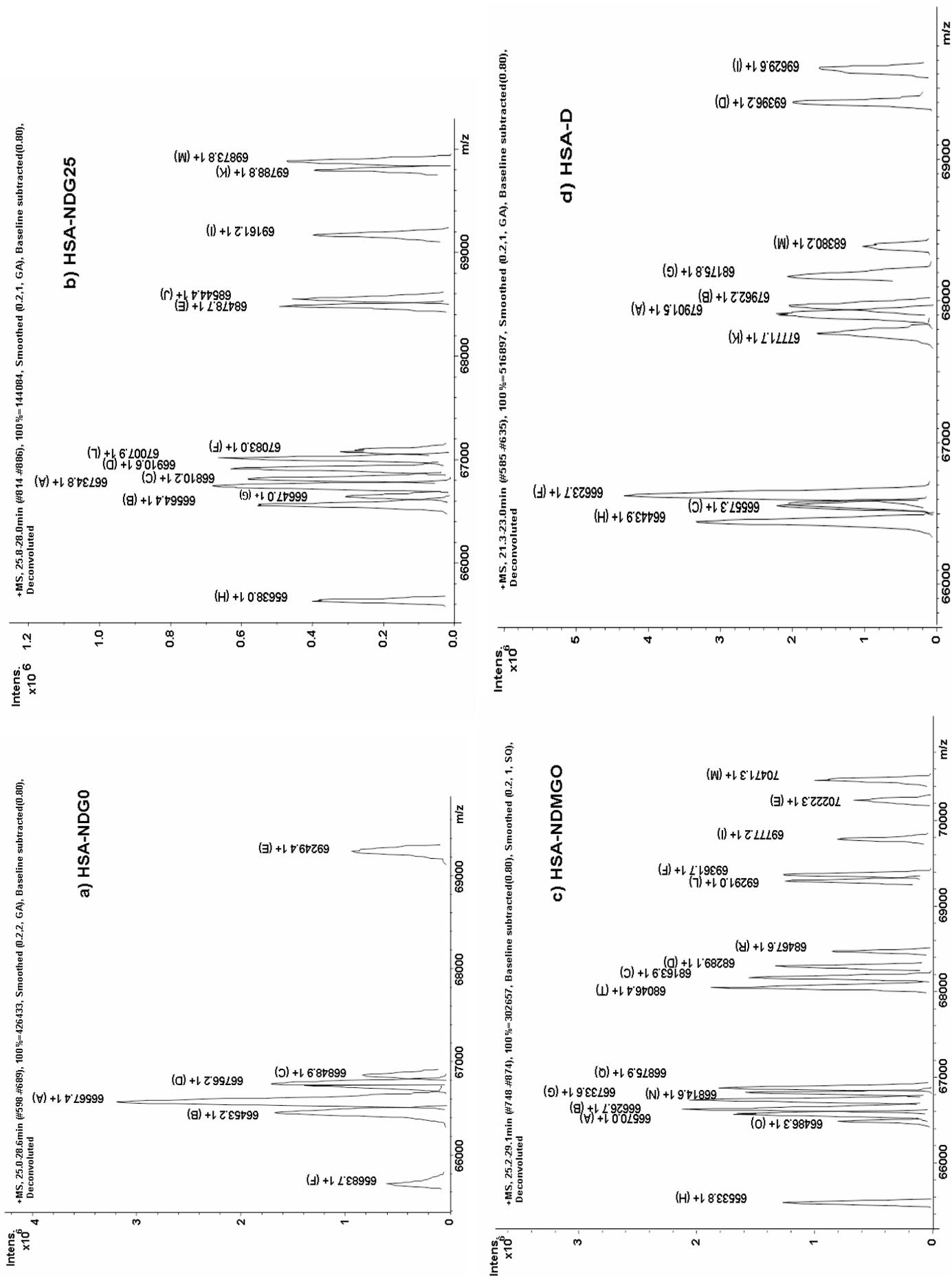


Figure S1: Characterization of purified (HSA-ND and HSA-D) modified albumin by native PAGE electrophoresis (12%)

Relative Electrophoretic Migration (REM) of modified human albumin after glycoxidation were analyzed by native Polyacrylamide Gel (12 % of acrylamide) and stained by Coomassie blue according to Laemmli's method [6].

Figure S2: Mass spectroscopy analysis of native, *in vitro* and *in vivo* glycoxidized HSA.

Mass spectra was obtained by electrospray ionisation mass spectrometry (ESI/MS) and a deconvolution was performed in order to obtain molecular mass of albumin species (m/z). a) HSA-ND_{G0}; b) HSA-ND_{G25}; c) HSA-ND_{MGO}; HSA-D.



2.3. Discussion

Au cours de cette étude portant sur des lignées RAW-blue de macrophages de souris et sur des lignées SW872 de liposarcome humain (adipocytes), nous avons pu mettre en évidence plusieurs effets d'intérêt de l'albumine modifiée *in vivo* provenant de patients diabétique de type 2.

Premièrement la perte de la capacité antioxydante de l'albumine au cours du diabète montrée précédemment à partir d'un test d'hémolyse induite de globules rouges a pu également être mise en évidence⁹⁸ à partir de test de viabilité sur des macrophages en présence d'une source de ROS. Ces observations confirment bien que les modifications glycoxydatives de l'albumine au cours du diabète ont un impact sur sa structure et sur ses propriétés fonctionnelles, se traduisant par des effets indirects sur des cultures cellulaires en présence d'un stress oxydant.

Ce qui est intéressant dans cette étude, est que nous avons pu montrer des effets directs de l'albumine modifiée au cours du diabète sur des macrophages et des adipocytes. En effet, en présence d'albumine purifiée de patients diabétiques nous avons pu montrer sur ces cellules à la fois :

- Une augmentation de la concentration intracellulaire de ROS
- Une activation du NF- κ B, facteur de transcription pro-inflammatoire
- Une baisse de l'activation du NF- κ B en présence de LPS sur les macrophages
- Une augmentation de sécrétion d'IL-6 en présence de LPS sur les adipocytes
- Une activation de la synthèse (mRNA) et une augmentation de l'expression du récepteur RAGE à la surface des adipocytes

Ces propriétés prooxydantes et inflammatoires de l'albumine extraite de patients diabétiques sur les adipocytes et les macrophages nous montrent bien que certaines formes modifiées de l'albumine au cours du diabète présentent un effet direct sur ces cellules et qu'elles peuvent donc être directement impliquées dans les processus physiopathologiques pouvant mener à l'athérosclérose et aux complications vasculaires du diabète.

Il est à noter que ces observations se distinguent de celles obtenues à partir d'albumine purifiée de patients non diabétiques mais aussi de formes glyquées *in vitro* simulant les conditions physiopathologiques du diabète (glucose 25 mM).

Nous confirmons là encore que les mécanismes de glycation et d'oxydation de l'albumine *in vivo* au cours du diabète sont nombreux et complexe et qu'il est donc plus pertinent de travailler à partir de modèles d'albumine extraites et purifiées de patient diabétique pour en mesurer les modifications structurales et fonctionnelles.

2.4. Conclusion

Au cours du diabète, les formes modifiées d'albumine par des mécanismes glycoxydatifs présentent de nombreux effets délétères : pertes de capacité antioxydante et anti-inflammatoire, effets intracellulaire prooxydant et pro-inflammatoire, activation de l'expression du récepteur RAGE.

Ces effets observés sur des macrophages montrent que ces formes modifiées ont un rôle probable dans les mécanismes menant à l'athérosclérose et aux complications cardiovasculaires du diabète. La recherche d'effets similaires sur des modèles cellules endothéliales présenterait un intérêt indéniable. Nous pourrions ainsi évaluer si ces formes modifiées d'albumine circulante sont impliquées dans les mécanismes menant à la dysfonction endothéliale et relier ainsi les mécanismes glycoxydatifs aux complications du diabète. De telles études sont actuellement en cours au laboratoire GEICO à partir d'un modèle de barrière hémato-encéphalique (BHE).

Compte tenu de leur implication dans les mécanismes physiopathologique menant à l'athérosclérose, les formes modifiées d'albumine peuvent donc constituer des biomarqueurs d'intérêt, venant en complément des facteurs de risque habituellement suivis, dans le dépistage ou l'évaluation des atteintes vasculaires au cours du diabète. En effet, ces formes modifiées d'albumine, incluant certainement des formes AGEs, sont le reflet à la fois de la glycation mais aussi du fort stress oxydant circulant retrouvés au cours du diabète de type 2 et pourraient donc se distinguer de biomarqueurs usuels de glycation tel que l'HBA1c.

Nous avons donc cherché, dans une dernière partie de ce travail à évaluer l'intérêt des formes modifiées de l'albumine en tant que biomarqueur potentiel des atteintes vasculaires du diabète, à travers une étude clinique descriptive sur des sujets diabétiques de type 2 fortement déséquilibrés ($HbA1c > 7,5\%$).

3. ETUDE PILOTE D'ASSOCIATION DES FORMES MODIFIEES DE L'ALBUMINE (AGES, GA ET IMA) AUX ATTEINTES VASCULAIRES DES PATIENTS DIABETIQUES : ERMIES-ALBOX

3.1. Etat actuel des connaissances

3.1.1. Les complications vasculaires du diabète de type 2

Le diabète de type 2 est une maladie métabolique chronique en pleine expansion liée à l'âge et à l'évolution des modes de vie : sédentarité et apports énergétiques inadaptés. La prévalence du diabète de type 2 traité est particulièrement forte à La Réunion puisqu'elle touche près de 20% de la population de plus de 30 ans^{105,7}.

La mortalité des diabétiques est principalement due aux complications vasculaires rencontrées dans le diabète de type 2 qui associent la microangiopathie diabétique¹⁰⁶(rétinopathie, néphropathie et pied diabétique) et la macroangiopathie diabétique (athérosclérose, syndromes coronariens, AVC,...). En effet, le risque d'atteinte vasculaire est fortement augmenté et les complications cardiovasculaires associées (AVC, IM) sont responsables de 80% des décès des personnes diabétiques.

3.1.2. Prévention des complications vasculaires du diabète

Le suivi médical et la prise en charge du diabétique de type 2 se focalisent essentiellement sur un bon contrôle de la glycémie vérifié au moyen de marqueurs usuels de glycation, ainsi que sur la prise en charge des facteurs de risque habituellement associés : surpoids, dyslipidémie, HTA, tabagisme. L'hyperglycémie chronique, traduite par une élévation significative de l'HbA1c supérieure ou égale à 7,5% est couramment utilisée comme marqueur prédictif des atteintes vasculaires des patients diabétiques, cependant près de 25% des patients présentant une atteinte vasculaire ne sont identifiés par ce marqueur en association ou non aux facteurs de risques conventionnels suscités^{1,107}.

Il existe donc aujourd'hui un réel besoin d'identifier d'autres marqueurs précoces associés à un risque accru de l'atteinte vasculaire dans le diabète. L'utilisation de marqueurs directement impliqués dans les mécanismes physiopathologiques des atteintes vasculaires dans le diabète qui pourraient par la suite constituer des cibles pharmacologiques d'intérêt est à privilégier^{1,108}.

3.1.3. Glycation des protéines et stress oxydatif dans le diabète

Au cours du diabète de type 2, l'hyperglycémie chronique amène à la formation de produits de glycation tels l'hémoglobine glyquée ou les fructosamines par la réaction de Maillard dans un premier temps⁶³. Il est également constaté une augmentation du stress oxydatif dans la pathologie diabétique. Ce stress oxydatif transforme ces produits de glycation en produits avancés de glycation (AGEs) dans un second temps par réarrangements oxydatifs irréversibles. On parle communément de phénomène glycoxydation⁷⁷. Il a été montré *in vitro* que les phénomènes de glycation et d'oxydation sont à l'origine de modifications structurales et fonctionnelles des protéines dans le diabète et plus particulièrement de l'albumine qui est la protéine circulante la plus abondante du plasma^{98,99}. Les différentes formes d'albumine glyquée – Glycated Albumin (GA) - ou oxydée – Ischemia Modified Albumin^{69,71} (IMA) – sont reconnues aujourd'hui comme des biomarqueurs respectivement de niveau de glycation et de l'équilibre glycémique (GA)^{109,110} et du niveau de stress oxydatif du plasma dans le diabète^{111,112}.

Le stress oxydatif et les AGEs associés ont montré *in vitro* et *in vivo* une activité pro-inflammatoire sur les macrophages et sur les cellules endothéliales, par activation de récepteurs spécifiques aux AGEs: RAGE¹¹³. En plus, ils entraînent une inhibition de l'angiogénèse et des modifications épigénétiques « pro-inflammatoires » à long-terme, qui persistent à la normalisation de la glycémie.

On considère donc aujourd'hui que le phénomène de glycoxydation (glycation et réarrangement oxydatifs irréversibles) conjointement au stress oxydatif (hyperproduction de ROS) occupe une place centrale dans les mécanismes physiopathologiques des atteintes vasculaires rencontrées notamment dans le diabète de type 2.

Une augmentation significative de l'IMA était observée chez les patients diabétiques de type 2¹¹⁴ et plus récemment une étude a pu montrer une augmentation significative de l'IMA chez les patients diabétiques de type 2 déséquilibrés (HbA1C >7,5%) souffrant d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI)¹¹⁵. Mais si une augmentation significative de l'IMA a pu être montrée au cours d'atteintes vasculaires profondes et irréversibles comme l'AOMI, il n'en est pas de même pour les autres complications micro- et macrovasculaires du diabète pour un même niveau de déséquilibre glycémique. Il apparaît nécessaire d'évaluer l'intérêt du dosage de l'IMA dans le cadre d'atteintes vasculaires prévalentes micro et macroangiopathique au sein d'une population de patients diabétiques présentant un déséquilibre glycémique avéré.

Une augmentation des concentrations plasmatiques de marqueurs de glycoxydation et du stress oxydatif pourrait être associée à une augmentation du risque d'atteinte vasculaire^{116,102} et les marqueurs associés à la glycoxydation (AGEs) et au stress oxydatif (IMA) pourraient représenter des biomarqueurs potentiels pour la prédiction du risque d'atteinte vasculaire^{55,86,117}.

3.2. Objectifs de la recherche

L'objectif principal de ce projet de recherche est d'étudier l'association entre un biomarqueur plasmatique du stress oxydatif, à savoir l'IMA (Ischemia Modified Albumin) et toutes formes d'atteintes vasculaires du diabète (microangiopathie, macroangiopathie) versus aucune atteinte, dans une population de patients ayant un diabète de type 2 mal contrôlé (HbA1c≥7,5%).

Les objectifs secondaires sont les suivants :

- Etudier l'expression de l'IMA (concentration plasmatique moyenne) en fonction du niveau d'atteintes vasculaires (Critère composite à 4 catégories) :
 - Patients sans aucune atteinte vasculaire (groupe témoin)

- Patients avec microangiopathie diabétique seule (rétinopathie et/ou, néphropathie et/ou, neuropathie et/ou, lésions du pied diabétique)
 - Patients avec macroangiopathie diabétique seule (Syndrome coronarien aigu SCA et/ou, Angor Stable et/ou, Infarctus du myocarde IM et/ou, Angioplastie Coronaires et/ou, AOMI et/ou, Accidents vasculaires cérébraux AVC)
 - Patients avec macroangiopathie diabétique et microangiopathie diabétique (atteintes vasculaires combinées).
- Comparer la valeur discriminante de l'IMA à celle des biomarqueurs usuels de glycation (HbA1c, fructosamine), pour l'identification des atteintes vasculaires prévalentes du diabète.
 - Etudier l'association entre le dosage plasmatique des produits avancés de glycation et les atteintes vasculaires du diabète.
 - Etudier l'association entre le dosage plasmatique de l'albumine glyquée (GA) et les atteintes vasculaires du diabète.
 - Estimer les corrélations entre les concentrations plasmatiques des AGEs (marqueur de glycoxydation), des marqueurs de glycation (HbA1c, fructosamines, GA) et le dosage de l'IMA (marqueur du stress oxydatif).

3.3. Aspects Méthodologiques

3.3.1. Schéma de la recherche

Il s'agit d'une étude transversale d'association, ancillaire de la cohorte expérimentale ERMIES, réalisée à partir des données à l'entrée dans la cohorte (sérothèque / recueil) pour les patients inclus à la date du 10/04/2014.

Le protocole de recherche biomédicale ERMIES est un essai randomisé multicentrique d'intervention éducative structurée ambulatoire dans le diabète de type 2 insuffisamment contrôlé à La Réunion. Ce protocole a fait l'objet d'un financement DGOS-PHRC inter-

régional (campagne 2010). Cette étude et la collection biologique associée font l'objection d'un référencement :

- Numéro ID_RCB : 2011-A00046-35
- Numéro d'enregistrement dans Clinicaltrials.gov : NCT01425866

L'analyse statistique à visée exploratoire a porté sur des caractéristiques cliniques recueillies en pré-inclusion ou en inclusion (événements vasculaires prévalents), ainsi que sur les mesures biologiques pratiquées en inclusion d'ERMIES (HbA1c%, fructosamine, bilan lipidique) ou issues de la sérothèque ERMIES au même moment (biomarqueurs).

A ce jour, l'état d'avancement de la recherche ERMIES ne permet pas d'exploiter les données du suivi diabétologique trimestriel (sur 2 ans) et ainsi d'approcher le caractère pronostique des biomarqueurs d'intérêt. La taille de l'étude correspond à l'ensemble des patients inclus dans ERMIES à la date du 10/04/2014.

Les dosages de biomarqueurs issus de la sérothèque ERMIES ont été effectués à partir d'un aliquot de sérum destiné au laboratoire de Biochimie du CHU La Réunion – Félix Guyon (partenaire scientifique de l'étude ERMIES) à des fins de recherche conformément au protocole de l'étude ERMIES : amendement n°2 version 2.2 du 03 Aout 2012.

3.3.2. Critères d'éligibilité

3.3.2.1. Critères d'inclusion (ERMIES) :

- Diabète de type 2, défini suivant les critères de l'OMS
- HbA1c \geq 7,5% depuis 3 mois ou plus
- Patients âgés de plus de 18 ans
- Traités par ADO et/ou analogues de la GLP-1 et/ou insulinothérapie depuis au moins 1 an
- Schéma thérapeutique stable depuis au moins 3 mois
- Résidant à La Réunion

- Affilié à un régime de sécurité sociale
- Ayant signé un consentement de participation de l'étude
- Période d'inclusion : octobre 2011 – avril 2014

3.3.2.2. Critères de non inclusion (ERMIES) :

- Traitement en cours ou programmé susceptible d'influer sur le contrôle glycémique
- Hospitalisation en cours ou récente (<3 mois) en lien avec le diabète
- Complication évolutive sévère : rétinopathie ischémique ou proliférative, insuffisance rénale chronique, insuffisance coronarienne évolutive, lésion du pied diabétique
- Grossesse en cours
- Cancer évolutif
- Participation concomitante à un essai thérapeutique

3.3.3. Critères d'évaluations

3.3.3.1. Exposition principale :

Dosage de l'albumine modifiée par l'ischémie (IMA : méthode colorimétrique – Albumin Cobalt Binding Test)^{103,69}

L'IMA est un marqueur du stress oxydatif qui n'est pas spécifique d'un organe ou d'une localisation particulière. Un regroupement de complications est donc envisageable pour améliorer la puissance statistique des analyses de données.

3.3.3.2. Expositions secondaires :

- Dosage des AGEs plasmatiques (méthode ELISA)
- Dosage de l'albumine glyquée GA (méthode ELISA)
- Dosage de l'albumine plasmatique (méthode colorimétrique)
- Dosage de l'HbA1c et de la fructosamine
- Toute atteinte vasculaire (terminée ou en cours) relevée spécifiquement à l'inclusion d'ERMIES :
 - Microangiopathies :
 - Lésion du pied diabétique (terminées < à 1an)

- Néphropathie diabétique tous stades d'évolution (en cours uniquement)
- Rétinopathie diabétique tous stades d'évolution
- Neuropathie diabétique hors AOMI (en cours uniquement)
- Macroangiopathies (en cours ou terminées il y a moins d'une année) :
 - Accident coronarien aigu
 - Angor
 - Coronaropathie ischémique silencieuse
 - Pontage coronarien
 - Angioplastie coronaire
 - Accident ischémique cérébral
 - AOMI

3.3.4. Méthodes analytiques

3.3.4.1. Dosage de l'HbA1c et fructosamines

Le dosage de l'hémoglobine glyquée HbA1c est effectué à partir d'un échantillon de sang total prélevé sur tube EDTA (BD Vacutainer). La méthode de dosage utilisée est l'électrophorèse capillaire sur automate Capillarys Flex du laboratoire Sebia validée sur site au laboratoire de Biochimie du CHU La Réunion – Hôpital Félix Guyon. Les échantillons ont tous été analysés dans les 48 heures suivant le prélèvement et conservés 4°C en attente d'analyse.

3.3.4.2. Analyses biochimiques

Les dosages des protéines plasmatiques totales, de l'albuminémie, de la CRP, du Cholestérol Total, de la triglycéridémie, de l'HDL-Cholestérol, du LDL-Cholestérol, de l'ApoA1, de l'ApoB et des fructosamines ont été réalisés à partir de plasma prélevé sur tube EDTA (BD Vacutainer). Ces analyses ont été réalisées dans les 6 heures suivant le prélèvement sanguin, échantillons conservés à température ambiante entre le prélèvement et l'analyse.

Le dosage de la glycémie à jeun a été réalisé à partir de plasma prélevé sur tube Fluorure Oxalate (BD Vacutainer), analyse réalisée dans les 6 heures suivant le prélèvement sanguin, échantillons conservés à température ambiante entre le prélèvement et l'analyse.

Le dosage de la microalbuminurie a été réalisé à partir d'échantillons urinaires prélevés par miction sur flacon stérile. Les urines sont conservées à température ambiante jusqu'à analyse biochimique dans les 6 heures suivant le prélèvement.

Toutes les analyses biochimiques décrites ci-dessus ont été effectuées à partir de coffrets réactifs Cobas Roche par méthode colorimétrique sur un automate Cobas C501 du laboratoire RocheDiagnostic au laboratoire de Biochimie du CHU La Réunion – Hôpital Félix Guyon.

3.3.4.3. Dosage de l'IMA

Le dosage de l'IMA a été adapté pour le dosage en plaque 96 puits à partir de la méthode de référence décrite précédemment par Bar-Or et al.⁶⁹ Notre objectif a été d'améliorer la reproductibilité de cette méthode par l'utilisation de pipettes multicanaux étalonnées et la réalisation simultanée de l'ensemble des dosages tout en limitant la prise d'essai échantillon (50µl pour un test en triplicata contre 200µl pour un seul essai en méthode de référence) et le volume d'essai final (200µl contre 1,5ml en méthode de référence). Ces dosages ont été réalisés à partir de plasmas de patients prélevés sur tube de sang EDTA décantés après centrifugation 10 min à 2000g et conservés à -80°C avant analyse.

Chaque échantillon a été dilué au ¼ dans du tampon PBS 1X (50µl de prise d'essai dans un volume final de 200µl). Un volume de 20µl d'échantillon est mélangé avec un excès de Co^{2+} 15µl d'une solution de Co^{2+} à 0,1% préparée à partir de chlorure de cobalt anhydre (Acros Organics). Un volume de 125µl de tampon PBS 1X est ajouté, puis le mélange est placé 15 min à 37°C sous agitation lente. A la fin de la première agitation, une première lecture optique est effectuée à 470nm (Fluostar Optima, BMG LabTech) DO pour évaluer le bruit de fond avant réaction colorimétrique. Après incubation, un volume de 20µl de DTT (DL-

Dithiotreitol, Sigma ref : D0632) à 1,5mg/ml est ajouté. La réaction colorimétrique formée par le complexe DTT-Co²⁺ est stoppée après 2 min par ajout de 20 µl de NaCl à 0,9M. Une lecture optique D1 à 470nm est réalisée immédiatement après l'arrêt de la réaction.

La valeur de l'IMA est exprimée en densité optique $\Delta D = D1 - D0$. Elle représente la quantité de Co²⁺ résiduel non lié à l'albumine. Chaque échantillon a été testé en triplicata à partir de la dilution initiale. Les valeurs moyennes ont fait l'objet de l'analyse.

La valeur de l'IMA est directement proportionnelle à la quantité d'albumine modifiée par mécanismes oxydatifs et inversement proportionnelle à la concentration plasmatique en albumine, c'est pourquoi nous avons rapporté la valeur de l'IMA à celle de l'albumine dans cette étude à partir de la formule suivante :

$$IMA/ALB (G/L) = \Delta D / (1/ (Alb (G/L))) = \Delta D \times (Alb) (G/L)$$

3.3.4.4. Dosage de l'albumine glyquée (GA) et AGEs

Les dosages de GA et d'AGEs ont été réalisés par méthode ELISA à partir de plasma de sang prélevé sur tube EDTA conservés à -80°C. Les coffrets réactifs utilisés sont : Human AGEs Elisa kit et Human GA Elisa kit (Sunred Bio). Les lectures optiques des réactions colorimétriques ont été effectuées sur spectrofluorimètre Fluostar Optima (BGM LabTech).

3.3.5. Analyse statistique des données

L'analyse statistique des données a été réalisée au CIC de la Réunion, à l'aide des logiciels SASv9.2 ® et Stata v10.0. ®

La taille d'étude attendue ($N \geq 75$ patients) ne repose sur aucune hypothèse et calcul de nombre de sujets nécessaire, mais sur la disponibilité des données recueillies et saisies à la date de point, à l'étape de l'inclusion dans l'essai ERMIES. Ainsi, les analyses statistiques ont été réalisées selon une démarche exploratoire à la recherche d'associations privilégiées entre

biomarqueur IMA et événements cliniques prévalents d'intérêt (objectif principal), ce qui permettra d'argumenter la réalisation d'un protocole de recherche ad hoc (suivi de cohorte) pour l'étude de la valeur pronostique de ce biomarqueur.

La population des patients diabétiques sélectionnés pour cette étude est décrite (dénombrement, pourcentage, moyenne, écart-type, médiane et autres percentiles) : niveau de glycation, niveau des biomarqueurs de glycoxydation et du stress oxydatif (étude de distribution), ancienneté-durée du diabète et complications micro et macrovasculaires (terminées ou en cours).

Les analyses comparatives (au seuil de risque $\alpha = 5\%$) entre groupes de complications font appel aux tests non paramétriques sur séries indépendantes : test de Wilcoxon (2 groupes) ou test de Kruskal-Wallis (> 2 groupes). L'évaluation de la capacité discriminante globale des biomarqueurs candidats nécessitera un calcul d'aire sous la courbe ROC (AUC + IC95%), ainsi que le recours à un test non paramétrique de comparaison des AUC (module roccomp de Stata v10.0). Enfin, l'étude de corrélation entre biomarqueurs est déterminée à l'aide du coefficient de corrélation de Spearman.

Cette analyse statistique est unique et réalisée sur des données de pré-inclusion ou d'inclusion d'un échantillon de patients recrutés de façon consécutive dans l'essai d'intervention ERMIES jusqu'à la date de point.

3.4. Résultats

3.4.1 Description générale de la population observée

L'ensemble des données clinico-biologiques de l'échantillon de patients diabétiques de type 2 issus de l'étude ERMIES observés dans cette étude figure dans le tableau n°1.

75 patients d'âge moyen 59 ans ont été observés (53 femmes pour 22 hommes). La grande majorité des patients présente au minimum un surpoids (IMC = 30 +/- 6). En accord avec les critères d'inclusion d'ERMIES, tous les patients présentent un diabète de type 2 déséquilibré avec une valeur d'HbA1c supérieure à 7,5% (9,1 +/- 1,1%). Ces valeurs sont, elles aussi, en accord avec des taux de fructosamines et de glycémie à jeun élevés.

Concernant les atteintes vasculaires relevées à l'inclusion, on compte 31 patients sans complication microangiopathie et sans macroangiopathie. 30 patients présentent au moins une complication microangiopathique. 3 patients présentent une atteinte macroangiopathique seule et 12 patients ont à la fois une complication microangiopathique et une complication macroangiopathique relevées à l'inclusion d'ERMIES. A noter que la durée moyenne du diabète est très élevée (18 +/- 9 ans).

Afin d'avoir des groupes de patients avec des effectifs statistiquement significatifs, nous avons choisi de présenter l'ensemble des résultats de cette étude en distinguant 2 groupes principaux. Un groupe témoin de patients sans complication vasculaire relevée à l'inclusion d'ERMIES (n = 31) et un groupe de patients présentant tous types de complication cardiovasculaire relevée à l'examen clinique d'inclusion d'ERMIES (n = 44).

L'ensemble des paramètres biologiques utilisés présentent une répartition selon une loi normale hormis les dosages des AGEs et de GA. Les données relatives à ces deux marqueurs biochimiques ne sont donc pas présentées sous forme de moyenne +/- écart-type.

Tableau 1 : ERMIES données générales d'inclusion (moyennes +/- écart-type)

| | |
|--|-----------------|
| Femme (n) | 53 |
| Homme (n) | 22 |
| Abse nce d'atteinte va sc ula ire (n) | 31 |
| Mic ro a ng io pa thie se ule (n) | 30 |
| Mac ro a ng io pa thie se ule (n) | 3 |
| Mic ro a ng io pa thie et mac ro a ng io pa thie (n) | 11 |
| IMC | 30 +/- 6 |
| Age (a ns) | 59 +/- 11 |
| Durée du dia bète (a ns) | 18 +/- 9 |
| Pro té ine s To ta le s (G/L) | 71 +/- 5 |
| Albu mine (G/L) | 42 +/- 3 |
| CRP (mG/L) | 6 +/- 9 |
| Fruc to sa mine s (μ mo l/L) | 339 +/- 61 |
| HbA1c (%) | 9,1 +/- 1,1 |
| Glyc é mie (mmo l/L) | 9,14 +/- 2,99 |
| Cho le sté ro l To ta l (mmo l/L) | 4,14 +/- 1,04 |
| HDL-c ho le sté ro l (mmo l/L) | 1,12 +/- 0,29 |
| LDL-c ho le sté ro l (mmo l/L) | 2,50 +/- 0,90 |
| Tri glycé ri de s (mmo l/L) | 1,60 +/- 1,09 |
| Apo A (mmo l/L) | 1,30 +/- 0,22 |
| Apo B (mmo l/L) | 0,89 +/- 0,25 |
| Pro té ine s urina ire s (G/L) | 0,16 +/- 0,21 |
| Mic ro a lbu mi nu rie (mG/L) | 74 +/- 173 |
| IMA (DO) | 0,410 +/- 0,115 |
| IMA/ALB (G/L) | 17,3 +/- 4,8 |
| GA (mG/L) | 4,39 |
| AGE (nG/mL) | 1146 |

Les données biologiques relatives aux deux sous-groupes formés à partir des relevés cliniques d'inclusion d'ERMIES sont présentées dans le tableau n°2.

Entre les deux groupes de patients avec ou sans atteinte vasculaire aucune différence significative d'expression des paramètres biologiques étudiés n'est relevée. Seuls le dosage de l'IMA/ALB présente une discrète différence entre les deux groupes de patients sans toutefois présenter de significativité statistique ($p < 0,2$).

Notons que les données relatives aux AGEs et GA, ne répondant pas à une loi normale de répartition ne peuvent être présentées dans ce tableau ni comparées aux autres paramètres biologiques selon le test t de Student.

Tableau 2 : données biologiques (moyenne +/- écart-type) présentées par sous-groupes d'atteintes vasculaires relevées à l'inclusion d'ERMIES (absence d'atteinte vasculaire vs. Complication vasculaire comparaison). Les variables sont comparées selon le test de Wilcoxon (en gras, $p < 0,15$).

| | Abse nce d'atteinte va sc ula ire à l'inc lusio n | Au mo ins une c omplic a tio n va sc ula ire à l'inc lusio n | |
|-------------------------------------|--|---|----------------------|
| | n = 31 | n = 44 | |
| | <i>Moyenne +/- écart-type</i> | <i>Moyenne +/- écart-type</i> | <i>p value</i> |
| Pro té ine s To ta le s (G/L) | 71 +/- 5 | 70 +/- 4 | <i>0,3369</i> |
| Albu mine (G/L) | 42 +/- 3 | 43 +/- 3 | <i>0,1565</i> |
| CRP (mG/L) | 4 +/- 5 | 7 +/- 11 | <i>0,1602</i> |
| HbA1c (%) | 9,0 +/- 1,2 | 9,1 +/- 1,1 | <i>1,0000</i> |
| Fru c to sa mi ne s (μ mo l/L) | 339 +/- 73 | 339 +/- 53 | <i>0,7085</i> |
| Glyc é mie (mmo l/L) | 9,0 +/- 2,9 | 9,2 +/- 3,1 | <i>0,7548</i> |
| Cho le sté rol To ta l (mmo l/L) | 4,17 +/- 0,84 | 4,11 +/- 1,17 | <i>0,8071</i> |
| HDL-c ho le sté rol (mmo l/L) | 1,13 +/- 0,30 | 1,12 +/- 0,28 | <i>0,8823</i> |
| LDL-c ho le sté rol (mmo l/L) | 2,49 +/- 0,79 | 2,52 +/- 0,97 | <i>0,8870</i> |
| Tri gly cé ri de s (mmo l/L) | 1,61 +/- 1,34 | 1,60 +/- 0,90 | <i>0,9690</i> |
| Apo A (mmo l/L) | 1,30 +/- 0,22 | 1,30 +/- 0,22 | <i>1,0000</i> |
| Apo B (mmo l/L) | 0,89 +/- 0,21 | 0,88 +/- 0,28 | <i>0,8665</i> |
| Pro té ine s ur i na ire s (G/L) | 0,14 +/- 0,14 | 0,16 +/- 0,25 | <i>0,6878</i> |
| Mic ro albu mi nu rie (mG/L) | 61 +/- 145 | 82 +/- 191 | <i>0,6063</i> |
| IMA (DO) | 0,391 +/- 0,127 | 0,423 +/- 0,105 | <i>0,2347</i> |
| IMA/Albu mine (G/L) | 16,3 +/- 5,1 | 18,0 +/- 4,5 | <i>0,1296</i> |

3.4.2 Corrélations des marqueurs biochimiques

A l'analyse des corrélations entre les différents biomarqueurs de glycation, d'oxydation ou de glycoxydation dosés au cours de cette étude clinique, 3 observations sont remarquables :

- L'IMA n'est corrélée à aucun biomarqueur de glycation (HbA1c, fructosamine, GA) ni à aucun biomarqueur de glycoxydation (AGEs). Seuls sont corrélés l'IMA (DO) et l'IMA rapportée à la concentration plasmatique d'albumine ($r = 0,90398$; $p < 0,001$) .
- Aucune corrélation n'est retrouvée entre les dosages des AGEs ou de la GA et ceux des biomarqueurs conventionnels de glycation des protéines (HbA1c et fructosamines)
- Le dosage des AGEs et de la GA sont fortement corrélés ($r = 0,84227$; $p < 0,001$)

Tableau 3 : Coefficients de corrélation de Spearman entre biomarqueurs de glycation (HbA1c, fructosamines, GA), d'oxydation (IMA, IMA/ALB) et de glycoxydation (AGEs). (* $p < 0,001$)

| | IMA (DO) | IMA/ALB (G/L) | AGE (nG/mL) | GA (mG/L) |
|----------------------------------|----------|-----------------|-------------|-----------------|
| IMA (DO) | 1 | 0,90398* | 0,08296 | 0,05351 |
| IMA/ALB (G/L) | | 1 | 0,00077 | 0,03035 |
| AGE (nG/mL) | | | 1 | 0,84227* |
| GA (mG/L) | | | | 1 |
| HbA1c (%) | 0,02645 | 0,03545 | 0,04283 | 0,01544 |
| Fructosamines (mmol/L) | 0,07378 | 0,0995 | 0,01233 | 0,0529 |
| Fructosamines/protéines (mmol/G) | 0,08695 | 0,0913 | 0,03211 | 0,06719 |

3.4.3 IMA et atteintes vasculaires

En comparant les niveaux d'expression des différents biomarqueurs de glycation (HbA1c), d'inflammation (CRP), d'oxydation (IMA/ALB) et de dyslipidémie (LDL) entre les patients ne présentant aucune complication vasculaire relevée à l'inclusion d'ERMIES et ceux présentant au moins une atteinte vasculaire micro et/ou macroangiopathique (figure n°17), aucune différence significative n'est retrouvée (test de Wilcoxon, $p < 0,05$).

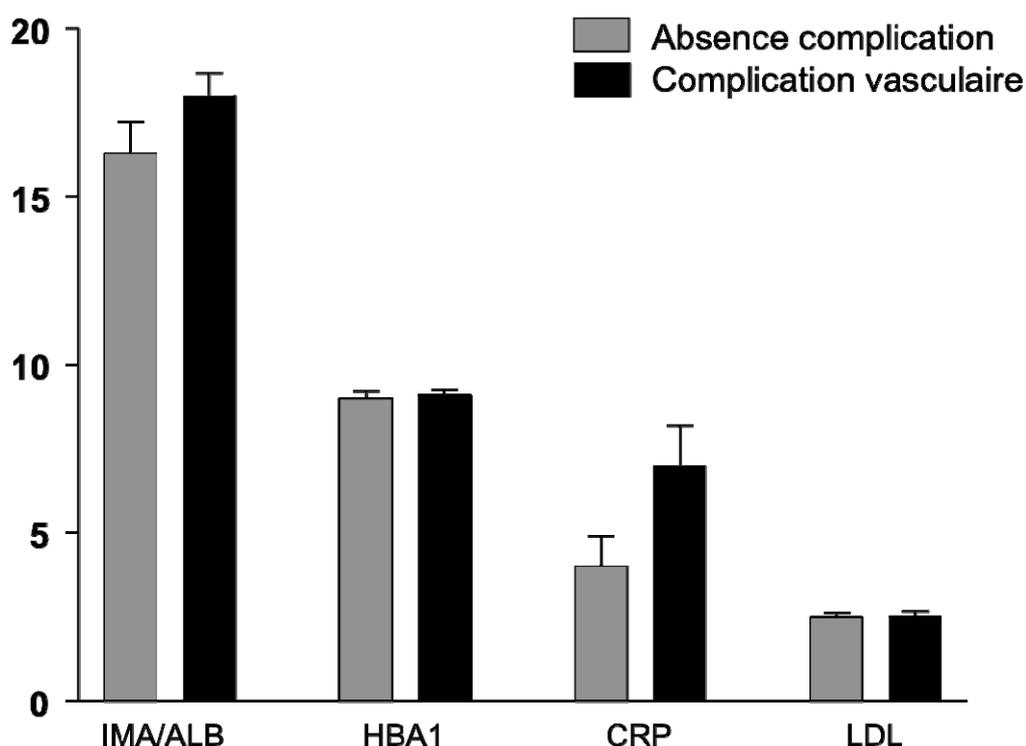


Figure n°17: Valeurs comparatives de concentrations plasmatiques de biomarqueurs (moyenne +/- écart-type) entre les groupes sans complication vasculaire vs. avec complication vasculaire.

Egalement, si l'on compare la capacité discriminante globale de l'IMA (DO) à celle de l'HbA1c dans l'identification des atteintes vasculaires relevées à l'inclusion de l'étude au moyen de courbes ROC (figure n°19), on ne constate pas de différence significative entre ces deux biomarqueurs. Les valeurs d'aire sous la courbe respectivement de 0,5766 et de 0,5459 pour l'HbA1c et l'IMA témoignent d'une capacité faiblement discriminante de ces biomarqueurs pour distinguer des patients avec ou sans complication vasculaire relevée à l'inclusion du protocole ERMIES.

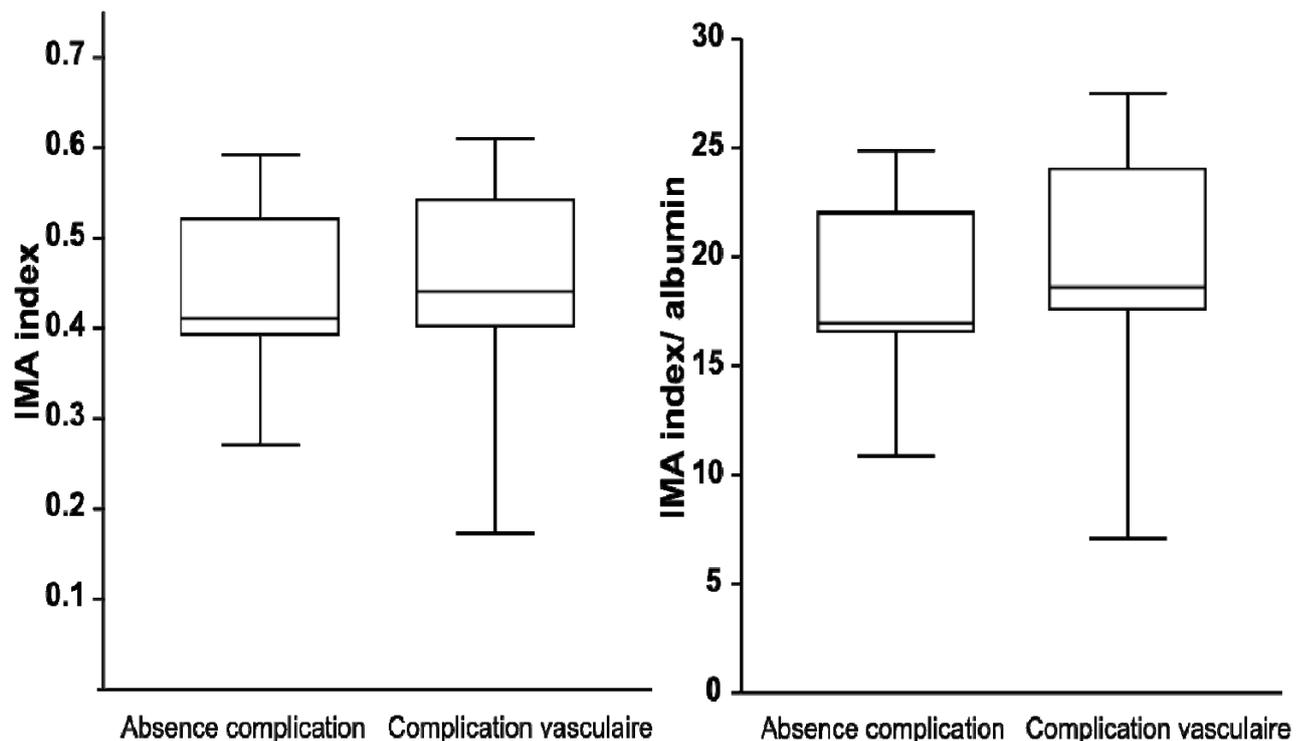


Figure n°18 : Distribution des valeurs d'IMA (DO) et d'IMA/Albumine entre les groupes sans complication vasculaire et avec complication vasculaire relevée à l'inclusion d'ERMIES. Représentation en box-plot (valeur minimale, 25^{ème} percentile, valeur médiane, 75^{ème} percentile et valeur maximale).

On remarque malgré tout, bien que non significative, une tendance à l'augmentation des valeurs de l'IMA/ALB chez les patients présentant une atteinte vasculaire (figure n°17). Cette tendance n'est pas retrouvée pour les autres paramètres biochimiques dosés hormis pour la CRP, marqueur de l'inflammation, mais dont la dispersion des valeurs reste très importante (écart-type supérieur à la valeur moyenne).

Si on observe la distribution des valeurs d'IMA et d'IMA/ALB entre les deux groupes avec ou sans atteinte vasculaire (figure n°18), on retrouve cette tendance à l'augmentation conjuguée à une augmentation de la dispersion des valeurs d'IMA chez les patients avec atteinte vasculaire.

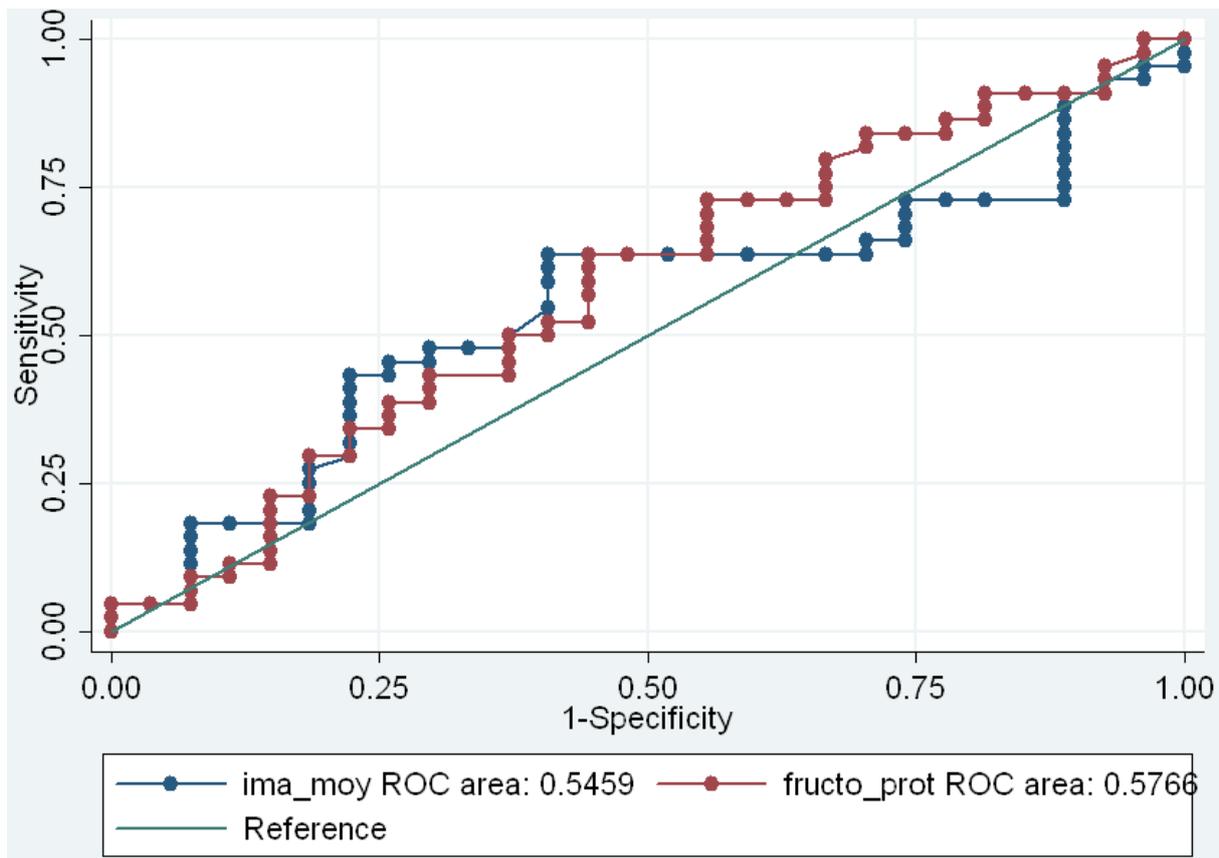


Figure n° 19 : Courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) des paramètres biologiques IMA et de l'HbA1c rapportées à l'identification des atteintes vasculaires relevées à l'inclusion d'ERMIES. Données comparées d'aire sous la courbe.

3.4.4 GA, AGEs et atteintes vasculaires

La distribution des valeurs des AGEs et de GA entre les différents groupes avec ou sans atteinte vasculaire révélée à l'inclusion d'ERMIES sont présentés sur la figure n°20.

On ne constate pas de différence significative de valeurs des AGEs ni de GA entre ces différents groupes, la distribution des valeurs entre chaque groupe étant entièrement chevauchante.

La distribution des valeurs des AGEs et de GA semble moins hétérogène dans le groupe de patients avec atteinte vasculaire. Il est à noter que les distributions des valeurs de GA et des AGEs, bien que ces paramètres aient des ordres de grandeur différents sont quasiment superposables dans chaque groupe.

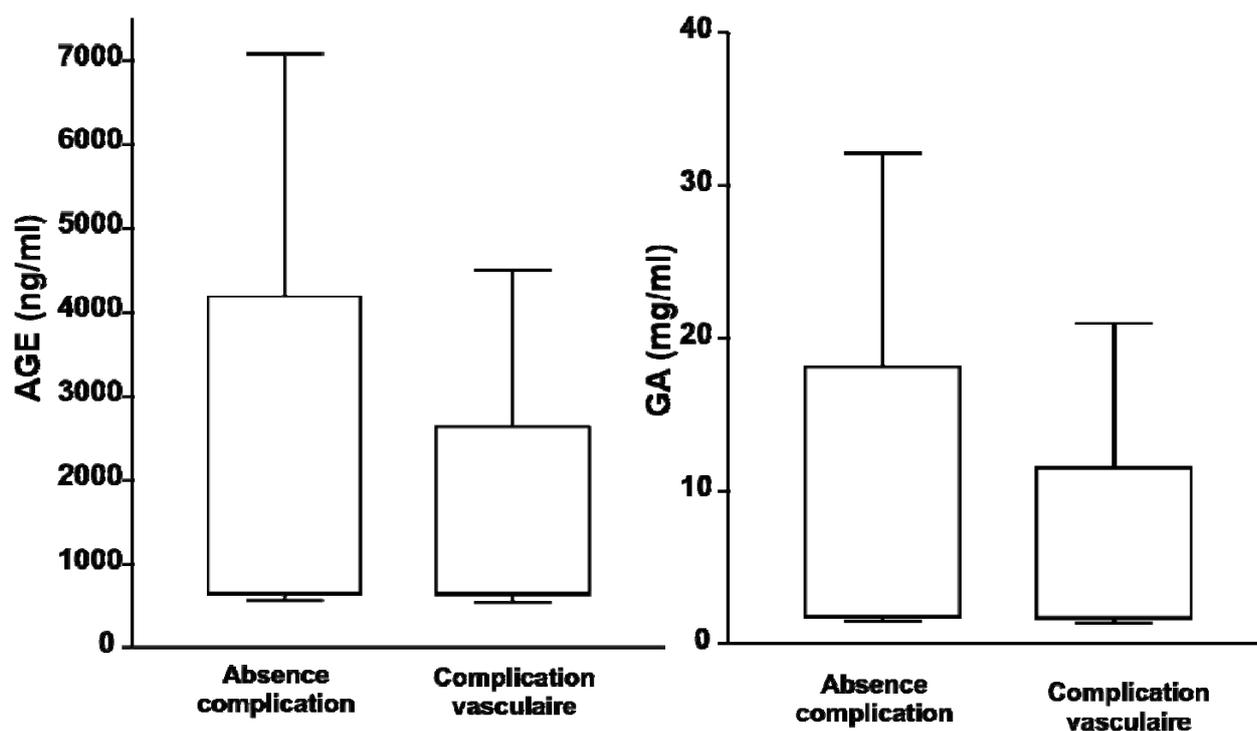


Figure n°20 : Distribution des valeurs des AGEs et de GA entre les groupes sans complication vasculaire et avec complication vasculaire relevée à l'inclusion d'ERMIES. Représentation en box-plot (valeur minimale, 25^{ème} percentile, valeur médiane, 75^{ème} percentile et valeur maximale).

3.5. Discussion, conclusions et perspectives

Au regard des résultats présentés, nous pouvons premièrement constater le caractère indépendant, relevé par l'absence de corrélation, des différents biomarqueurs de glycation (HbA1c et fructosamines), du stress oxydant (IMA) et de glycoxydation (AGEs) étudiés au cours de ces travaux. Ce premier résultat nous conforte sur le fait que ces marqueurs sont issus de processus physiopathologiques différents et que le dosage de l'IMA et des AGEs apportent des informations complémentaires et non redondantes aux dosages de l'HbA1c ou des fructosamines .

Nous observons au contraire une très forte corrélation entre les valeurs des AGEs et de GA. Ce résultat peut apparaître surprenant ce d'autant plus que nous nous attendions plus vraisemblablement à un rapprochement des valeurs de GA à ceux d'HbA1c et des fructosamines. En effet, l'albumine glyquée (GA) est un produit de glycation non

enzymatique (produit d'Amadori) au même titre que l'hémoglobine glyquée (HbA1c) et les fructosamines (protéines glyquées plasmatiques). Les AGEs et la GA sont ici dosés à partir de kits commerciaux ELISA dont nous pouvons clairement remettre en cause la méthode et le développement puisque les déterminants antigéniques utilisés pour ce dosage immunologique semblent clairement croisés sinon chevauchant. En l'absence de corrélation avec les marqueurs de glycation ou du stress oxydant et de précisions sur les déterminants antigéniques utilisés dans la conception de ces kits réactifs, il nous apparaît clairement impossible de savoir ce que nous dosons précisément avec ces 2 méthodes de dosage. Les résultats en sont donc inexploitable et leur utilisation sera évitée pour nos projets de recherche futurs.

L'IMA, marqueur du stress oxydant, ne présente pas de variation significative d'expression entre les patients avec atteinte vasculaire et ceux sans atteinte vasculaire ; seule une tendance à une augmentation des valeurs de l'IMA est retrouvée entre les 2 groupes que nous avons constitué au cours de cette étude. Des résultats contradictoires ont pu être observés sur d'autres publications portant sur des patients diabétiques de type 2 souffrant d'AOMI¹¹⁸ ou encore de patients ayant présenté des AVC⁷³. Dans ces études, les patients diabétiques de type 2 souffrent de pathologies cardiovasculaires (macroangiopathie) sévères récentes voir évolutives au moment du dosage de l'IMA et d'autres marqueurs de glycation (HbA1c).

Dans le projet ERMIES, les patients souffrant de complications cardiovasculaires graves récentes (IM, AVC, SCA inférieures à un an) ou évolutives ont été exclus. Cette étude est descriptive et nous permet d'observer les données des patients inclus à un temps donné. Nous nous situons donc dans ce travail soit *a priori* soit *a posteriori* d'événements cardiovasculaires graves ce qui nous distingue des études citées précédemment. Au regard des résultats observés, nous ne pouvons conclure sur l'existence d'une association entre des valeurs élevées d'IMA et un niveau quelconque d'atteinte vasculaire. Les résultats observés aujourd'hui et ceux des études cités ci-dessus nous poussent donc à envisager une étude clinique prospective nous permettant d'évaluer les modifications d'expression sur plusieurs années (5 à 10 ans) des marqueurs du stress oxydant (IMA) et de la glycoxydation (AGEs) chez des patients diabétiques de type 2.

De plus, la population observée au cours de cette étude réalisée à partir des données d'inclusion d'ERMIES est constituée de patients ayant un diabète de type 2 très ancien, compliqué et déséquilibré (durée du diabète supérieure à 10ans et HbA1c supérieure à 7,5%) associé systématiquement à un syndrome métabolique (IMC >25). Si l'on peut distinguer deux groupes d'atteintes vasculaires à partir des recueils cliniques réalisés à l'inclusion de l'étude ERMIES, compte tenu de la durée du diabète, il semble donc très probable que la majeure partie des patients inclus aient pu présenter des événements vasculaires antérieurs au début de ce protocole.

Afin d'évaluer le caractère discriminant des différents biomarqueurs de glycation, du stress oxydant et de glycoxydation dans l'identification des atteintes vasculaires initiales des patients diabétiques de type 2, voir d'évaluer un caractère prédictif d'atteinte vasculaire chez les patients diabétiques de type 2 à partir de ces différents biomarqueurs ; il semble nécessaire d'élaborer un projet de recherche clinique permettant un recueil de données clinico-biologiques prospectif de patients diabétique de type 2 nouvellement pris en charge à l'aide d'outils permettant de caractériser le niveau d'atteinte vasculaire de ce ces patients. L'épaisseur intima-media carotidienne (IMT) mesurée par echotracking¹¹⁹ ou encore l'estimation de la rigidité artérielle par mesure de la vitesse d'onde de pouls¹²⁰ sont considérés aujourd'hui comme des critères de jugement substitutifs pertinents du niveau d'atteinte vasculaire et sont donc prédictifs du développement d'athérosclérose et d'évènements cardiovasculaires. L'utilisation de tels marqueurs phénotypiques permettrait d'évaluer précisément le niveau d'atteinte vasculaire des patients suivis facilitant ainsi l'évaluation de biomarqueurs circulants d'oxydation et de glycoxydation en association aux biomarqueurs usuels de glycation et aux autres facteurs de risque cardiovasculaire conventionnels. La durée d'une telle étude devra être suffisamment longue pour constater la survenue d'évènements cardiovasculaires au cours du diabète de type 2 (5 à 10 ans).

Les valeurs de dosage de l'IMA retrouvées dans cette étude portant sur des patients diabétiques de type 2 déséquilibrés ne sont pas comparables à celles retrouvées dans des études antérieures portant sur des populations de même type. En effet, la valeur moyenne d'IMA (DO) retrouvée ici est de 0,410 +/- 0,115 contre 0,535 +/- 0,125 (n= 80) dans l'étude

de Kaeffer *et al*¹¹⁵ et de 0,536 +/- 0,250 (n=290) dans l'étude de Shao Gang *et al*¹¹⁴. Ces deux études portent toutes deux sur des populations de patients diabétiques de type 2 à différents niveaux d'HbA1c et différents niveaux d'atteintes vasculaires. Nous constatons donc à la lecture de ces articles que les valeurs d'IMA retrouvées sont faiblement reproductibles d'une étude à l'autre. Une des causes pouvant expliquer cette faible reproductibilité est le manque de standardisation de cette méthode qui consiste en une mesure optique simple de la coloration résultant de la réaction entre un excès de Co^{2+} après réaction colorée avec du DTT¹⁰³. Les outils utilisés (spectrophotomètre) et la qualité des solutions mères de Co^{2+} et de DTT (tampon, qualité et conservation des substances pures) varient d'un laboratoire à l'autre.

L'intérêt nouveau de l'IMA dans l'évaluation du stress oxydant et du risque cardiovasculaire suscite aujourd'hui des études de plus en plus nombreuses^{72,73,18}. La standardisation de cette méthode de dosage aux moyens de solutions réactives commerciales standardisées et l'utilisation d'étalons permettrait d'améliorer l'analyse des différents travaux portant sur l'IMA et d'en mettre plus facilement en évidence l'intérêt comme biomarqueur du risque CVD.

En dehors du dosage de l'IMA, le développement de méthodes analytiques de séparation et de dosage des différentes fractions d'albumine modifiée au cours du diabète semble nécessaire pour identifier quelles fractions sont directement impliquées dans les mécanismes physiopathologiques des complications cardiovasculaires du diabète. Dans cet optique, l'utilisation de méthodes électrophorétiques comme l'électrophorèse capillaire ou encore de méthodes chromatographiques comme l'HPLC-MSMS semble tout à fait indiquée.

CONCLUSION

Les complications cardiovasculaires représentent la principale cause de mortalité du diabète de type 2. Ces atteintes vasculaires peuvent, même en l'absence d'expression clinique, être d'apparition précoce et évoluer progressivement tout au long de cette maladie métabolique chronique du vieillissement. L'ensemble des pathologies cardiovasculaires retrouvées au cours du diabète de type 2 trouvent leur origine dans le dysfonctionnement initial des cellules de l'endothélium vasculaire.

Le dysfonctionnement endothélial est dû au stress oxydant, via les effets directs néfastes des ROS sur la biodisponibilité du NO ou encore par activation du RAGE situé à la surface de ces cellules.

Au cours du diabète de type 2, l'hyperglycémie est associée à un stress oxydant important lié à une hyperproduction de ROS. Nous avons pu montrer que, ces phénomènes combinés, amènent à des modifications structurales et fonctionnelles complexes de l'albumine par mécanisme glycoxydatif. Nous pouvons en effet retrouver au cours du diabète de type 2 à la fois des formes glyquées, des formes oxydées et des formes glycoxydées (AGEs) d'albumine.

L'ensemble des modifications de l'albumine au cours du diabète va altérer sa capacité de liaison aux molécules endogènes et exogènes ainsi que son pouvoir antioxydant. Au delà de ces effets, nous avons pu aussi mettre en évidence que les formes modifiées de l'albumine pouvaient générer des effets cellulaires pro-inflammatoires et pro-oxydants sur des monocytes et des adipocytes par activation de la voie du NF- κ B et par une augmentation de l'expression du RAGE par ces cellules. Ces observations restent néanmoins à confirmer sur un modèle de cellules endothéliales avec des outils d'analyse mécanistique des voies d'activation du RAGE. Néanmoins, ces éléments confortent l'hypothèse selon laquelle les formes modifiées de l'albumine et plus certainement les formes AGEs auraient une implication directe dans la physiopathologie des complications vasculaires du diabète en initiant le phénomène de dysfonction endothéliale.

Les formes modifiées d'albumine pourraient donc constituer des biomarqueurs pertinents du dépistage précoce de l'atteinte vasculaire et permettraient d'améliorer ainsi la prise en charge et la prévention des complications des patients diabétiques de type 2. Il serait toutefois utile d'identifier si certaines de ces formes d'albumine modifiées sont plus directement impliquées dans ces effets cellulaires pro-oxydants et pro-inflammatoires : formes glyquées, formes oxydées ou encore formes glycoxydées (AGEs)?

Dans un second temps la mise au point d'une méthode de dosage rapide, standardisée et automatisable de ces fractions par méthode séparative, colorimétrique ou encore immunologique permettrait d'en évaluer plus facilement l'intérêt au cours d'une étude clinique prospective orientée sur le suivi vasculaire d'une cohorte de patients diabétiques de type 2 sur plusieurs années.

Pour finir, les voies glycoxydatives qui mènent aux modifications de protéines circulantes ou encore à l'activation des cellules endothéliales par ces mêmes protéines modifiées pourraient également constituer des cibles pharmacologiques d'intérêt permettant de retarder l'apparition des complications vasculaires du diabète de type 2.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Joseph JJ, Golden SH. Type 2 diabetes and cardiovascular disease: what next?]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes April 2014* 2014; **21**: 109–20.
- 2 Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes--2012. *Diabetes Care* 2011; **35**: S4–10.
- 3 Cosson E. [Diagnostic criteria for gestational diabetes mellitus]. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod* 2010; **39**: S239–50.
- 4 Monnier L. Diabétologie. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson, 2010.
- 5 Fédération International du Diabète. Atlas du Diabète 6ème Edition. 2013.
http://www.idf.org/sites/default/files/FR_6E_Atlas_full.pdf.
- 6 Fagot-Campagna A, Romon I, Fosse S, Roudier C. Prévalence et incidence du diabète, et mortalité liée au diabète en France – Synthèse épidémiologique. 2010; : 12.
- 7 Favier F, Jausset I, Moullec NL, *et al.* Prevalence of Type 2 diabetes and central adiposity in La Reunion Island, the REDIA Study. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; **67**: 234–42.
- 8 Fagot-Campagna A, Romon I, Fosse S, Roudier C. Prévalence et incidence du diabète, et mortalité liée au diabète en France – Synthèse épidémiologique. 2010; : 12.
- 9 Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes--2012. *Diabetes Care* 2011; **35**: S4–10.
- 10 American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2008. *Diabetes Care* 2008; **31 Suppl 1**: S12–54.
- 11 Procopiou M. [HbA1c: review and recent developments]. *Rev Médicale Suisse* 2006; **2**: 1473–4, 1476–9.
- 12 Gillery P. [Assays of HbA1c and Amadori products in human biology]. *Ann Pharm Fr* 2014; **72**: 330–6.
- 13 Kowall B, Rathmann W. HbA1c for diagnosis of type 2 diabetes. Is there an optimal cut point to assess high risk of diabetes complications, and how well does the 6.5% cutoff perform? *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther* 2013; : 477.
- 14 Féry F, Paquot N. [Etiopathogenesis and pathophysiology of type 2 diabetes]. *Rev Médicale Liège* 2005; **60**: 361–8.
- 15 Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev*

Immunol 2011; **11**: 98–107.

- 16 Muoio DM, Newgard CB. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 193–205.
- 17 Pinget M, Boullu-Sanchis S. [Physiological basis of insulin secretion abnormalities]. *Diabetes Metab* 2002; **28**: 4S21–32.
- 18 Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; **116**: 1793–801.
- 19 Monnier L, Thuan J-F. [Type 1 diabetes of the child and the adult. Type 2 diabetes of the adult. Complications of diabetes]. *Rev Prat* 2007; **57**: 653–64.
- 20 Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiol Rev* 2013; **93**: 137–88.
- 21 Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; **349**: 1436–42.
- 22 Romon I, Fosse S, Eschwège E, *et al*. Prevalence of macrovascular complications and cardiovascular risk factors in people treated for diabetes and living in France: the ENTRED study 2001. *Diabetes Metab* 2008; **34**: 140–7.
- 23 Kannel WB. Framingham study insights on diabetes and cardiovascular disease. *Clin Chem* 2011; **57**: 338–9.
- 24 Joseph JJ, Golden SH. Type 2 diabetes and cardiovascular disease: what next?. [Miscellaneous Article]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes April 2014* 2014; **21**: 109–20.
- 25 Lago RM, Nesto RW. Type 2 diabetes and coronary heart disease: focus on myocardial infarction. *Curr Diab Rep* 2009; **9**: 73–8.
- 26 Stratton IM, Adler AI, Neil HA, *et al*. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 2000; **321**: 405–12.
- 27 Adler AI, Stratton IM, Neil HA, *et al*. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ* 2000; **321**: 412–9.
- 28 Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, *et al*. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004; **364**:

685–96.

29 Diehm C, Kareem S, Lawall H. Epidemiology of peripheral arterial disease. *VASA Z Für Gefäßkrankh* 2004; **33**: 183–9.

30 Sethi A, Arora RR. Medical management and cardiovascular risk reduction in peripheral arterial disease. *Exp Clin Cardiol* 2008; **13**: 113–9.

31 WHO | The world health report 2003 - shaping the future. WHO. 2014; published online July 8. <http://www.who.int/whr/2003/en/> (accessed July 8, 2014).

32 Bonora E, Tessari R, Micciolo R, *et al.* Intimal-medial thickness of the carotid artery in nondiabetic and NIDDM patients. Relationship with insulin resistance. *Diabetes Care* 1997; **20**: 627–31.

33 Shah AS, Dolan LM, Kimball TR, *et al.* Influence of duration of diabetes, glycemic control, and traditional cardiovascular risk factors on early atherosclerotic vascular changes in adolescents and young adults with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 3740–5.

34 Park SW, Kim SK, Cho Y-W, *et al.* Insulin resistance and carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2009; **205**: 309–13.

35 Coccheri S. Approaches to prevention of cardiovascular complications and events in diabetes mellitus. *Drugs* 2007; **67**: 997–1026.

36 Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* 1990; **70**: 921–61.

37 Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 2003; **196**: 430–43.

38 Roberts AC, Porter KE. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes Vasc Dis Res Off J Int Soc Diabetes Vasc Dis* 2013; **10**: 472–82.

39 Sena CM, Pereira AM, Seiça R. Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 2013; **1832**: 2216–31.

40 Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 165–97.

41 Koulikoff F, Jeunemaître X. Coupe schématique d'une artère saine et d'une artère athéroscléreuse. Dossier Inserm : Atherosclerose. .

42 Münzel T, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A. Vascular Consequences of Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling for the Activity and Expression of the Soluble Guanylyl Cyclase and the cGMP-Dependent Protein Kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 1551–7.

- 43 Rask-Madsen C, King GL. Vascular Complications of Diabetes: Mechanisms of Injury and Protective Factors. *Cell Metab* 2013; **17**: 20–33.
- 44 deGoma EM, Leeper NJ, Heidenreich PA. Clinical significance of high-density lipoprotein cholesterol in patients with low low-density lipoprotein cholesterol. *J Am Coll Cardiol* 2008; **51**: 49–55.
- 45 Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; **364**: 937–52.
- 46 Walldius G, Jungner I. The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy--a review of the evidence. *J Intern Med* 2006; **259**: 493–519.
- 47 Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Neil HAW, Matthews DR. Long-term follow-up after tight control of blood pressure in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; **359**: 1565–76.
- 48 Lee WL, Cheung AM, Cape D, Zinman B. Impact of diabetes on coronary artery disease in women and men: a meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care* 2000; **23**: 962–8.
- 49 Bullen C. Impact of tobacco smoking and smoking cessation on cardiovascular risk and disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008; **6**: 883–95.
- 50 Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, *et al.* Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* 2005; **366**: 1640–9.
- 51 ANAES. Méthodes d'évaluation du risque cardiovasculaire. 2004.
- 52 Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; **97**: 1837–47.
- 53 Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; **339**: 229–34.
- 54 Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Circulation* 2002; **105**: 310–5.
- 55 Vinereanu D. Risk factors for atherosclerotic disease: present and future. *Herz* 2006; **31 Suppl 3**: 5–24.
- 56 Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP. [Oxidative stress]. *Rev*

Médicale Liège 2007; **62**: 628–38.

- 57 Gillery P. [Oxidative stress and protein glycation in diabetes mellitus]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2006; **64**: 309–14.
- 58 Delattre J, Bonnefont-Rousselot D, Bordas-Fonfrède M, Jaudon M. [Diabetes mellitus and oxidative stress]. *Ann Biol Clin (Paris)* 1999; **57**: 437–44.
- 59 Chiarelli F, Mohn A. Angiopathy in children with diabetes. *Minerva Pediatr* 2002; **54**: 187–201.
- 60 Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; **5**: 561–8.
- 61 Bonnefont-Rousselot D, Beaudoux J-L, Thérond P, Peynet J, Legrand A, Delattre J. [Diabetes mellitus, oxidative stress and advanced glycation endproducts]. *Ann Pharm Fr* 2004; **62**: 147–57.
- 62 Bourdon E, Blache D. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal* 2001; **3**: 293–311.
- 63 Rondeau P, Bourdon E. The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Biochimie* 2011; **93**: 645–58.
- 64 Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett* 2008; **582**: 1783–7.
- 65 Bourdon E, Loreau N, Lagrost L, Blache D. Differential effects of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin. *Free Radic Res* 2005; **39**: 15–20.
- 66 Aruoma OI, Landes B, Ramful-Baboolall D, *et al.* Functional benefits of citrus fruits in the management of diabetes. *Prev Med* 2012; **54**, **Supplement**: S12–6.
- 67 Hatia S, Septembre-Malaterre A, Le Sage F, *et al.* Evaluation of antioxidant properties of major dietary polyphenols and their protective effect on 3T3-L1 preadipocytes and red blood cells exposed to oxidative stress. *Free Radic Res* 2014; **48**: 387–401.
- 68 Place des produits de glycation avancés (AGEs) dans les complications du diabète. EM-Consulte. 2014; published online July 9. <http://www.em-consulte.com/article/277761/figures/place-des-produits-de-glycation-avancees-lagesr-dan> (accessed July 9, 2014).
- 69 Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia—a preliminary report. *J Emerg Med* 2000; **19**:

311–5.

70 Bar-Or D, Curtis G, Rao N, Bampos N, Lau E. Characterization of the Co²⁺ and Ni²⁺ binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 42–8.

71 Bar-Or D, Rael LT, Bar-Or R, *et al.* The cobalt–albumin binding assay: Insights into its mode of action. *Clin Chim Acta* 2008; **387**: 120–7.

72 Zhong Y, Wang N, Xu H, Hou X, Xu P, Zhou Z. Ischemia-modified albumin in stable coronary atherosclerotic heart disease: clinical diagnosis and risk stratification. *Coron Artery Dis* 2012; **23**: 538–41.

73 Gunduz A, Turedi S, Mentese A, *et al.* Ischemia-modified albumin levels in cerebrovascular accidents. *Am J Emerg Med* 2008; **26**: 874–8.

74 Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P. Current role of ischemia-modified albumin in routine clinical practice. *Biomarkers* 2010; **15**: 655–62.

75 Piwowar A, Knapik-Kordecka M, Warwas M. Ischemia-Modified albumin level in type 2 diabetes mellitus—Preliminary report. *Dis Markers* 2008; **24**: 311–7.

76 Baraka-Vidot J, Navarra G, Leone M, Bourdon E, Militello V, Rondeau P. Deciphering metal-induced oxidative damages on glycated albumin structure and function. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* 2014; published online Feb 17.

DOI:10.1016/j.bbagen.2013.12.017.

77 Rondeau P, Singh NR, Caillens H, Tallet F, Bourdon E. Oxidative stresses induced by glycoxidized human or bovine serum albumin on human monocytes. *Free Radic Biol Med* 2008; **45**: 799–812.

78 Gillery P. [Advanced glycation end products (AGEs), free radicals and diabetes]. *J Société Biol* 2001; **195**: 387–90.

79 Anguizola J, Matsuda R, Barnaby OS, *et al.* Review: Glycation of human serum albumin. *Clin Chim Acta* 2013; **425**: 64–76.

80 Gillery P, Jaisson S. Post-translational modification derived products (PTMDPs): toxins in chronic diseases? *Clin Chem Lab Med* 2014; **52**. DOI:10.1515/cclm-2012-0880.

81 Wauthier J. Produits avancés de glycation AGE et complications vasculaires dans le diabète. *médecine/sciences* 1994; **10**: 1165.

82 Wautier JL, Wautier M-P. Produits de glycation avancée et système vasculaire. */data/revues/19572557/00040006/633/* 2010; published online Dec 30. <http://www.em->

consulte.com/en/article/277760 (accessed July 9, 2014).

83 Place des produits de glycation avancés (AGEs) dans les complications du diabète.

EM-Consulte. <http://www.em-consulte.com/article/277761/figures/place-des-produits-de-glycation-avancees-lagesr-dan> (accessed July 9, 2014).

84 Singh R, Kaur N, Kishore L, Gupta GK. Management of diabetic complications: a chemical constituents based approach. *JEthnopharmacol* 2013; **150**: 51–70.

85 Bourdon E, Loreau N, Blache D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 1999; **13**: 233–44.

86 Chilelli NC, Burlina S, Lapolla A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: A 'glycoxidation-centric' point of view. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013; **23**: 913–9.

87 Grossin N, Boulanger E, Wautier M-P, Wautier J-L. The different isoforms of the receptor for advanced glycation end products are modulated by pharmacological agents. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010; **45**: 143–53.

88 Kalea AZ, Schmidt AM, Hudson BI. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clin Sci Lond Engl* 1979 2009; **116**: 621–37.

89 Gillery P. [Advanced glycation end products (AGEs), free radicals and diabetes]. *J Société Biol* 2001; **195**: 387–90.

90 Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001; **108**: 949–55.

91 Wauthier J. Produits avancés de glycation AGE et complications vasculaires dans le diabète. *médecine/sciences* 1994; **10**: 1165.

92 Gawdzik J, Mathew L, Kim G, Puri TS, Hofmann Bowman MA. Vascular remodeling and arterial calcification are directly mediated by S100A12 (EN-RAGE) in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 2011; **33**: 250–9.

93 Chawla D, Bansal S, Banerjee BD, Madhu SV, Kalra OP, Tripathi AK. Role of advanced glycation end product (AGE)-induced receptor (RAGE) expression in diabetic vascular complications. *Microvasc Res* 2014; **95C**: 1–6.

94 Yan SD, Stern D, Kane MD, Kuo YM, Lampert HC, Roher AE. RAGE-Abeta interactions in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Restor Neurol Neurosci* 1998; **12**: 167–73.

95 Taguchi A, Blood DC, del Toro G, *et al.* Blockade of RAGE-amphoterin signalling

- suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 2000; **405**: 354–60.
- 96 Daffu G, del Pozo CH, O'Shea KM, Ananthkrishnan R, Ramasamy R, Schmidt AM. Radical roles for RAGE in the pathogenesis of oxidative stress in cardiovascular diseases and beyond. *Int JMol Sci* 2013; **14**: 19891–910.
- 97 Carter DC, Ho JX. Structure of Serum Albumin. In: C.B. Anfinsen JTE, Frederic M. Richards and David S. Eisenberg, ed. *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press, 1994: 153–203.
- 98 Guerin-Dubourg A, Catan A, Bourdon E, Rondeau P. Structural modifications of human albumin in diabetes. *Diabetes Metab* 2012; **38**: 171–8.
- 99 Baraka-Vidot J, Guerin-Dubourg A, Bourdon E, Rondeau P. Impaired drug-binding capacities of in vitro and in vivo glycated albumin. *Biochimie* 2012; **94**: 1960–7.
- 100 Zmatliková Z, Sedláková P, Lacinová K, Eckhardt A, Pataridis S, Mikšík I. Non-enzymatic posttranslational modifications of bovine serum albumin by oxo-compounds investigated by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and capillary zone electrophoresis-mass spectrometry. *JChromatogr A* 2010; **1217**: 8009–15.
- 101 Ahmad W, Li L, Deng Y. Identification of AGE-precursors and AGE formation in glycation-induced BSA peptides. *BMB Rep* 2008; **41**: 516–22.
- 102 Thornalley PJ, Rabbani N. Detection of oxidized and glycated proteins in clinical samples using mass spectrometry — A user's perspective. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* 2014; **1840**: 818–29.
- 103 Lee E, Eom J-E, Jeon K-H, et al. Evaluation of albumin structural modifications through cobalt-albumin binding (CAB) assay. *JPharm Biomed Anal* 2014; **91**: 17–23.
- 104 Cohen MP, Shea E, Chen S, Shearman CW. Glycated albumin increases oxidative stress, activates NF- κ B and extracellular signal-regulated kinase (ERK), and stimulates ERK-dependent transforming growth factor- β 1 production in macrophage RAW cells. *JLab Clin Med* 2003; **141**: 242–9.
- 105 Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. International Diabetes Federation: a consensus on Type 2 diabetes prevention. *Diabet Med JBr Diabet Assoc* 2007; **24**: 451–63.
- 106 Ndong JR, Romon I, Druet C, et al. Caractéristiques, risque vasculaire, complications et qualité des soins des personnes diabétiques dans les départements d'outre-mer et comparaison à la métropole : Entred 2007-2010, France. 2010
http://opac.invs.sante.fr/index.php?lvl=notice_display&id=502.

- 107 WHO | Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. WHO. 2014; published online Jan 13.
http://www.who.int.gate2.inist.fr/diabetes/publications/diagnosis_diabetes2011/en/
(accessed Jan 13, 2014).
- 108 Fox CS. Cardiovascular Disease Risk Factors, Type 2 Diabetes Mellitus, and the Framingham Heart Study. *Trends Cardiovasc Med* 2010; **20**: 90–5.
- 109 Furusyo N, Hayashi J. Glycated albumin and diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* 2013; **1830**: 5509–14.
- 110 Song SO, Kim KJ, Lee B-W, Kang ES, Cha BS, Lee HC. Serum glycated albumin predicts the progression of carotid arterial atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2012; **225**: 450–5.
- 111 Roy D, Kaski JC. Ischemia-Modified Albumin: The Importance of Oxidative Stress. *J Am Coll Cardiol* 2007; **49**: 2375–6.
- 112 Sbarouni E, Georgiadou P, Voudris V. Ischemia modified albumin changes – review and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2011; **49**. DOI:10.1515/CCLM.2011.037.
- 113 Baraka-Vidot J, Guerin-Dubourg A, Dubois F, Payet B, Bourdon E, Rondeau P. New insights into deleterious impacts of in vivo glycation on albumin antioxidant activities. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* 2013; **1830**: 3532–41.
- 114 Shao-gang Ma, Shao-gang Ma, Yao Jin, *et al.* Evaluation of Ischemia-Modified Albumin and C-Reactive Protein in Type 2 Diabetics With and Without Ketosis. *Biomark Insights* 2012; : 19.
- 115 Kaefer M, Piva SJ, De Carvalho JAM, *et al.* Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2010; **43**: 450–4.
- 116 Giacco F, Brownlee M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ Res* 2010; **107**: 1058–70.
- 117 Ho E, Karimi Galougahi K, Liu C-C, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol* 2013; **1**: 483–91.
- 118 Ma S-G, Wei C-L, Hong B, Yu W-N. Ischemia-modified albumin in type 2 diabetic patients with and without peripheral arterial disease. *Clinics* 2011; **66**: 1677–80.
- 119 Katakami N, Kaneto H, Shimomura I. Carotid ultrasonography: A potent tool for better clinical practice in diagnosis of atherosclerosis in diabetic patients. *J Diabetes Investig* 2014; **5**: 3–13.

120 Liao J, Farmer J. Arterial stiffness as a risk factor for coronary artery disease. *Curr Atheroscler Rep* 2014; **16**: 387.

Abstract

Structural and functional impairments of albumin in type 2 diabetes – Focus on cardiovascular disease-associated biomarker identification

Type 2 diabetes is dramatically associated with an enhanced cardiovascular complication risk. The identification of novel biomarkers associated with endothelial dysfunction remains highly warranted to improve diabetes screening and prevention. Oxidative stress and protein modifications are frequently observed in numerous disease states. Albumin, the major circulating protein in blood, can undergo increased glycooxidation in diabetes. Objectives of my thesis were to clarify the impact of glycooxidative modification of albumin on its structure and its functions and to determine whether such impairments may be encountered in albumin purified from diabetics. The occurrence of oxidative modifications was found to be enhanced in vitro glycooxidized HSA and albumin purified from diabetics, after determination of their free thiol group content, relative electrophoretic migration, carbonyl content, and antioxidant activities. In addition, glycooxidized albumin exhibited impaired pharmaceutical molecule binding capacities. Cells treated with glycooxidized albumin exhibited a proinflammatory state attested by an overgeneration of intracellular reactive oxygen species, enhancements in RAGE expression, and an accumulation of carbonylated proteins. Methods to detect IMA (ischemia modified albumin) were developed and applied to diabetics patients. Relationships have been established between specific pathological parameters (cardiovascular disorders, hyperglycemia...) with an enhanced glycooxidative modification of albumin in diabetics. We thus propose that impaired albumin structure and function in relation in the enhanced oxidant stress observed in diabetics might be involved in the increased mortality risk of these patients.

Subject: Biochemistry and molecular biology

Keywords : Type 2 Diabetes, endothelial dysfunction, albumin, oxydative stress, glycoxydation, AGEs, RAGE, IMA

Résumé

Etude des modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine dans le diabète de type 2 : identification de biomarqueurs de glycoxydation et de facteurs de risque de complications vasculaires

La mortalité du diabète de type 2 est liée à ses complications cardiovasculaires (CVD). L'identification de nouveaux biomarqueurs associés à la dysfonction endothéliale, permettrait d'en améliorer le dépistage, la prévention.

Au cours du diabète de type 2, l'hyperglycémie est associée à un fort stress oxydant. Nous nous sommes proposés ici d'évaluer l'impact de la glycoxydation sur la principale protéine circulante, l'albumine, et d'identifier si les modifications glycoxydatives de l'albumine dans le diabète avait un rôle dans la physiopathologie des CVD du diabète de type 2. Nous avons pu mettre en évidence des modifications structurales et fonctionnelles importantes de l'albumine au cours du diabète de type 2 avec la formation entre autres de produits avancés de glycation (AGEs). Ces modifications glycoxydatives sont associées à des effets cellulaires pro-oxydant et pro-inflammatoire via une augmentation de l'expression du RAGE.

Ces observations suggèrent que les formes glycoxydées d'albumine présentent un rôle central dans les mécanismes menant à la dysfonction endothéliale. Il reste néanmoins à évaluer l'intérêt du dosage des formes modifiées de l'albumine dans le dépistage des CVD au cours d'une étude clinique prospective de grande ampleur. Le développement d'une méthode de dosage rapide et reproductible des fractions d'albumine modifiées, comme celui de l'IMA (albumine modifiée par l'ischémie), en faciliterait la mise en œuvre.

Discipline: Biochimie et biologie moléculaire

Mots-clés: Diabète type 2, dysfonction endothéliale, albumine, stress oxydant, glycoxydation, AGEs, RAGE, IMA