HAL
open science

Stress oxydant et pathologie diabétique à l'île de La Réunion – Identification et caractérisation des propriétés structurales et fonctionnelles de l'albumine glyquée

Jennifer Baraka-Vidot

To cite this version:

Jennifer Baraka-Vidot. Stress oxydant et pathologie diabétique à l'île de La Réunion – Identification et caractérisation des propriétés structurales et fonctionnelles de l'albumine glyquée. Médecine humaine et pathologie. Université de la Réunion, 2014. Français. NNT : 2014LARE0013 . tel-01155664

HAL Id: tel-01155664

https://theses.hal.science/tel-01155664v1

Submitted on 27 May 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.

UNIVERSITE DE LA REUNION

THESE

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

Spécialité : BIOCHIMIE

- Stress oxydant et pathologie diabétique à l'île de La Réunion - Identification et caractérisation des propriétés structurales et fonctionnelles de l'albumine glyquée

Par

Jennifer BARAKA-VIDOT

Soutenue publiquement le mercredi 03 décembre 2014

Pr. Philippe GILLERY	Professeur et Praticien Hospitalier, CHU Reims	Rapporteur
Pr. Jean Luc WAUTIER	Professeur, Université Denis Diderot, Paris	Rapporteur
Pr. Damien GRUSON	Professeur, Clinique Universitaire St Luc, Bruxelles	Examinateur
Dr. Maxime	Docteur et Praticien Hospitalier, CH G.Martin, St Paul	Examinateur
Dr. Marjolaine ROCHE	Maître de Conférences, Université de La Réunion	Examinatrice
Pr Emmanuel BOURDON	Professeur, Université de La Réunion	Directeur
Dr-HDR Philippe RONDEAU	Ingénieur d'Etudes, Université de La Réunion	Co-Directeur

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au sein du Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO) EA 4516 de la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de La Réunion, dirigé par le Pr. Christian LEFEBVRE D'HELLENCOURT. Ce travail a été rendu possible grâce au soutien financier du Conseil Régional de La Réunion et des fonds européens.

A **Monsieur Christian LEFEBVRE D'HELLENCOURT**,
Directeur du Laboratoire GEICO

Je te remercie de m'avoir accueillie au sein de ton équipe et de m'avoir permis de réaliser ce travail. Je t'exprime ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A **Monsieur le professeur Emmanuel BOURDON**, Directeur de thèse.

Manu, merci pour ces trois années passées à tes cotés qui ont été riches d'enseignements, de conseils et d'encouragements. Tu es pour moi la personne qui incarne le mieux la « zenitude » et je voudrais te dire merci pour ce positivisme même si cela me stressait des fois. Je te suis très reconnaissante de m'avoir donné la chance de travailler avec toi au sein de la « glycteam ». Toi et Philippe, vous formez un binôme complémentaire sans qui je n'aurais pas pu réaliser tout ce travail.

A **Monsieur le Docteur Philippe RONDEAU**, co-Directeur de thèse.

Philippe, je te remercie de m'avoir accompagné pendant toutes ces dernières années dans le monde de la Recherche. Merci de m'avoir prodigué tes précieux conseils techniques avisés pour toutes ces « manips » tout au long de cette thèse. Je te remercie aussi de m'avoir fait partager ta passion pour la recherche scientifique. Même si des fois tu es un peu trop « speed » pour moi, j'ai su m'accrocher. Je te suis reconnaissante pour ta patience, ton aide et le temps que tu as bien voulu me consacrer pour la réalisation de ce manuscrit. Tous les chocolats du monde ne suffiraient pas pour exprimer toute ma reconnaissance. Je dirais tout

simplement que tu as été pour moi un « Père » de la Recherche et que j'ai grandi grâce à toi. J'espère pouvoir travailler encore longtemps à tes cotés.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux personnalités scientifiques qui ont accepté de juger ce travail :

Monsieur Philippe GILLERY,
Professeur et Praticien Hospitalier, CHU Reims

Monsieur Jean Luc WAUTIER,
Professeur, Université Denis Diderot, Paris

Monsieur Damien GRUSON,
Professeur, Clinique Universitaire St Luc, Bruxelles

Monsieur Maxime COURNOT,
Docteur et Praticien Hospitalier, CH Gabriel Martin, St Paul

Madame Marjolaine ROCHE,
Maître de Conférences, Université de La Réunion

Je vous remercie vivement de me faire l'honneur de consacrer une partie de votre temps pour juger ce travail. Que vous soyez assurés de l'expression de mon profond respect.

A **Monsieur Alexis GUERIN-DUBOURG**

Je tiens à te remercier pour ton aide et tes conseils concernant l'étude pharmacologique. Merci de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail avec des patients diabétiques en me fournissant des échantillons sanguins et plasmatiques.

A **Indira DENEMONT** et **Zaïnabou ALI-MCOLO**

Vous avez été des stagiaires exemplaires et je vous remercie d'avoir contribué à la réalisation de certaines études de ce manuscrit.

Je remercie **Monsieur Bertrand PAYET** et **Mademoiselle Axelle SEPTEMBRE-MALATERRE** de m'avoir fait bénéficier de leurs expertises sur la méthode ORAC.

A **Madame Valeria MILITELLO**, Professeur en biophysique à l'Université de Palerme
et **Madame Giovanna NAVARRA**
Je vous remercie, vous et votre équipe, pour votre collaboration à une partie de mes travaux qui a fortement contribué à la réalisation de l'étude structurale de l'albumine.

Je tiens aussi à remercier les enseignants qui m'ont permis d'assurer des travaux dirigés et pratiques au sein de leur équipe pédagogique :

Madame Christine ROBERT DA SILVA, Maître de conférences en Biochimie

Monsieur Jean Marc JACQUES, Maître de conférences en Physiologie animale

Monsieur Fabrice GARDEBIEN, Maître de conférences en Biochimie

Merci de m'avoir fait bénéficier de ces heures d'enseignement qui ont été pour moi très enrichissantes et qui ont éveillé en moi le goût pour l'enseignement.

A Monsieur Nicolas DIOTEL,
Merci de m'avoir prêté ton bureau afin que je puisse rédiger ce manuscrit avec inspiration. Je te remercie avant tout pour tous tes conseils et encouragements que tu as su me donner lors de mes baisses de moral.

Je remercie **Monsieur Olivier MEILLAC** qui est sûrement l'une des seules personnes pressée de lire ces remerciements. Merci Olivier pour ton humour qui a su me faire oublier le stress tout au long de ces heures de rédaction mais aussi pour tes conseils, en espérant pourvoir faire partie un jour de ta future équipe DéTROI.

A tous les **membres du GEICO**, **enseignants**, **thésards**, **ingénieurs**, **techniciens** et tout particulièrement Cynthia, Florence, Aurélie, Méry, Giovédie, Axelle, Jessica et Sarah.
Je vous remercie pour toutes ces aventures mémorables à la paillasse et dans les couloirs du labo ainsi que pour votre complicité.

Merci à tous les membres et thésards du **GRI** pour les bons moments passés en leurs compagnies, ainsi que tous les membres du **CYROI** pour leurs convivialités.

Merci à **Dodo**, **Honorine** et **Maureen** d'avoir contribué à la relecture de ce manuscrit mais aussi de m'avoir encouragé dans les moments difficiles.

Enfin, merci à toi **Matthieu** de m'avoir soutenu pendant toutes ces nuits de rédaction et d'avoir été l'épaule sur laquelle me reposer. Je te suis reconnaissante pour toute la patience, l'encouragement que tu as su me donner pendant toutes ces années d'études.

J'adresse enfin mes remerciements à tous mes proches, amis et famille pour m'avoir soutenu tout au long de cette thèse.

A ma famille, mes parents, mon frère et ma sœur,

Et à Matthieu,

« De la discussion jaillit la lumière »

Proverbe indien

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES **14**

LISTE DES TABLEAUX **15**

LISTE DES ABREVIATIONS **16**

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **19**

I. CONTEXTE SOCIETAL A « L'ORIGINE DES MALADIES METABOLIQUES » **21**

I.1--- CHANGEMENT DE MODE DE VIE : SOCIETE DE CONSOMMATION ET SEDENTARITE 21

I.2--- APPARITIONS DE MALADIES METABOLIQUES : LE DIABETE 22

I.3--- QUELQUES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES SUR LE DIABETE 22

II. LE DIABETE ET SES COMPLICATIONS **24**

II.1 LE DIABETE 24

II.1.1 Le métabolisme de contrôle de la glycémie *24*

II.1.2. Les deux acteurs principaux de la régulation : l'insuline et le glucagon *26*

II.1.3 La pathologie diabétique *28*

II 2. LES CONSEQUENCES MOLECULAIRES DE L'HYPERGLYCEMIE : LA GLYCOXYDATION ET LE STRESS OXYDANT 31

II. 2.1. La glycation ou glycoxydation *32*

II.2.2. Le stress oxydant *36*

II.2.3 Effet synergique entre le phénomène de glycation et le stress oxydant *45*

II.3 --- LES CONSEQUENCES DE LA GLYCOXYDATION : LES PROTEINES AVANCEES DE GLYCATION 47

II.3.1 Les AGE *47*

II. 3.2 Les récepteurs aux AGE *50*

II.3.3. AGE et complications associées *52*

III.3.4 Elimination des AGE *54*

III. L'ALBUMINE : UN MODELE DE GLYCATION **56**

III.1--- GENERALITES SUR L'ALBUMINE 56

III.2--- *STRUCTURE DE L'ALBUMINE* *57*

III.3--- *LES FONCTIONS DE L'ALBUMINE* *59*

III.3.1--- Régulateur de la pression oncotique *59*
III.3.2--- Protecteur de l'organisme *59*
III.3.3--- Effet antioxydant *60*
III.3.4--- Les fonctions de transport *63*
III.3.5--- Les fonctions enzymatiques *69*

IV. L'ALBUMINE DANS LA PATHOLOGIE DIABETIQUE **74**

OBJECTIFS DU TRAVAIL **76**

PARTIE EXPERIMENTALE **79**

CHAPITRE 1 ..... **81**

ETUDE COMPARATIVE DES PROPRIETES ANTIOXYDANTES DE L'ALBUMINE GLYQUEE *IN VITRO* ET *IN VIVO,* DANS LE CADRE DE LA PATHOLOGIE DIABETIQUE **81**

INTRODUCTION *83*
RÉSULTATS *84*
Article 1 : « New insights into deleterious impacts of in vivo glycation on albumin antioxidant activities ». *84*
DISCUSSION *99*
RESULTATS COMPLEMENTAIRES : « STRATEGIE DE PURIFICATION DE L'ALBUMINE » 100
Introduction *100*
Matériels et méthodes *101*
Résultats *103*
Discussion *105*
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 106

CHAPITRE 2 ..... **107**

ETUDE DES PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DE L'ALBUMINE GLYQUEE *IN VIVO* ET *IN VITRO* **107**

INTRODUCTION *108*
RESULTATS 108
Article 2 : « Impaired drug--- binding capacities of in vitro and in vivo glycated albumin » ... *108*
Article 3 : «Glycation alters ligand--- binding, enzymatic and pharmacological properties of

human albumin » *117*

DISCUSSION *139*

RESULTATS COMPLEMENTAIRES : « DELIPIDATION DE L'ALBUMINE » 140

Introduction *140*

Matériels et méthode *141*

Résultats *144*

Discussion *147*

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 148

CHAPITRE 3 ..... **149**

ETUDE DE L'IMPACT DES METAUX SUR LA STRUCTURE ET LA FONCTION DE L'ALBUMINE GLYQUEE **149**

INTRODUCTION *150*

RÉSULTATS *151*

Article 4 : « Deciphering metal--- induced oxidative damages on glycated albumin structure and function » *151*

DISCUSSION *169*

CONCLUSION *170*

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES **173**

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES ISSUES DE CETTE THESE **181**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **182**

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Évolution de l'homme vers une société de consommation 21

Figure 2. Le diabète dans le monde (2010) (source : International Diabetes Federation) 22

Figure 3. Le pancréas et la distribution des différents types cellulaires dans un îlot de Langerhans *(source : Pearsons Education,Inc)* 25

Figure 4. Structure primaire de l'insuline *(source : Takween)* 26

Figure 5. Structure primaire du glucagon *(Source : Diapedia)* 27

Figure 6. Métabolisme d'un patient atteint du diabète de type I 29

Figure 7. Métabolisme d'un patient atteint du diabète de type II 30

Figure 8. Les différentes étapes de la glycoxydation dans le temps 33

Figure 9. Formation de la base de Schiff 33

Figure 10. Formation de produit d'Amadori 34

Figure 11. Formation d'AGE 35

Figure 12. Le stress oxydant 36

Figure 13. Les principaux radicaux libres et les mécanismes de détoxification [27] 38

Figure 14. Réaction de Fenton 40

Figure 15. Les principales réactions de détoxification 43

Figure 16. Effet synergique de la glycation et du stress oxydant 46

Figure 17. Structures de quelques produits avancés de glycation (AGEs) [104] 50

Figure 18. Les différents récepteurs aux AGE 50

Figure 19. RAGE : le récepteur des AGE 51

Figure 20. Effets de la fixation des AGE sur leurs récepteurs RAGE 53

Figure 21. Structure tridimensionnelle de l'albumine [115]. 57

Figure 22. Les domaines et sous-domaines de l'albumine (L = loops ou boucle) (*sources : Peters T.)* 58

Figure 23. Les différentes voies de transport de l'albumine [27] 64

Figure 24. Quelques exemples de site de liaison de l'albumine observée par cristallographie rayon X [177] 66

Figure 25. Structure de la Warfarine® 68

Figure 26. Structures des énantiomères *R*- et *S*-Kétoprofène 68

Figure 27. Caractérisation structurale de l'albumine purifiée par différentes méthodes 104

Figure 28. Evaluation biochimique de l'impact de la délipidation sur l'albumine commerciale et sur l'albumine purifiée à partir de plasma 144

Figure 29. Mesure de la fluorescence du tryptophane (a) et de l'ANSA (b) sur des échantillons d'albumine délipidée ou non. 145

Figure 30. Evaluation de l'activité antioxydante à travers le test d'hémolyse (a) et ORAC (b) de différentes préparations d'albumines délipidées ou non. 146

Figure 31. Evaluation des paramètres pharmacologiques de l'albumine commerciale et purifiée, délipidée ou non. 146

Figure 32. Schéma bilan sur les altérations structurales et fonctionnelles de l'albumine modifiée 178

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Exemples de ligands à grande affinité pour l'albumine, liés au site I ou II [1] 66

Tableau II. Tableau récapitulatif des critères de rendement, volume et temps de chaque purification. 105

LISTE DES ABREVIATIONS

AAPH	2, 2'-azobis (2-amidinopropane)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	Advanced glycation end products
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
ANSA	Acide 8-anilino-1-naphthalenesulfonique
ARN	L'acide ribonucléique
AS	Ammonium sulfate
ATP	Adénosine triphosphate
AUC	Area under curve
BCA	Acide bicinchoninique
BCG	Vert de bromocrésol
BSA	Sérum albumine bovine
CEL	$^{\varepsilon}$N(carboxy)éthyl/lysine
CLHP	Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance
CMA	$^{\varepsilon}$N-carboxyméthylarginine
CME	Concentration minimale efficace
CML	N-(carboxymethyl)lysine
CMT	Concentration toxique minimale
Cys-34	Cystéine 34
DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DID	Diabète insulinodépendant
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNID	Diabète non-insulinodépendant
DNPH	2,4-dinitrophenylhydrazine
DTNB	Acide 5-5'-dithiobis, 2-nitrobenzoique
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
F3LP	Fructosyllysine-3-phosphate
F3NK	Fructosamine-3-kinase

G6P	Glucose-6-phosphate
GOLD	Glyoxallysinedimère
GSH	Glutathion peroxydase
HbA_{1C}	Hémoglobine glyquée
HRP	HorseRadish Peroxydase
HT_{50}	Temps de demie hémolyse
HLA	Human leukocyte antigen
HSA	Sérum albumine humaine
Ig	Immunoglobulines
Il-1a	Interleukin-1 alpha
IL6	Interleukine 6
IMC	Indices de masse corporelle
Kd	Constante de dissociation
LDL	Lipoprotéines de basse densité
MGO	Methylglyoxal
MOLD	Méthylglyoxallysinedimère
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NFkb	Nuclear factor-kappa B
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PAGE	PolyAcrylamid Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PNPA	Para-nitrophényl acétate
PMSR	Peptide méthionine sulfoxyde réductase
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RAGE	Récepteurs membranaires spécifiques des AGE
RClS	Chloride Reactive Species
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Superoxyde dismutase
SVF	Sérum de veau foetal
TNF-a	Facteur de nécrose tumorale

TRP	Tryptophane
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. CONTEXTE SOCIETAL A « L'ORIGINE DES MALADIES METABOLIQUES »

I.1- Changement de mode de vie : Société de consommation et sédentarité

Depuis l'ère industrielle, on a assisté à une évolution considérable des modes de vie de l'homme moderne, voyant ainsi l'apparition de nouvelles technologies facilitant certains gestes du quotidien et modifiant ses habitudes, notamment dans le domaine de l'alimentation. Les pays industrialisés sont désormais confrontés à des modes de vie qui associent une alimentation peu équilibrée (riche en sucres et en graisses, restauration rapide…) et une sédentarité croissante (manque d'activité physique). Ces changements se sont opérés avec l'industrialisation, l'urbanisation et la mécanisation **(Figure 1)**. Si les sociétés industrialisées dites « sociétés de consommation », ont été les premières concernées avec leurs richesses, les pays en développement adoptent désormais les mêmes pratiques.

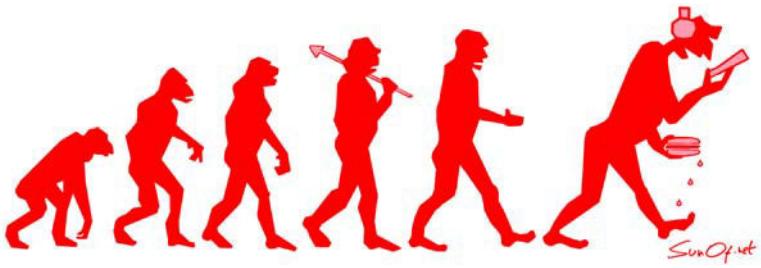


Figure 1. Évolution de l'homme vers une société de consommation

Cette évolution dans nos comportements alimentaires et sanitaires explique l'apparition et le développement fulgurant de maladies métaboliques comme l'obésité et le diabète depuis le siècle dernier.

I.2- Apparitions de maladies métaboliques : le diabète

Les habitudes alimentaires actuelles accroissent le risque d'apparition de maladies métaboliques, qui peuvent non seulement diminuer l'espérance de vie, mais aussi engendrer l'apparition de nouvelles pathologies [2].

Ces maladies métaboliques surviennent le plus souvent en raison de la défaillance d'un organe ou d'une voie métabolique importante, d'origine génétique ou environnementale, comme dans le cas du diabète. En effet, parmi les causes du diabète figurent notamment les facteurs de prédisposition (gènes, antécédents familiaux...). Mais ce sont surtout des facteurs sociaux et environnementaux (liés aux modes de vie) qui expliquent l'accroissement constant de la prévalence pour cette maladie : surpoids, obésité, manque d'activité physique, sédentarité constituent les principales causes [3].

I.3- Quelques données épidémiologiques sur le diabète

De plus en plus de personnes sont touchés par ce fléau, que l'on n'hésite pas à qualifier maintenant de pandémie [4]. En effet, le diabète peut être considéré comme une maladie émergente. Cette maladie se développe de manière épidémique depuis quelques décennies et sa prévalence augmente fortement et rapidement dans tous les pays, principalement dans les pays industrialisés, mais aussi dans les pays pauvres **(Figure 2)**.

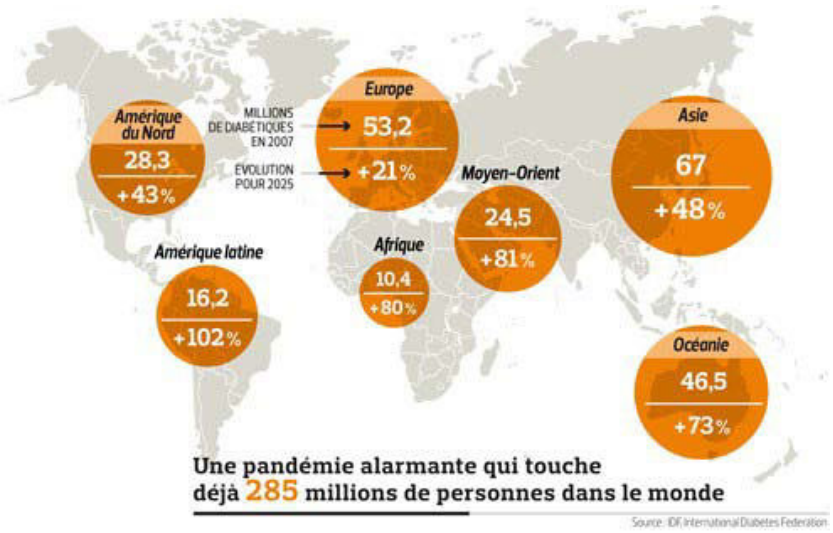


Figure 2. Le diabète dans le monde (2010) (source : International Diabetes Federation)

De plus, le vieillissement de la population, le dépistage précoce et l'amélioration de l'espérance de vie des personnes traitées pour le diabète augmentent mécaniquement les chiffres.

La prévalence pour cette maladie, c'est-à-dire le pourcentage de personnes atteintes du diabète à un moment donné dans une population donnée, est en pleine expansion. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'à l'heure actuelle 371 millions de personnes vivent avec le diabète. Si aucune mesure sérieuse n'est prise, ce chiffre est susceptible de doubler d'ici à 2030 [4].

Le nombre de diabétiques, fortement élevé en Europe (53,2 millions), aux États-Unis (26,8 millions), mais également en Asie du Sud-est et notamment en Inde (50,8 millions), montre le caractère pandémique de cette maladie [4].

Si la France métropolitaine possède une prévalence d'environ 4,4 %, avec 3 millions de diabétiques traités pharmacologiquement, les régions et départements d'outre-mer sont encore plus touchés par cette pathologie [3]. Selon l'étude Réunion-diabète (REDIA) effectuée en 2008, 11,2 % des réunionnais de 30 à 69 ans déclaraient l'existence d'un diabète, soit une prévalence près de 4 fois plus élevée qu'en métropole (prévalence estimée à environ 3 % en métropole en 2008) [5 , 6].

À cause de son caractère épidémique et de sa progression fulgurante, le diabète est devenu l'une des premières préoccupations de santé publique. Les conséquences du diabète en termes de mortalité, de morbidité et de coûts financiers ou humains, prennent une ampleur particulièrement importante. En effet, cette maladie est associée à de nombreuses complications métaboliques participant à une augmentation de la mortalité et de la morbidité, avec pour conséquence un coût financier très élevé pour la société. En 2004, environ 3,4 millions de personnes sont décédées des conséquences du diabète dans le monde [7]. Plus de 80 % des décès liés au diabète se produisent dans des pays à revenu faible ou intermédiaire [8]. Selon l'OMS, en 2030 le diabète sera la septième cause de décès dans le monde [9]. Par ailleurs, le diabète augmente le risque de cardiopathie et d'accident vasculaire cérébral, contribuant à accroitre ces chiffres [10]. En effet, 50 % des diabétiques meurent d'une maladie cardio-vasculaire (principalement cardiopathie et accident vasculaire cérébral). Ces constats montrent l'importance des études menées sur cette pathologie.

II. LE DIABETE ET SES COMPLICATIONS

II.1 Le diabète

II.1.1 Le métabolisme de contrôle de la glycémie

Le sucre est un élément essentiel pour le bon fonctionnement de notre organisme. Source d'énergie, le sucre est un apport énergétique indispensable pour notre métabolisme. Le glucose est l'une des principales sources énergétiques métaboliques car il peut être dégradé dans le cycle de la glycolyse pour générer une molécule de pyruvate et de l'énergie sous forme d'ATP. Si la source de glucose est endogène, il est aussi apporté dans l'organisme de manière exogène, à partir de l'alimentation [11].

a. La glycémie : stabilité et régulation

La régulation de la glycémie est l'une des fonctions les plus importantes de notre organisme. En effet, le taux de glucose dans notre sang, que l'on appelle glycémie, doit être maintenu à une concentration dite « normoglycémique » qui est d'environ 1,26 g/L (5 mM) de glucose dans le sang. Lorsque la glycémie est supérieure à 1,26 g/L (hyperglycémie) après la prise d'un repas, une hormone hypoglycémiante, connue sous le nom d'insuline, va faciliter la captation du glucose par les cellules (celles du foie et des muscles en particulier). À l'inverse, lorsque la glycémie est trop basse (inférieure à 1,26 g/L), souvent après un effort physique, une hormone hyperglycémiante, le glucagon, va permettre de libérer du glucose dans la circulation sanguine. Ces deux hormones de la régulation de la glycémie sont synthétisées par le pancréas.

b. Un organe essentiel : le pancréas

Le pancréas est un organe constitué de quatre parties : la tête, l'isthme, le corps et la queue. Situé derrière l'estomac, devant et au-dessus des reins, il participe à de nombreuses fonctions biologiques. C'est un organe particulier, ses fonctions de glande à sécrétion exocrine et endocrine font du pancréas une glande amphicrine. En effet, il participe à la digestion du bol alimentaire par déversement des sucs pancréatiques (exocrine), mais il sécrète aussi des

hormones (endocrine). La partie endocrine ne représente que 1 à 2 % du tissu pancréatique et est constituée d'amas dispersés : les îlots de Langerhans. Seul le pancréas synthétise les deux hormones jouant un rôle dans le maintien de la glycémie : l'insuline et le glucagon, qui sont produits au niveau des îlots de Langerhans. Ces îlots contiennent quatre types de cellules sécrétant chacune une hormone polypeptidique caractéristique :

- l'insuline (hormone hypoglycémiante), synthétisée par les cellules β.
- le glucagon (hormone hyperglycémiante), sécrété par les cellules α.
- la somatostatine, produite dans les cellules δ, qui exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion de l'insuline et du glucagon.
- le polypeptide pancréatique synthétisé dans les cellules PP (polypeptide pancréatique)

La proportion de ces types cellulaires est variable et leurs distributions au sein de l'îlot sont aléatoires **(Figure 3)**.

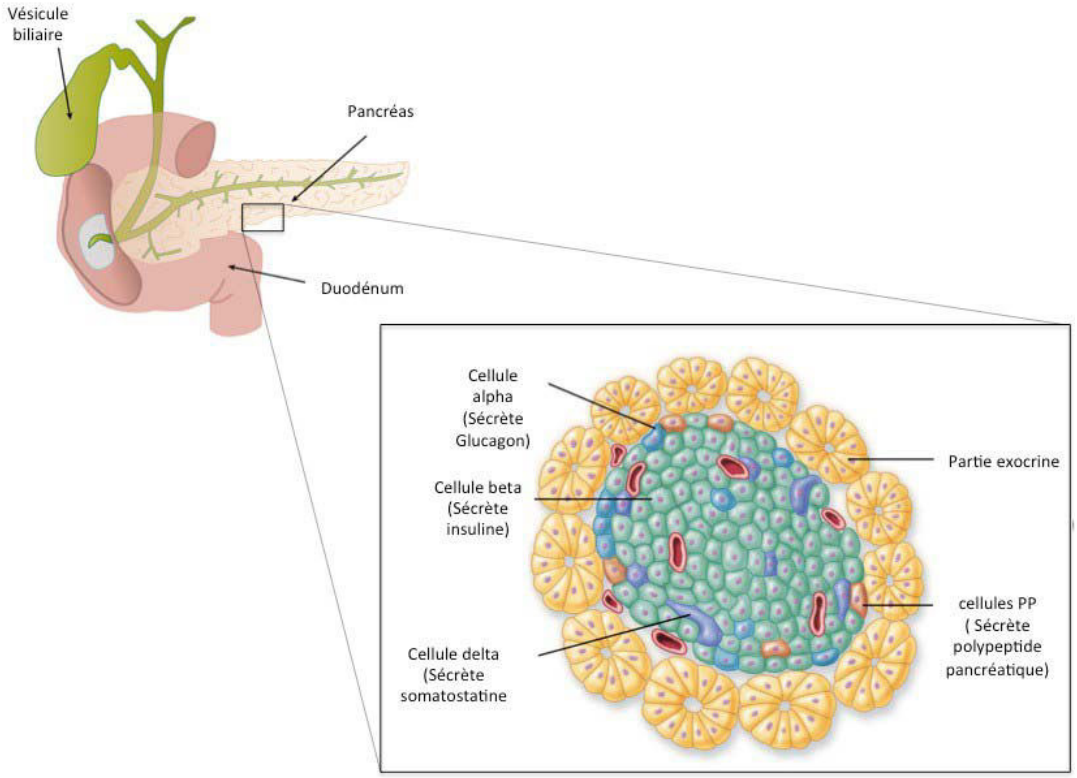


Figure 3. Le pancréas et la distribution des différents types cellulaires dans un îlot de Langerhans *(source : Pearsons Education,Inc)*

II.1.2. Les deux acteurs principaux de la régulation : l'insuline et le glucagon

a. L'insuline

Cette substance a été découverte par Frederick Grant Banting et Charles Herbert Best dans le laboratoire de John James Richard. D'ailleurs, Banting et MacLeod ont été les lauréats du Prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1923 récompensant leurs travaux sur l'insuline [12].

L'insuline est un peptide de 51 acides aminés et se compose de deux chaînes polypeptidiques: une chaîne A de 21 acides aminés et une chaîne B de 30 acides aminés, qui sont unies par deux ponts disulfures et un pont disulfure intra-chaîne dans la chaîne A **(Figure 4)**. Produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, cette hormone assure l'assimilation des sucres alimentaires par les cellules et permet ainsi la régulation de la glycémie. Lorsque la concentration en glucose sanguin augmente, suite à une prise alimentaire, celle-ci entraine la libération de l'insuline dans la circulation sanguine. L'insuline libérée va se lier à un récepteur spécifique constitué de 4 peptides glycosylés reliés par des ponts disulfures. Ce récepteur à activité tyrosine kinase permet au glucose de pénétrer dans les cellules afin d'être stocké et converti en énergie [11]. En effet, dans le foie et le muscle, le glucose est stocké sous forme de glycogène par le processus de glycogénogenèse et est utilisé dans le cycle de la glycolyse dans les myocytes pour produire de l'énergie. Au niveau du tissu adipeux, l'insuline induit aussi un stockage des acides gras en favorisant la lipogenèse

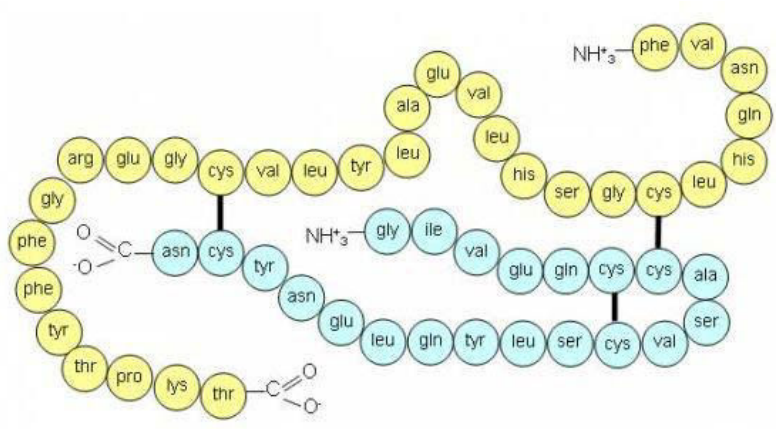


Figure 4. Structure primaire de l'insuline *(source : Takween)*

b. Le glucagon

La séquence en acides aminés du glucagon n'est connue que depuis 1950, mais elle fut découverte et décrite pour la première fois en 1923 par le Dr C.Kimball et le Dr J. Murlin [13]. Composé de 29 acides aminés, le glucagon est un polypeptide de faible poids moléculaire (3,5 kDa) **(Figure 5)**.

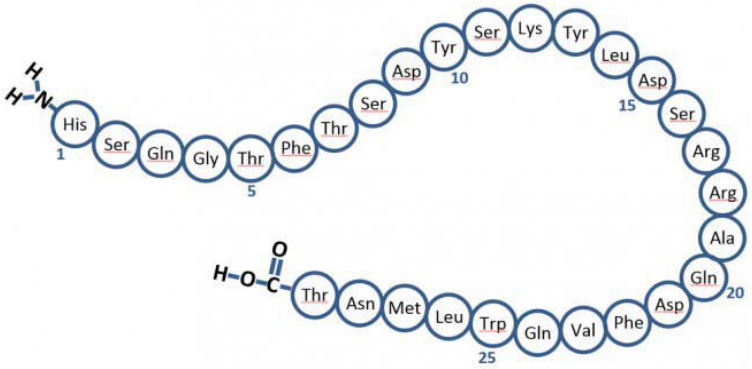


Figure 5. Structure primaire du glucagon *(Source : Diapedia)*

Il est produit par les cellules α du pancréas, uniquement lorsque la glycémie diminue de manière significative au-dessous de 0,65 g/L. En effet, dans un état de normoglycémie ou d'hyperglycémie, le glucose empêche les cellules α de sécréter du glucagon dans le sang. Lorsqu'il y a une hypoglycémie, la sécrétion d'insuline est bloquée et l'inhibition de la sécrétion du glucagon par des cellules α est levée. On a donc une libération massive du glucagon par les cellules α dans la circulation sanguine. L'hormone atteint les cellules cibles et se fixe sur son récepteur couplé aux protéines G. La sous-unité α de la protéine G va stimuler la glycogénolyse, via une chaîne d'activation, et entraîner une augmentation de la concentration en glucose-6-phosphate (G6P) intracellulaire. Le G6P sera hydrolysé en glucose grâce à la glucose-6-phosphatase. Le mécanisme conduit ainsi à une libération du glucose dans le sang. Le glucagon favorise aussi la néoglucogenèse à partir des acides aminés dans les hépatocytes. La glycémie est ainsi rétablie à un taux normal [11].

II.1.3 La pathologie diabétique

a. Le diabète sucré

Le mot diabète vient du grec « dia-baïno » signifiant « passer au travers ». Le diabète est une maladie chronique due à une concentration anormalement élevée de sucre dans le sang, que l'OMS définit par une glycémie supérieure à 1,26 g/L (7 mmol/L), caractérisée à jeun et confirmée par deux prises de sang consécutives.

Le diabète est la conséquence de deux mécanismes pathogéniques différents. Cette anomalie est due, soit à un déficit de sécrétion d'insuline par le pancréas, ou bien à l'incapacité de l'organisme à utiliser efficacement l'insuline sécrétée. En temps normal, le taux de glucose sanguin reste stable grâce à l'action de l'insuline et du glucagon et les cellules disposent donc de l'énergie dont elles ont besoin pour fonctionner. Un dysfonctionnement au niveau de l'insuline entraîne ainsi une dérégulation de la glycémie [14].

Ces deux mécanismes pathogéniques correspondent à deux types de diabète : le type I et le type II. Un diabète dit gestationnel peut également se développer au cours de la grossesse.

b. Le diabète de type I

Le diabète de type I est la conséquence de la destruction des cellules β due entre autres à une maladie auto-immune [15]. Ces cellules pancréatiques sont détruites partiellement ou entièrement par le système immunitaire, qui se caractérise par la présence importante dans le sang d'au moins un des quatre auto-anticorps du diabète : anti-îlot (ICA), anti-insuline (IAA), anti-décarboxylase de l'acide glutamique (GAD) ou anti-tyrosine phosphatase membranaire (IA2) [11]. L'insuline est alors produite en quantité insuffisante, avec pour conséquence une faible assimilation du glucose par l'organisme **(Figure 6)**.

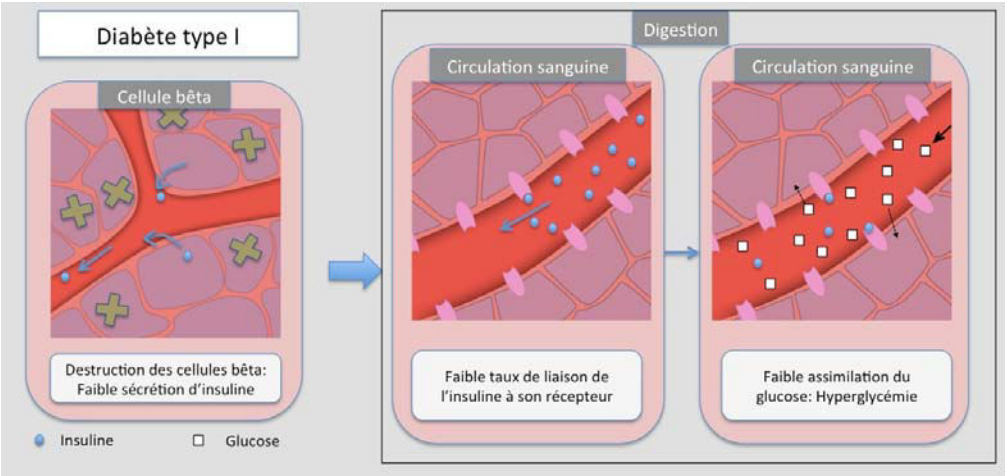


Figure 6. Métabolisme d'un patient atteint du diabète de type I

La glycémie n'est alors plus ou peu régulée et reste donc élevée. Le diabète de type I nécessite un traitement exclusivement basé sur la prise régulière d'insuline par le patient. Cette forme de diabète est pour cela appelée le « diabète insulinodépendant (DID) ». L'hyperglycémie causée par le diabète de type I peut donc être maitrisée par le patient grâce à des prises d'insuline et un régime alimentaire adapté. Cependant, le traitement à base d'insuline n'est pas simple car il doit être adapté aux patients et à la prise alimentaire, pouvant entrainer des complications lors d'un mauvais dosage.

Ce type de diabète apparaît le plus souvent durant l'enfance (diabète juvénile) ou chez les personnes de moins de 35 ans. Il concerne environ 10 % des diabétiques. Les effets délétères du système immunitaire contre les cellules β résulteraient probablement d'un ensemble de facteurs génétiques et environnementaux [16].

c. Le diabète de type II

Le diabète de type II appelé aussi « diabète gras » ou « diabète de la maturité » survient généralement chez les adultes de plus de 40 ans et touche davantage les personnes obèses ou en surpoids. Environ 75 % des diabétiques de type II souffrent d'obésité [15]. Ce type de diabète est dit insulinorésistant ou non-insulinodépendant (DNID) car il se caractérise par la résistance de l'organisme à l'action de l'insuline **(Figure7)**.

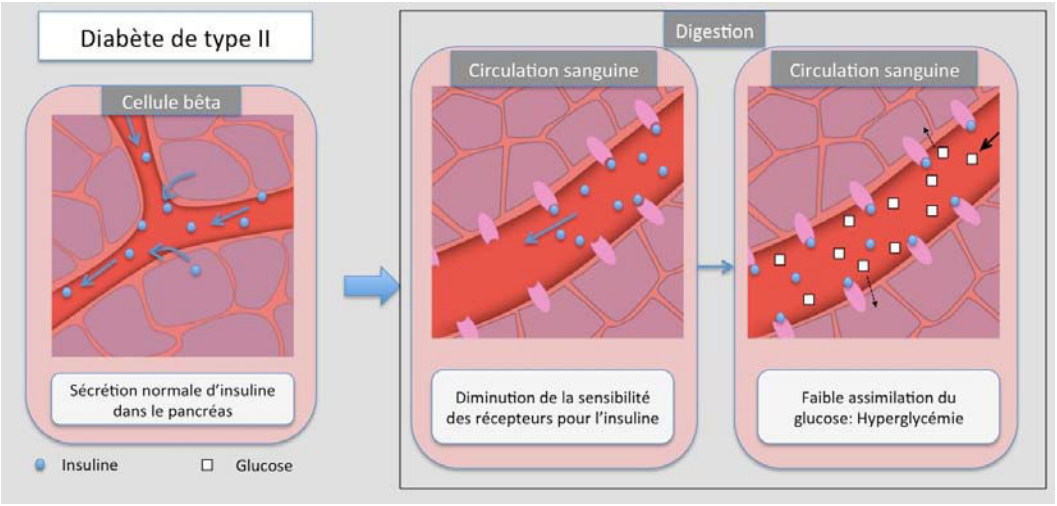


Figure 7. Métabolisme d'un patient atteint du diabète de type II

Chez les individus atteints de ce type de diabète, les récepteurs cellulaires deviennent moins sensibles à l'insuline qui est produite normalement et en quantité non négligeable par les cellules β du pancréas. Le glucose est faiblement absorbé par les cellules et reste sous forme circulante contribuant ainsi à une hyperglycémie. Ce diabète dit « insulinorésistant » peut évoluer vers un diabète de type I par épuisement des cellules β. En effet, face à l'hyperglycémie persistante, le pancréas va solliciter ses cellules β jusqu'à s'épuiser et devenir inefficace.

Le diabète de type II résulte de la combinaison de facteurs génétiques, environnementaux, ainsi que de facteurs liés au mode de vie. En général, chaque personne porte un bagage génétique héréditaire qui la prédispose ou non au diabète. Chez les personnes génétiquement prédisposées à la maladie, c'est généralement le surpoids et particulièrement l'accumulation de gras dans les organes de l'abdomen qui entraînent une résistance à l'insuline [17] [18] [19]. En effet, de nombreuses études ont relevé le lien entre l'obésité, ainsi que l'accumulation de masse grasse abdominale, et le diabète de type II [6 , 20]. Le risque de développer un diabète de type II, ou diabète gras, est étroitement relié aux indices de masse corporelle (IMC) et de tour de taille, indices associés à la masse grasse et principaux indicateurs de surpoids et d'obésité [21]. Par ailleurs, l'augmentation de la prévalence pour le diabète de type II s'explique principalement par une prévalence alarmante de l'obésité et du surpoids qui a augmenté de 50 % entre 1997 et 2006 [22].

Le diabète de type II est traité par des mesures hygiénodiététiques (un régime adapté pauvre en sucre et par la perte de poids) mais aussi parfois par des mesures thérapeutiques, par le

biais d'antidiabétiques oraux, voire éventuellement une insulinothérapie. Cette forme de diabète représente près de 90 % des diabétiques [4].

d. Symptômes

Les symptômes pour les diabètes de type I et de type II sont les mêmes mais peuvent passer inaperçus (symptômes insidieux) pendant plusieurs années. Cette maladie caractérisée par une hyperglycémie est aussi associée à de sévères complications métaboliques [23]. L'hyperglycémie peut, dans certains cas, causer une polyurie (urines abondantes et fréquentes), de même qu'une polyphagie (augmentation de la faim) et une polydipsie (augmentation de la soif) [15].

Même si le diabète s'accompagne de nombreux symptômes mineurs, il reste la cause de nombreuses complications pathologiques comme les maladies cardiovasculaires, l'insuffisance cardiaque, des insuffisances rénales chroniques ou encore des troubles pouvant conduire à la cécité [24 , 25].

Chez certains diabétiques, les symptômes du diabète pouvant être insidieux, la détection du pourcentage d'hémoglobine glyquée (% HbA1c) reste l'un des outils de diagnostic le plus fiable pour vérifier une anomalie dans la régulation de la glycémie. En effet, l'hémoglobine, protéine plasmatique d'une demi-vie de 120 jours, se retrouve glyquée dans le sang et constitue donc un marqueur de diagnostic de l'état diabétique d'un sujet [26 , 27].

II 2. Les conséquences moléculaires de l'hyperglycémie : la glycoxydation et le stress oxydant

Une hyperglycémie non régulée chez le diabétique peut être à l'origine de perturbations de nombreuses fonctions organiques et ainsi engendrer de nombreuses complications métaboliques. Ces types de modifications sont engendrés par la combinaison de deux processus délétères qui s'auto entretiennent : la glycation et le stress oxydant.

II. 2.1. La glycation ou glycoxydation

a. Généralités

La glycation ou glycosylation non-enzymatique a fait une entrée, d'abord discrète, dans le monde médical grâce à l'hémoglobine glyquée (HbA1c) utilisée quotidiennement pour la surveillance de l'équilibre du diabète [28]. En effet, lors d'une hyperglycémie, de nombreuses protéines, principalement plasmatiques, vont subir le phénomène de glycation. Chez les diabétiques, la glycation est considérée comme la principale altération qui affecte les protéines, parmi lesquelles les protéines circulantes comme l'albumine et l'hémoglobine sont les plus souvent concernées. La structure des protéines se trouve ainsi modifiée, ce qui confère à ces dernières une altération de ses propriétés intrinsèques et un rôle néfaste sur la physiologie cellulaire [29].
La glycation a été décrite comme un mécanisme pathogène entrant dans le processus d'apparition des maladies associées au diabète. La glycation figure aussi parmi la plus caractéristique des modifications post-traductionnelles tardives des protéines, qui fournissent les bases métaboliques à de nombreux phénomènes physiopathologiques chez l'homme, tels que le vieillissement, l'insuffisance rénale, l'athérosclérose ou le diabète sucré [30 , 31].

La glycation a été découverte par le chimiste français, Louis-Camille Maillard, qui décrivait l'action des sucres sur les acides aminés à température élevée [28, 32]. Dans ses conditions expérimentales, il constate un changement de couleur, un dégagement gazeux, et conclut qu'une réaction a eu lieu entre la fonction aldéhydique et l'azote suivie d'une création de doubles liaisons et peut-être de cycles. Il a testé systématiquement les acides aminés et les sucres dans son système expérimental, et aussi généralisé le concept de glycation [28]. Par conséquent, ce phénomène est aussi appelé réaction de Maillard.

b. Mécanisme

Il correspond à une réaction non enzymatique qui consiste à la fixation de sucres réducteurs, comme le glucose, sur une protéine. La glycation est une réaction non enzymatique qui se différencie de la glycosylation, qui à l'inverse fait intervenir une glycosyl-transférase.

La glycation des protéines est un processus se déroulant en trois étapes de différentes durées. La première étape correspondant à une condensation rapide (quelques heures), suivie de la formation de produits intermédiaires de glycation par réarrangement moléculaire (quelques jours). Vient ensuite, le processus lent de formation des produits finaux de glycation (plusieurs semaines) **(Figure 8).**

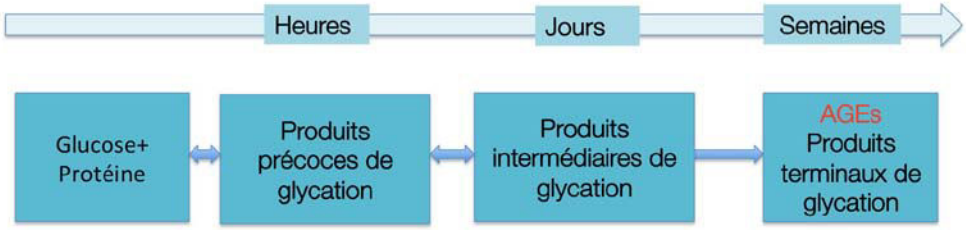


Figure 8. Les différentes étapes de la glycoxydation dans le temps

Les deux premières phases de cette réaction sont rapides et réversibles tandis que la troisième est lente et irréversible :

1) **Formation de base de Schiff :** Cela correspond à une réaction d'addition nucléophile entre la fonction aldéhyde du glucose (ou autres dérivés du sucre) et un résidu aminé de la protéine (lysine, arginine ou avec la fonction amine N-terminale) pour aboutir à la formation d'une base de Schiff (**Figure 9**) [33] [34].

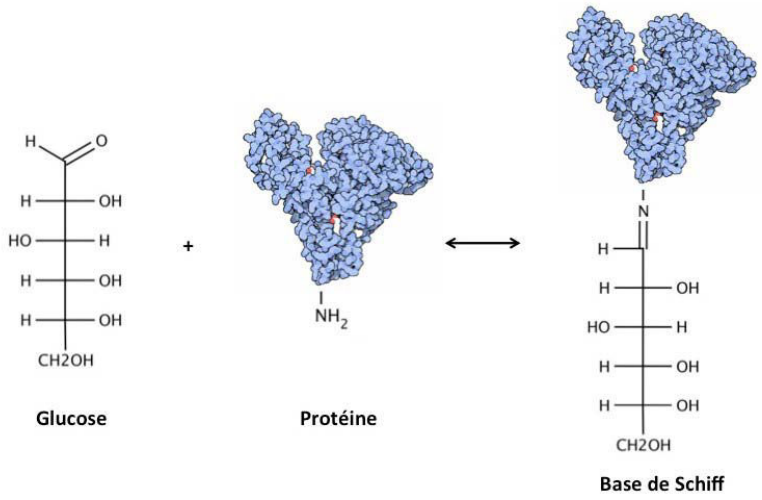


Figure 9. Formation de la base de Schiff

2) **Réarrangement d'Amadori :** Par différents réarrangements (tautomérie) dits d'Amadori, ces bases de Schiff vont former des produits précoces de glycation ou fructosamines qui sont des protéines intermédiaires **(Figure 10)**. Ces derniers sont aussi connus sous le nom de « produits d'Amadori ».

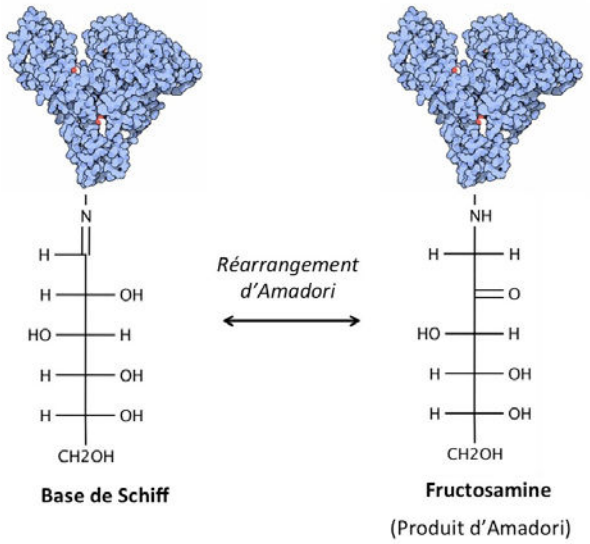


Figure 10. Formation de produit d'Amadori

3) **Formation d'AGE :** Les fructosamines évoluent ensuite de manière lente et irréversible en produits avancés de glycation (AGE), ou produits de réaction de Maillard, par des mécanismes de réarrangement et d'oxydation **(Figure 11)**. L'implication du phénomène d'oxydation dans cette étape justifie le terme de « glycoxydation » plutôt que de « glycation » pour décrire ce mécanisme [23].

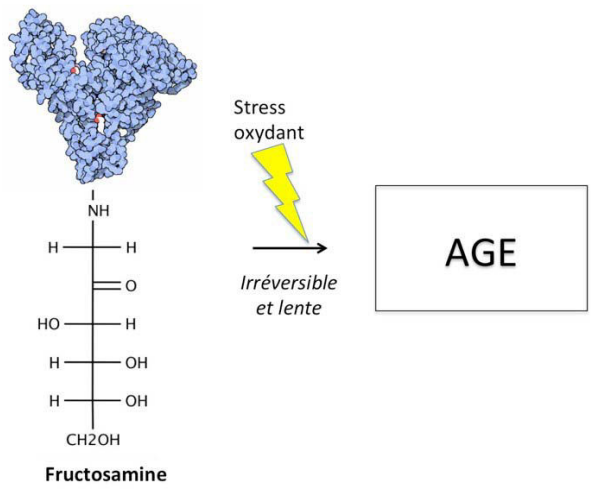


Figure 11. Formation d'AGE

Les produits d'Amadori subiraient des phases de cyclisation, formant des hydrates de carbone sous forme pyrannose ou furannose [35]. D'autres modifications peuvent se produire sur ces produits intermédiaires de glycation, tels que des transpositions, oxydations, polymérisations ou des clivages donnant lieu à la formation irréversible de produits conjugués, appelés produits finaux de glycation (AGE) [36]. La formation des AGE correspond à une succession d'étapes intermédiaires dépendantes du temps et de la concentration en sucre [37].

Les deux premières étapes de la glycoxydation sont réversibles et peuvent être contrôlées en diminuant la concentration de sucre dans le sang. L'hémoglobine glyquée (HbA1c) et les fructosamines sont des exemples caractéristiques de produits d'Amadori évalués en biologie clinique au cours du suivi des patients diabétiques [38]. Cependant, la dernière étape conduisant aux AGE est irréversible et ne peut pas être influencée par une meilleure régulation de la glycémie. Ces AGE sont des protéines modifiées à durée de vie prolongée qui se caractérisent par leur fluorescence et leur implication dans la formation de liaisons croisées entre protéines [39].

D'autres sucres sont susceptibles de participer à la glycation des protéines comme le fructose, le galactose, le ribose ou même des dérivées de glucose comme le méthylglyoxal (MGO) (issue de l'auto-oxydation du glucose) qui sont des précurseurs importants d'AGE *in vivo* [39 , 40].

Les protéines circulantes, telles que l'albumine, l'hémoglobine, les immunoglobulines et les protéines de la matrice extracellulaire de longue demi-vie (collagène, laminine…) sont les principales protéines cibles de ce processus de glycoxydation. Au travers de remaniements moléculaires, ce phénomène conduit à des altérations structurales et fonctionnelles des protéines, expliquant leur participation à de nombreux dysfonctionnements cellulaires à l'origine de diverses maladies associées au diabète [41 , 42].

II.2.2. Le stress oxydant

Si le diabète est à l'origine des phénomènes de glycation et de glycoxydation, il engendre également un stress oxydant à travers de la production de ROS. Nous allons donc définir ce qu'est le stress oxydant et les facteurs qui y contribuent.

a. Définition

Les réactions d'oxydation sont des réactions habituelles et indispensables au sein de nos cellules, car elles contribuent au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire. En effet, les réactions d'oxydation ont lieu lors de nombreux processus biologiques qui visent à maintenir un équilibre ou à synthétiser des molécules indispensables. Le métabolisme cellulaire produit et utilise en permanence des espèces oxydantes, c'est le cas au cours de la respiration, où chaque cellule réduit notamment l'oxygène en eau [43].

Cependant comme dans tout phénomène important, un dérèglement dans ces réactions d'oxydations peut créer un dysfonctionnement au niveau des cellules, c'est ce qu'on appelle un stress oxydant **(Figure 12)** [44 , 45].

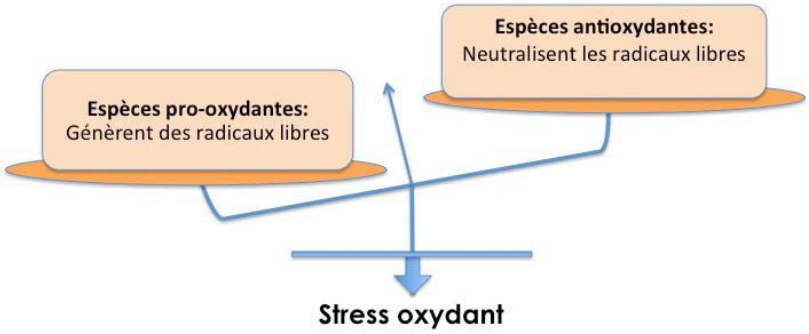


Figure 12. Le stress oxydant.

Le stress oxydant peut être défini comme la résultante d'un déséquilibre en faveur des espèces pro-oxydantes et au détriment des espèces antioxydantes [44]. Ce déséquilibre provient, soit d'une production exagérée d'agents oxydants (radicaux libres et ROS), soit d'une altération des mécanismes de défense. Les premiers travaux dans le domaine ont montré le rôle important joué par les intermédiaires oxygénés, appelés également radicaux libres, dans les phénomènes physiologiques et leurs effets délétères dans les processus cellulaires [46 , 47]

b. Espèces réactives et radicaux libres

Il existe trois principales familles d'espèces réactives oxydantes qui sont actuellement connues et à l'origine de nombreux effets biologiques. Il s'agit des formes réactives de l'oxygène (*Reactive oxygen species (ROS)*), des oxydants chlorés (*Chloride Reactive Species (RClS)*) et des formes réactives de l'azote (*reactive nitrogen species (RNS)*) [48]. La respiration cellulaire au niveau de la mitochondrie constitue par exemple une des sources de RNS et de ROS (oxyde nitrique $NO^{\bullet\bullet}$).

On s'intéressera plus aux ROS qui sont les plus importants du fait de leurs nombreuses implications dans les processus biologiques. Tout métabolisme cellulaire normal produit et utilise en permanence des espèces oxygénées réactives. La plupart de ces ROS sont issus ou générés par des radicaux libres, espèces chimiques neutres ou chargées, instables recherchant à récupérer un électron dans leurs environnements afin de retrouver un état plus stable. Ces propriétés font que les réactions d'oxydation sont très rapides et se propagent en cascade. Les radicaux libres oxygénés ou espèces réactives de l'oxygène (ROS) constituent les principales espèces pro-oxydantes. Les radicaux libres, qu'ils soient dérivés de l'oxygène radicalaire ou non, sont impliqués dans de nombreux processus biologiques **(Figure 13)** [49].

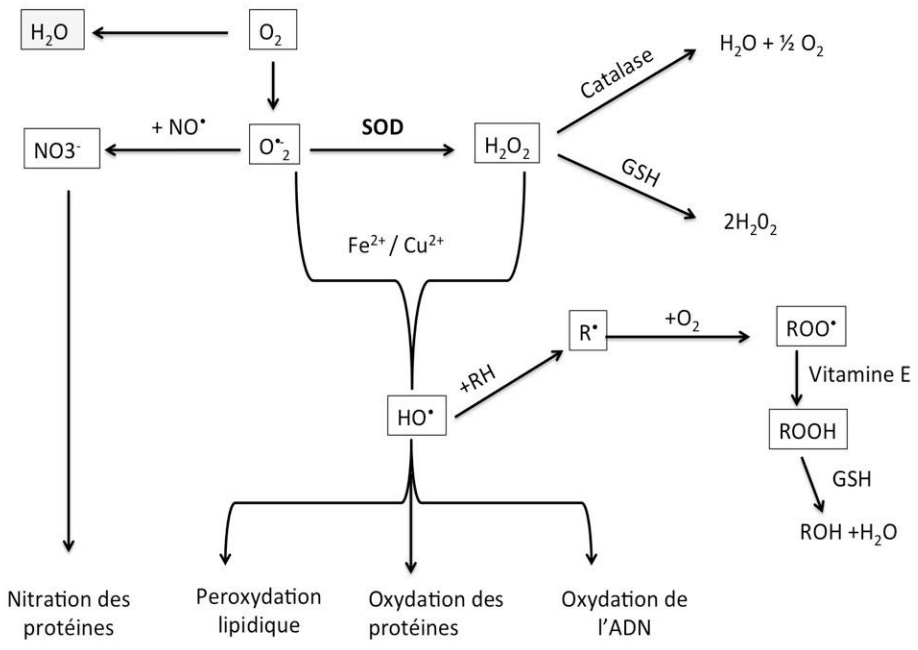


Figure 13. Les principaux radicaux libres et les mécanismes de détoxification [29]

Les principaux radicaux libres dérivés de l'oxygène sont :

- L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) qui apparaît après oxydation d'une molécule d'oxygène par un électron selon la réaction suivante :

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$$

La formation de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) est un processus physiologique à la base de l'obtention des autres radicaux libres et par voie de conséquence à la formation en cascade de tous les autres oxydants [50].

- Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est issu de la réduction de l'anion $O_2^{\bullet -}$ sous l'action de la superoxyde dismutase :

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow O_2 H_2 + O_2$$

- Le radical hydroxyle ($OH^{\bullet\bullet}$), formé par l'interaction de $O_2^{\bullet\bullet-}$ et H_2O_2 en présence de métaux suivant la réaction d'Haber-Weiss [51 , 52]

$$!_!^{\bullet\bullet!} + !_!!_! \xrightarrow{!"/!"} !"^{\bullet\bullet} + !"^{!} + !_!$$

Ces radicaux libres sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques mais aussi pathologiques, en particulier dans le développement des maladies cardiovasculaires [53, 54]. L'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont peu impliqués dans la dégradation protéique mais sont à l'origine d'espèces plus réactives comme le peroxynitrite (NO_3^-) et le radical ($OH^{\bullet\bullet}$) responsables de la fragmentation protéique ou de la formation d'agrégats moléculaires mais dans un court rayon d'action [55]. Le peroxynitrite est obtenu par interaction entre le $O_2^{\bullet\bullet-}$ et l'oxyde nitrique ($NO^{\bullet\bullet}$), un radical vasodilatateur produit par de nombreuses cellules comme les phagocytes et cellules vasculaires endothéliales [56].
L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont les moins réactifs mais possèdent toutefois une demi-vie relativement longue et la capacité de diffuser au travers les membranes cellulaires. Le radical $OH^{\bullet\bullet}$ est une espèce très réactive mais à la différence de H_2O_2 et $O_2^{\bullet\bullet-}$, sa courte demi-vie, de l'ordre de la fraction de seconde, ne lui laisse qu'un court rayon d'action [55].

c. Les sources des ROS

Les ROS sont à l'origine de la génération d'un stress oxydant et peuvent provenir de sources endogènes ou exogènes.

Les systèmes endogènes pouvant induire la production de ROS sont en général des processus biologiques utiles pour les cellules. Nombreux sont les ROS qui participent à des réactions biologiques. Par exemple, lors de l'auto-oxydation des aldoses, il y a réduction de l'oxygène moléculaire dans des conditions physiologiques qui génère des alpha-cétoaldéhydes, de l'H_2O_2 et des intermédiaires radicalaires [57].
La synthèse de prostaglandines, catalysée par la lipooxygénase et la cyclo-oxygénase, implique aussi une production de radicaux libres. Au niveau de la membrane plasmique, la NADPH oxydase activée par le processus phagocytaire de la cellule est à l'origine d'une large production de radicaux superoxydes [58]. L'activation de la NADPH oxydase joue un rôle

central dans la production de ROS à travers la fixation des AGE à leurs récepteurs RAGE [59].

Aussi, lors de la respiration mitochondriale, dans la chaine de transport des électrons, l'oxygène moléculaire est converti en radicaux superoxyde [43].

Les réactions d'oxydations de protéines glyquées induisent aussi une production de ROS. La production d'AGE qui nécessite des étapes d'oxydation, de transfert d'hydrogènes et de réarrangement à partir des fructosamines, induit un stress oxydant à travers la production intracellulaire de ROS [60].

Par exemple, dans le cas du diabète le stress oxydant peut avoir plusieurs origines, comme la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) issues de l'auto-oxydation du glucose ou de la réaction non-enzymatique entre le glucose et les protéines circulantes, donnant des produits avancés de glycation (AGE) [24].

Il existe également des sources exogènes telles que les polluants photochimiques, le tabac, les drogues et les radiations ionisantes, pénétrant dans l'organisme par la respiration, l'alimentation ou les muqueuses [61] [62]. La surproduction de ROS peut être aussi induite par des processus de type ischémie-reperfusion qui sont à l'origine d'une partie des rejets des greffes [63].

Certains métaux apportés de manière exogène, mais pouvant être aussi endogènes tels que le fer ou le cuivre, sont nécessaires à l'organisme mais peuvent à des taux élevés générer des ROS en participant à la réaction de Fenton [64]. En effet, ces métaux de transition peuvent réagir avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de composé organique (RH) et générer des ROS selon la réaction suivante **(Figure 14)** :

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe(OH)^{2+} + OH^{\bullet}$$
$$R\text{-}H + OH^{\bullet} \longrightarrow H_2O + R^{\bullet}$$
$$O_2 + R^{\bullet} \longrightarrow ROO^{\bullet}$$

Figure 14. Réaction de Fenton

Même si les ions (Fe^{2+}) sont à des concentrations physiologiques plus importantes, les ions (Cu^{2+}) réagissent plus rapidement (60 fois) avec l'H_2O_2 pour former des radicaux hydroxyle ($OH^{\bullet}$) [64].

d. Les dommages oxydatifs

Quand l'un de ces dommages oxydatifs évoqués précédemment est présent, le stress oxydant est initié et cela peut contribuer à altérer les sucres, les acides nucléiques, les protéines ou les lipides [65] [29].

Même si les ROS sont des intermédiaires nécessaires dans le bon fonctionnement cellulaire, ils interviennent aussi dans la désorganisation des structures membranaires et l'altération de l'ADN. En effet, les attaques radicalaires au niveau des acides nucléiques peuvent stopper la réplication de l'ADN [66]. De même, les dommages oxydatifs au niveau de l'ADN entraînent des coupures ou des mutations carcinogènes sur les brins d'ADN, pouvant entraîner la mort cellulaire [67].

Les espèces moléculaires cibles de l'oxydation sont également tous les corps gras comme les phospholipides des membranes cellulaires ou les LDL (lipoprotéines de basse densité) [68]. La peroxydation lipidique est l'une des conséquences du stress oxydant sur les lipides. C'est un mécanisme en chaine qui dégrade des acides gras membranaires, conduisant à la formation d'hydroperoxydes (ROOH) instables, responsables de la diminution de la fluidité membranaire. On observe donc une altération du fonctionnement des membranes, des dépôts de lipides oxydés dans les vaisseaux ou les tissus âgés ainsi qu'une genèse de dérivés carcinogènes [69].

Les attaques radicalaires générées par les ROS affectent aussi les protéines, parmi lesquelles les protéines plasmatiques sont les plus exposées. Elles peuvent être attaquées par les radicaux libres même en présence de concentrations très élevées en antioxydants, alors que dans les mêmes conditions, le processus de peroxydation lipidique est grandement atténué [70]. Les ROS agissent sur les protéines par le biais des acides aminés les plus sensibles au stress oxydant tels que la lysine, l'arginine, la cystéine, la méthionine, l'histidine et la phénylalanine.

L'oxydation de la méthionine, résidus généralement dans les zones exposées de la protéine donc susceptible à l'oxydation, va conduire à la formation de méthionine sulfone [71]. L'oxydation de ces résidus peut conduire à un changement conformationnel se traduisant par un repliement de la protéine [72]. Fortement impliquée au niveau des protéines du cortex cérébral, l'oxydation de ces résidus induit des pathologies neurodégénératives [73].
Toutefois, ces résidus méthionines apparaissent aussi comme un système antioxydant interne à la protéine et préviendraient ainsi l'oxydation d'autres acides aminés essentiels [74].

La tyrosine peut-être oxydée par le radical hydroxyle pour donner la di-tyrosine qui apparaît comme un marqueur spécifique *in vivo* du statut oxydatif des protéines [75]. La nitration de ce résidu par le peroxynitrite aboutit à la formation du 3-nitrotyrosine, produit d'oxydation mis en évidence dans les plasmas de patients diabétiques [76].

Souvent situés dans des sites de fixation de métaux, les résidus lysine, arginine et histidine constituent des cibles sensibles à l'oxydation via les radicaux libres. La présence de métaux de transition facilite la modification de ces résidus en dérivés carbonylés tels que le 2-oxohistidine et le semi-aldéhyde α-aminoadipique. La lysine et l'arginine sont des résidus qui peuvent également se lier à des carbohydrates selon le processus de glycoxydation afin d'aboutir à la formation d'AGE [34].

Enfin, la cystéine (-SH) est oxydée en acide sulfénique (-SOH) conduisant à la formation de pont disulfure S-S ou bien d'acide sulfinique ($-SO_2H$) et d'acide sulfonique ($-SO_3H$) [77].
L'oxydation des protéines contribue donc à l'altération de leurs fonctions intrinsèques mais aussi à une modification de leurs structures tridimensionnelles qui peut notamment contribuer à la formation d'agrégats [78].

L'oxydation des protéines, de l'ADN, des lipides et aussi des sucres, entraîne une modification ou perte de l'activité biologique des différents composés de la cellule qui peut engendrer des désorganisations cellulaires parfois irréversibles, entraînant la mort de la cellule. En touchant donc à l'ensemble des tissus et des métabolismes, le stress oxydant contribue au développement d'un grand nombre de pathologies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires ou cérébro-vasculaires [45 , 79 , 80].

e. Les systèmes de défense

L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression de ces oxydants grâce à divers mécanismes de défense tant enzymatiques que non enzymatiques. Les espèces antioxydantes peuvent se définir comme des substances qui sont capables de neutraliser les formes actives de l'oxygène et qui permettent de maintenir, au niveau de la cellule et de l'organisme, des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres. Entre autres, elle diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques.

Un antioxydant possède différents modes d'action : il peut stopper des réactions radicalaires en chaines (anti-radicalaire), inhiber des enzymes oxydantes spécifiques, ou réagir avec des substances oxydantes avant qu'elles n'endommagent les molécules biologiques [81]. Il existe ainsi deux types de systèmes chargés de corriger les effets toxiques des radicaux libres : les défenses primaires et les défenses secondaires.

Les systèmes de défense primaires

Les systèmes de défense primaires diminuent la production de radicaux libres et comprennent différentes enzymes qui peuvent métaboliser les radicaux libres. Les plus connues sont la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GSH) et la catalase **(Figure 15)**.
Les SOD sont des métallo-protéines qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et O_2 [82]. La glutathion peroxydase (GSH) catalyse la réduction de H_2O_2 et des peroxydes organiques [83]. Tandis que la catalase permet l'élimination de H_2O_2 excédentaire dans l'organisme [84]. Ces antioxydants endogènes participent donc à des réactions de détoxification de ROS.

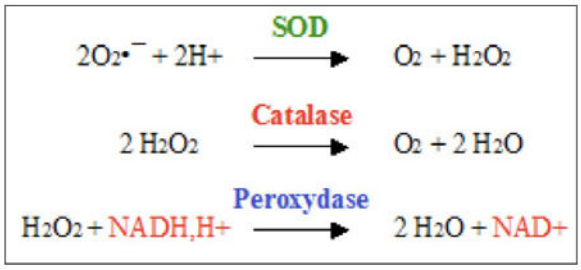


Figure 15. Les principales réactions de détoxification

Concernant les défenses non-enzymatiques, une place particulière est réservée à la vitamine E et à la vitamine C qui agissent en synergie et représentent des mécanismes de défense très puissants contre les radicaux libres et la peroxydation lipidique [85]. Ces derniers peuvent être d'origine endogène comme exogène. Ce système primaire non enzymatique comprend aussi le glutathion à l'état réduit (GSH) qui a la capacité de réduire les radicaux libres, en réduisant le H_2O_2 en eau et les peroxydes (ROOH) en alcool [81].
L'albumine a également été décrite comme un antioxydant majeur dans le plasma, que nous détaillerons par la suite [86].

Les systèmes de défense secondaires

Les systèmes de défense secondaires agissent comme des systèmes de réparation car ils peuvent réduire les dommages que les radicaux libres font subir aux protéines, aux lipides et à l'ADN.

Les attaques radicalaires causées au niveau de l'ADN, empêchant la réplication de l'information génétique, sont contrées par l'action des ligases, de l'ADN polymérase I ainsi que ceux des endonucléases [66]. Grâce à son caractère liposoluble, la vitamine E représente un bon système de défense contre la peroxydation au niveau des lipides [85].

Enfin, concernant les protéines, de nombreuses oxydoréductases catalysent la réduction au niveau de nombreux résidus aminés des protéines préalablement oxydés par les radicaux libres comme la tyrosine, l'histidine, la méthionine et la cystéine.

Par exemple, le peptide méthionine sulfoxyde réductase (PMSR) comporte deux familles d'enzymes (MsrA et MsrB) susceptibles de réduire les différentes formes de la méthionine sulfoxyde, produit de l'oxydation de la méthionine [73]. Son rôle dans la réparation de protéines oxydées a été confirmé dans de nombreuses études, notamment celle décrivant des lymphocytes humains surexprimant cette enzyme et qui présentent une plus grande résistance au stress oxydant [87].

Une autre enzyme, la sulfirédoxine, est capable de réparer les protéines oxydées, particulièrement celles possédant des cystéines oxydées [88]. Cette nouvelle enzyme découverte chez la levure réduit l'acide sulfinique ($-SO_2H$), prouvant ainsi que la suroxydation des cystéines n'est pas irréversible. Les cystéines oxydées sont prises en charge par la protéine disulfide isomérase, enzyme catalysant la réduction des disulfures et qui semble impliquée dans le repliement correct de la protéine [89].

Autres types de défenses

Tous ces systèmes de défense produits par l'organisme, vus précédemment, sont capables d'inactiver les ROS nocifs et donc de maintenir une balance optimale oxydants/antioxydants permettant d'assurer une fonction cellulaire normale.

Cependant, sous l'effet d'un fort stress oxydatif, les capacités de ces antioxydants à éliminer les ROS sont souvent dépassées et par conséquent, d'autres sources d'antioxydants, dites diététiques, sont nécessaires. Les plus répandus et connus étant ceux trouvés dans l'alimentation comme le β-carotène (provitamines A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) et les polyphénols [90]. Beaucoup de ces antioxydants proviennent des fruits (fruits rouges, orange, raisin...) et des légumes (tomate, cresson, ail...) [91].

Concernant les protéines, lorsque la réparation n'est plus possible, le métabolisme a recourt à un système d'élimination. En effet, lorsque l'état oxydatif des protéines devient irréversible, à cause d'un potentiel de défense antioxydant totalement dépassé, les systèmes protéolytiques prennent le relais pour assurer la dégradation des protéines altérées [92]. Ce complexe protéolytique appelé « protéasome » est constitué de plusieurs activités peptidases. Le protéasome a ainsi un rôle vital dans la dégradation des protéines oxydées et donc dans le renouvellement continu des protéines mais aussi dans l'équilibre oxydants/antioxydants de la cellule [92, 93].

II.2.3 Effet synergique entre le phénomène de glycation et le stress oxydant

Il est plus exact d'utiliser le terme de « glycoxydation » car il existe un lien très étroit entre le phénomène de glycation et de stress oxydant.

La glycation non enzymatique, générée par une hyperglycémie non régulée s'accompagne d'un stress oxydant. En effet, une production de radicaux libres oxygénés peut être observée à chaque stade de la glycoxydation [23].

De plus, les AGE sont par la même occasion impliqués dans la genèse d'un stress oxydant. Cette implication dans le métabolisme oxydatif vient de leurs capacités à se fixer sur des récepteurs membranaires spécifiques (RAGE) qui déclenchent une signalisation entraînant un

stress oxydant intracellulaire ainsi que l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire [94 , 95].

Les fonctions des cellules impliquées dans des métabolismes oxydatifs peuvent être ainsi modifiées par les protéines glyquées et générer une réponse inappropriée. Les interactions entre les produits de glycation et leurs récepteurs participent donc, dans la plupart des cas au développement d'un stress oxydant.

De plus, les protéines glyquées peuvent induire un stress oxydant en réagissant avec les radicaux libres oxygénés. Certains produits d'oxydation, comme le méthyl glyoxal (MGO), peuvent se lier à des protéines et amplifier les lésions générées par la glycoxydation [96]. La glycation et le stress oxydant constituent donc deux engrenages importants d'un mécanisme délétère et ininterrompu dans lequel ces deux processus altératifs agissent en synergie et s'auto entretiennent **(Figure 16)** [97].

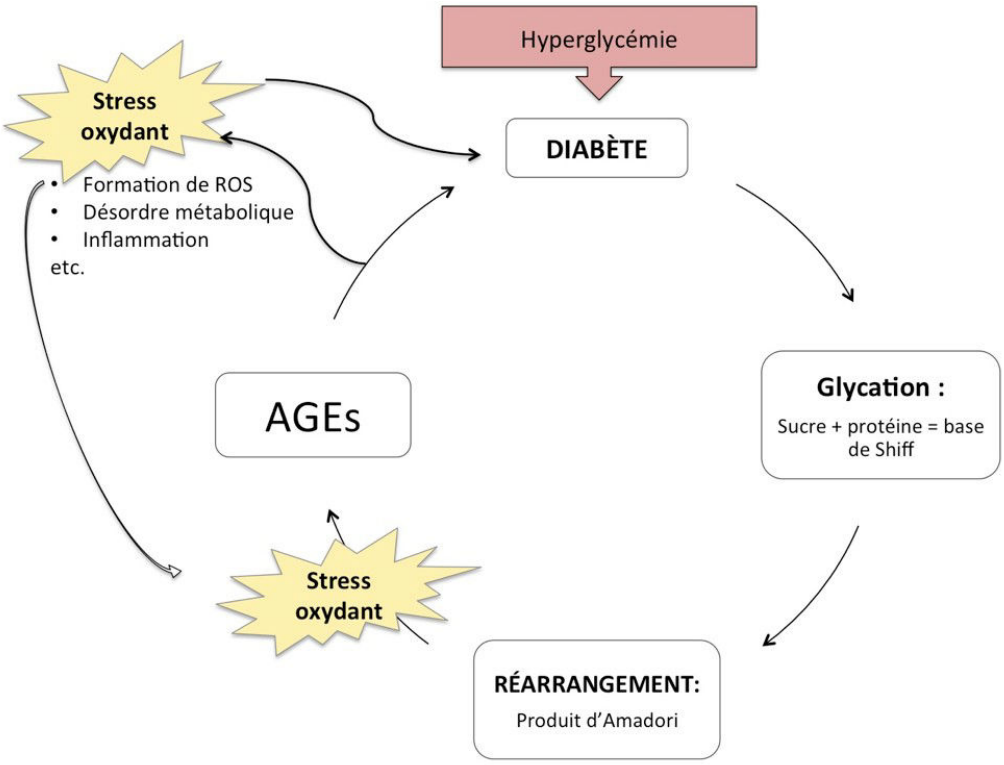


Figure 16. Effet synergique de la glycation et du stress oxydant.

Concernant le diabète, les phénomènes de glycoxydation génèrent un stress oxydant qui lui-même va contribuer à l'apparition d'autres complications métaboliques. Aussi, le stress oxydant est à l'origine de la dualité entre l'obésité et le diabète. En effet, le stress oxydant participerait aux dérèglements métaboliques observés dans les deux formes de diabète. Dans

le diabète de type I, il serait à l'origine des lésions des cellules bêta du pancréas [18]. D'autre part, les radicaux libres inhiberaient la sécrétion d'insuline [98].

Dans le diabète de type II, le stress oxydant génère des radicaux libres qui joueraient un rôle clé dans la sensibilité des cellules à l'action de l'insuline et pourraient donc être à l'origine de l'insulino-résistance liée à l'âge [99]. Le diabète et les maladies métaboliques associées sont donc étroitement liés aux nombreuses conséquences conjuguées du stress oxydant et de la glycoxydation.

II.3 - Les conséquences de la glycoxydation : les protéines avancées de glycation

Les produits avancés de glycation (AGE) résultent des deux phénomènes explicités précédemment : la glycation et l'oxydation.

II.3.1 Les AGE

Les AGE sont des molécules complexes, souvent fluorescentes qui sont obtenues à l'issue des voies métaboliques liant un sucre (oses tel que le glucose, le galactose ou le fructose) et la fonction amine d'une protéine comme décrite précédemment [100].
Il s'agit d'une classe chimique à part résultant de la fixation d'un sucre sur le radical NH_2 libre d'un acide aminé d'une protéine, le plus souvent une lysine [28]. Ils correspondent aux produits finaux d'une réaction de glycation et d'oxydation qui se produit lors d'une mauvaise régulation de la glycémie [80]. Cette réaction se déroule sans participation enzymatique et dépend pour beaucoup du temps d'exposition au sucre et de la concentration de ce dernier. Ils sont appelés « produits de Maillard », en mémoire du découvreur de ces composés et de leur mode de formation [28].

Il existe trois voies de formation des AGE : la glycation non enzymatique, la glycoxydation résultant de l'auto-oxydation du glucose et la voie des polyols [30].

Les AGE sont ainsi dénommés depuis peu, alors que leur première description revient au très célèbre chimiste français du début du XXe siècle. C'est dans le compte-rendu présenté par

Louis Camille Maillard à l'Académie des sciences en 1912 (Paris) que l'on peut lire « Action des acides aminés sur les sucres ; formation des mélanoïdes par voie métabolique » [32]. Les AGE font partie à l'heure actuelle des molécules biologiques les plus étudiées [101].

Les AGE peuvent être aussi d'origine exogène et peuvent représenter environ 10 % des AGE présents dans le plasma [102]. Ils ont été identifiés en premier lieu dans l'industrie alimentaire et ont été utilisés afin d'améliorer le goût, la texture et les propriétés sensorielles des aliments (brunissement des aliments). Mais ils sont également présents dans la fumée de cigarette et par conséquent en forte concentration dans le sang des fumeurs [103]. Les AGE sont présents dans de nombreux aliments et boissons surtout s'ils contiennent des sucres en quantité importante et subissent une étape de cuisson. Parmi les produits alimentaires les plus riches en AGE, on retrouve des produits tels que la peau de canard rôti, les gâteaux, la sauce de soja et les boissons à base de cola [103 , 104 , 105].
Le temps de formation des AGE par la voie de glycation *in vivo* est plus long que celui des AGE issue de la transformation des aliments, c'est pourquoi la glycation *in vivo* concerne principalement les protéines de longue demi-vie, comme l'albumine, l'hémoglobine et certaines protéines de la matrice extracellulaire [103].
La grande variété des réactions durant la formation des AGE, fait de ces molécules un groupe hétérogène de protéines modifiées, sans classification chimique bien définie. Ces AGE possèdent des caractéristiques différentes selon la protéine qui a été glyquée [106]. Ainsi, lorsque l'on caractérise un AGE bien déterminé, on dénomme le type de glycation d'une protéine dont on doit préciser le nom : pentosidine-albumine ou pentosidine-β2microglobuline (β2M) [107].
Au cours de la glycoxydation, le glyoxal et le méthylglyoxal, formés par auto-oxydation du glucose ou de dérivés glycolipidiques, peuvent réagir avec les groupements aminés libres (lysine ou arginine) des protéines pour former des AGE.

Seulement quelques AGE ont pu être caractérisés et identifiés *in vivo* [108]. La $^{\varepsilon}$N-carboxyméthyllysine (CML), dont la concentration au niveau du collagène de la peau est fortement liée au développement de la rétinopathie, résulte de l'oxydation de la fructose-lysine [109]. Les sels d'imidazolium (glyoxallysinedimère (GOLD) et méthylglyoxallysinedimère (MOLD)) et les $^{\varepsilon}$N(carboxy)éthyl/lysine (CEL), issues de la réaction du méthylgyoxal et du glyoxal avec les protéines, ont également été isolés [110]. Des produits obtenus par couplage entre deux acides aminés glyqués, comme la pentosidine ou les

crosslines, ont aussi été identifiés [111]. La pyrraline est un AGE qui a été détecté au niveau des protéines sériques de patients diabétiques [112].

Par ailleurs, les CML et la pentosidine sont d'ailleurs utilisés comme marqueurs cliniques de la formation de produits de glycoxydation *in vivo* [97]. La glycation des arginines aboutit également à la formation de $^{\varepsilon}$N-carboxyméthylarginine (CMA) [113].

Tous ces produits d'oxydation terminaux ne peuvent plus être modifiés mais augmentent au cours d'un diabète sucré, ce qui fait d'eux des marqueurs d'une hyperglycémie durable et mal régulée chez les patients diabétiques [114 , 115]. La pentosidine à demi-vie longue est retrouvée plus généralement au niveau de la matrice extracellulaire alors que la CML de demi-vie courte est à prédominance sérique [111 , 116]. La pentosidine et la $^{\varepsilon}$N-carboxyméthyl-lysine (CML) sont les plus étudiés, ces AGE sont antigéniques et peuvent être localisés ou mesurés grâce à des techniques faisant intervenir la réaction antigène-anticorps [117].

Cependant, même si la glycation a lieu majoritairement sur la lysine et l'arginine, les résidus cystéines peuvent aussi être la cible de la glycation et aboutir à la formation de S-(carboxymethyl)cystéine [118 , 119].

Les avancées scientifiques en chimie, biochimie et biologie moléculaire ont permis de mieux connaître ces composés depuis leur formation jusqu'à leurs effets cellulaires et tissulaires. La fluorescence des AGE dépend de la présence ou non d'un système aromatique au niveau de leurs structures **(Figure 17)**.

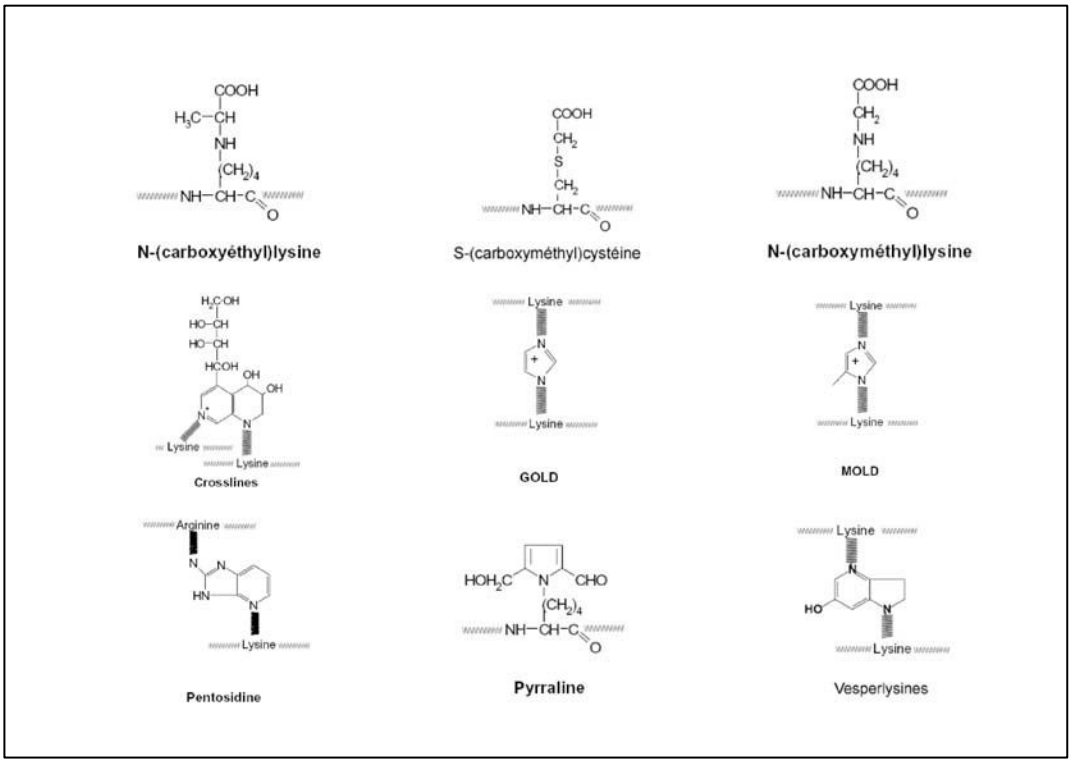


Figure 17. Structures de quelques produits avancés de glycation (AGEs) [108]

II. 3.2 Les récepteurs aux AGE

Les mécanismes physiopathologiques des AGE sur les cellules sont mieux connus notamment, en ce qui concerne les conséquences de la fixation des AGE à des récepteurs membranaires spécifiques dénommés RAGE (Récepteurs aux AGE).

Il existe plusieurs récepteurs aux AGE : AGE-récepteurs 1 (protéine OST-48 du complexe oligosaccharyl-transférase), AGE-récepteurs 2 (protéine 80K-H, substrat membranaire de protéines kinases) et AGE-récepteurs 3 (galectine-3), ou encore les récepteurs scavengers de classe A et B (CD36) **(Figure 18)** [120 , 121 , 122].

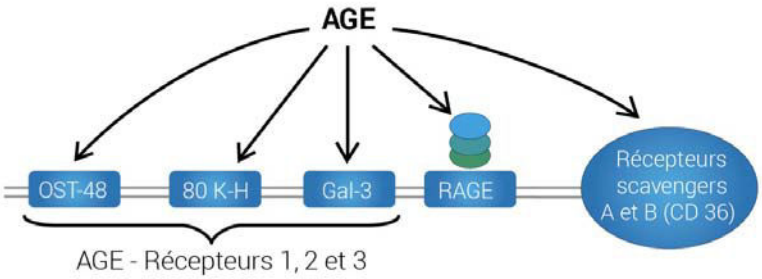


Figure 18. Les différents récepteurs aux AGE

Le récepteur le mieux décrit est le RAGE, une glycoprotéine de 45 kDa exprimée à la surface de nombreuses cellules telles que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les lymphocytes, les monocytes, les polynucléaires et les neurones [123] [124].

Le RAGE appartient à la superfamille des immunoglobulines (Ig) avec une région extracellulaire comportant un domaine variable et deux domaines constants, une région transmembranaire et une intracellulaire. Trois formes de RAGE ont pu être observées et seul le RAGE comportant ces trois régions permet la transduction du signal après liaison avec son ligand **(Figure 19)**.

Le sRAGE, forme soluble extracellulaire fixée ou non à la membrane, lie les AGE sans mettre en jeu la cascade intracellulaire. La troisième forme est le DN-RAGE pour « dominant negative RAGE », qui comporte les parties transmembranaires et extracellulaires liant les AGE tout en restant fermement fixé à la membrane [94 , 125 , 126].

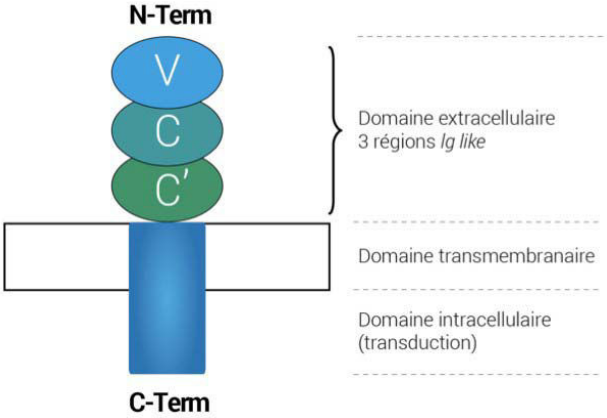


Figure 19. RAGE : le récepteur des AGE

C'est au niveau du chromosome 6 (6p21-3) que le gène du récepteur RAGE est localisé, dans la région du complexe majeur d'histocompatibilité HLA de classe III [127]. Plusieurs travaux ont étudié le polymorphisme des gènes des récepteurs aux AGE [128]. Le RAGE est très conservé entre les espèces, avec un important degré d'homologie entre le RAGE humain, bovin et murin (80 % d'homologie).

II.3.3. AGE et complications associées

L'augmentation du taux d'AGE dans l'organisme est à l'origine de nombreux désordres métaboliques associés au stress oxydant [129]. L'interaction des AGE avec leurs récepteurs induit des altérations cellulaires à l'origine des complications liées au diabète [101]. On constate en effet une présence plus élevée d'AGE dans les pathologies comme le diabète, l'obésité ainsi que les pathologies associées comme l'athérosclérose et les néphropathies [130]. Nakamura a en effet montré que chez les patients diabétiques, les AGE sont présents en excès au niveau des artères coronaires et plus particulièrement des plaques d'athérome [131 , 132 , 133 , 134].

La fixation des AGE sur le RAGE déclenche une signalisation entraînant un stress oxydant intracellulaire et l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (MAP kinase, NF-| b..) [96]. En effet, la fixation des AGE sur leurs récepteurs membranaires spécifiques déclenche une série de réactions en cascade qui contribuerait, entre autres, à la formation d'espèces réactives oxygénées (ROS) induisant ainsi un stress oxydant intracellulaire [129].
Ce stress s'accompagne de signaux cellulaires impliquant l'activation de la $p21_{ras}$ et des MAP-kinases, ainsi que du facteur de transcription NF-| B qui permet l'activation de différents gènes impliqués dans l'inflammation comme les cytokines pro-inflammatoires (Il-1a, IL-6 et TNF-⟨(), ou impliqués dans l'adhésion cellulaire (VCAM-1), la vasoconstriction (endothéline-1) ou la coagulation (thrombomoduline) **(Figure 20)** [135 , 136].

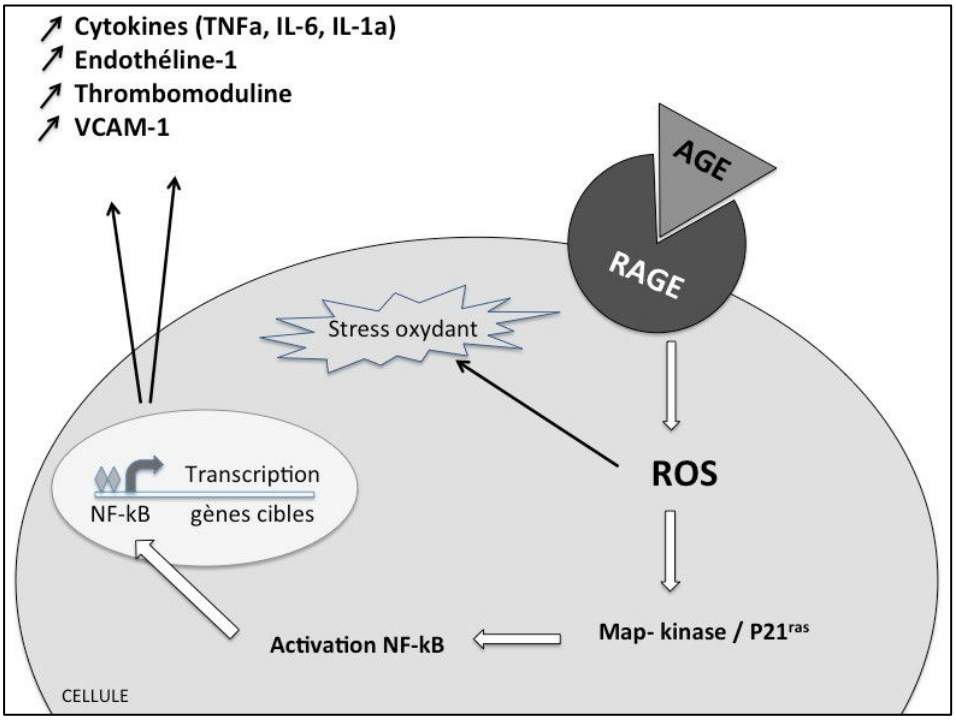


Figure 20. Effets de la fixation des AGE sur leurs récepteurs RAGE.

La présence des AGE dans le plasma est corrélée au développement d'anomalies cliniques car ils ont la particularité d'être des protéines à durée de vie prolongée. L'accumulation tissulaire des AGE et les perturbations cellulaires suite à leur liaison à des récepteurs, sont responsables de leur action délétère.

Dans le cas du diabète, l'apparition des complications à long terme est corrélée à la qualité de l'équilibre glycémique, donc à l'intensité de la glycation [31]. Lors d'une hyperglycémie non contrôlée, les AGE s'accumulent dans les tissus et causent alors des effets néfastes [119].

Ces conséquences au niveau cellulaire montrent que le diabète prédispose au développement de complications vasculaires (maladies cardiovasculaires) mais aussi des maladies inflammatoires [137].

L'activation de ces voies inflammatoires par les AGE induit une augmentation de l'expression des gènes codants pour les cytokines mais aussi l'expression du gène codant pour RAGE lui-même [137]. Ceci se traduit par une augmentation du nombre de récepteurs RAGE à la surface des cellules contribuant à une augmentation de la signalisation par RAGE.

La liaison AGE-récepteur au niveau de l'endothélium, mais aussi des monocytes-macrophages, conduit à la production de cytokines, de facteurs de croissance, à l'expression de molécules d'adhérence, à l'enclenchement d'une activité procoagulante. La rétinopathie

diabétique est liée à une sécrétion exagérée de facteur de croissance vasculaire (vascular endothelium growth factor VEGF). L'augmentation de la perméabilité, la facilitation de la migration leucocytaire, la production de formes réactives de l'oxygène, de cytokines et de VEGF suggèrent que les AGE pourraient être un élément d'une cascade de réactions responsable de l'angiopathie diabétique et d'atteintes vasculaires observées au cours du vieillissement ou de l'insuffisance rénale chronique [138].

De même, la fixation des AGE sur ses récepteurs induit la sécrétion de certains facteurs qui vont contribuer à la diminution de la sensibilité des cellules à l'action l'insuline, conduisant ainsi à la genèse du diabète de type II [137].

III.3.4 Elimination des AGE

Actuellement, les AGE sont qualifiés de « glycotoxine » et sont retrouvés en excès dans les tissus au cours du vieillissement, du diabète et de l'insuffisance rénale [30]. L'élimination des AGE dans le métabolisme dépend avant tout du catabolisme de la protéine concernée mais aussi de sa clairance rénale. Les protéines glyquées vont pouvoir être éliminées par des protéases de type pepsine ou trypsine.

Cependant, récemment plusieurs stratégies anti-AGE ont été envisagées. Tout d'abord, le chercheur Swergold a émis l'hypothèse que la glycation non enzymatique pouvait être contrôlée par un processus enzymatique via la fructosamine-3-kinase (F3NK). La F3NK phosphorylerait la fructosyllysine en fructosyllysine-3-phosphate (F3LP) [139], composé instable, qui se décompose spontanément en lysine, en 3-désoxy-glucosone et régénère simultanément une protéine non modifiée. Une diminution de taux d'albumine glyquée a été observée. La preuve d'une activité de déglycation enzymatique *in vivo*, a soulevé une question: La déglycation enzymatique est-elle vraiment un mécanisme de défense important ou un épiphénomène? [140].

Aussi, d'autres stratégies anti-AGE apparaissent comme des voies de recherches intéressantes dans le but de prévenir des complications associées au diabète. Ces stratégies pourraient intervenir à deux niveaux différents : l'inhibition de la formation des AGE ou l'antagonisation des effets des AGE sur leurs récepteurs RAGE.

Plusieurs molécules comme l'aminoguanidine apparaissent comme un bon agent bloquant de la conversion des produits d'Amadori en AGE [141]. Aussi la metformine, connue pour ses

propriétés normoglycémiantes pourrait agir sur d'autres précurseurs des AGE et donc inhiber sa formation [142].

La deuxième stratégie réside dans l'action de bloquer l'accès des AGE à leurs récepteurs en utilisant par exemple des formes solubles de RAGE (sRAGE) ou des anticorps (Anti-RAGE) afin de prévenir des complications au cours du diabète [125]. Certaines études ont déjà pu montrer l'effet bénéfique du sRAGE dans le ralentissement de la progression de l'athérosclérose [143 , 144].

Enfin, l'albumine, protéine plasmatique la plus abondante dans le sang, serait l'une des stratégies possibles selon certaines études qui corrèlent un diabète sévère à une diminution du taux d'albumine plasmatique. En effet, ces travaux ont pu montrer que la diminution en albumine était associée à une augmentation de la glycation de nombreuses protéines du plasma (hémoglobine, apolipoprotéines, insuline…). L'albumine pourrait donc jouer un rôle particulier comme agent thérapeutique afin de maintenir l'albuminémie chez les patients diabétiques, permettant ainsi la protection des autres protéines plasmatiques contre les effets néfastes de la glycation [145] [146].

Toutes ces voies de recherches très prometteuses montrent qu'il existe des thérapies possibles pour diminuer les effets des AGE mais seul un bon suivit de la glycémie permet la prévention leurs apparitions et de leurs effets sur l'organisme.

III. L'ALBUMINE : UN MODELE DE GLYCATION

Les protéines sont des macromolécules primordiales pour le bon fonctionnement de l'organisme. Elles sont présentes dans tout le corps humain et jouent de nombreux rôles. Elles assurent des fonctions importantes au niveau cellulaire et sont regroupées en deux catégories : les protéines de structure et les protéines fonctionnelles. Les protéines de structure servent à organiser l'architecture des tissus et des organes, tandis que les protéines fonctionnelles assurent le fonctionnement cellulaire sous la forme de transporteur, d'anticorps, d'hormones, ou d'enzymes. Parmi ces protéines, certaines sont plus exposées aux altérations de type glycoxydant observées lors de la pathologie diabétique comme les protéines circulantes et les protéines de la matrice extracellulaire. Parmi les protéines circulantes, l'albumine est particulièrement sensible à la glycoxydation [147].

III.1- Généralités sur l'albumine

L'albumine est probablement la protéine la plus étudiée dans le monde scientifique, et ce, depuis des décennies [148]. Cette protéine plasmatique produite exclusivement par le foie fait partie de l'une des premières protéines découvertes [148]. Ses nombreuses fonctions ont intéressées des générations de scientifiques de tous domaines, aussi bien en raison de ses nombreuses fonctions biologiques que pour sa structure. En effet, le médecin grec Hippocrate avait noté dans l'une de ses œuvres que l'aspect en mousse de l'urine était sûrement causé par l'albumine, reflétant ainsi une maladie du foie. Le mot « albumine » vient du latin « *albus* » qui signifie blanc, comme la couleur du blanc d'œuf qui est majoritairement composé de cette protéine.

En 1840, l'albumine a été isolée pour la première fois par le physiologiste français C.Denis, à partir du sérum par la technique de dialyse, qui consistait à immerger dans de l'eau un sac d'intestin rempli de sérum sanguin. L'albumine est la protéine la plus abondante du plasma avec une concentration plasmatique qui se situe entre 35 et 50 g/L [149] [150]. Cette protéine a la propriété d'être très soluble et possède une longue demi-vie d'environ 21 jours.

III.2- Structure de l'albumine

L'albumine humaine (HSA pour « human serum albumin ») contient dans sa structure primaire 585 acides aminés et possède un poids moléculaire de 66 438 Da.

On observe 609 acides aminés au niveau du gène de l'albumine mais 585 seulement sont retrouvés dans la forme finale de l'albumine présente dans le sang. Contrairement aux autres protéines plasmatiques, l'albumine présente peu de polymorphisme et de mutation au niveau de son gène, elle a donc une structure identique chez tous les individus de l'espèce humaine mais présente quelques légères différences de séquences avec celles des autres espèces animales, comme la sérum albumine bovine (BSA pour « bovin serum albumin »).

La structure du gène de l'albumine possède une ressemblance familière avec celle de l'α-fœtoprotéine, protéine qui n'est normalement produite que par le fœtus au cours de son développement [148].

La HSA et la BSA ont une homologie très forte au niveau de la séquence polypeptidique ainsi que sur le plan structural. En effet, leurs structures primaires diffèrent au niveau de plusieurs résidus ayant des propriétés hydrophobes identiques n'affectant en rien la structure tridimensionnelle de la protéine [151] **(Figure 21).** La structure particulière de l'albumine permet d'expliquer ses multiples fonctions et rôles au sein de l'organisme qui seront détaillés par la suite [152].

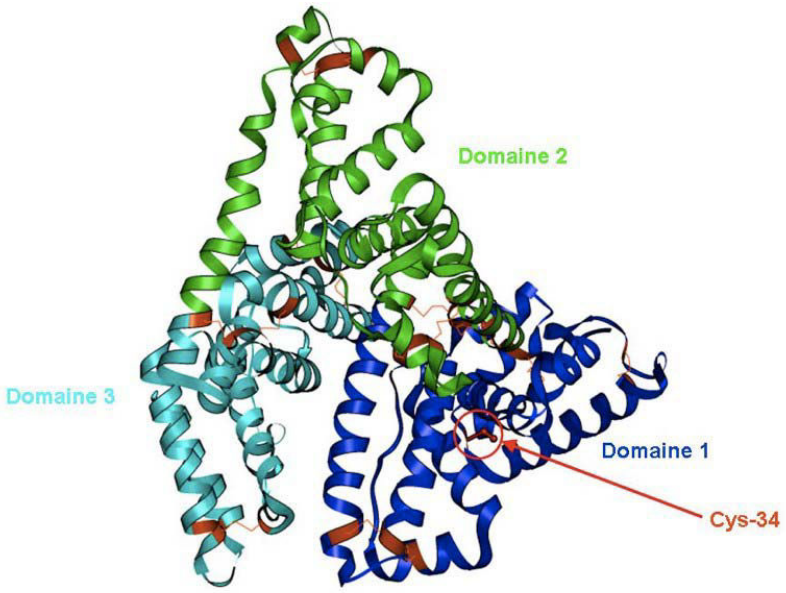


Figure 21. Structure tridimensionnelle de l'albumine **[119].**

La structure de l'albumine est constituée de trois domaines homologues, nommés domaines I, II et III, en grande partie de forme hélicoïdale. Chacun de ces domaines possède deux grandes boucles séparées par une plus petite boucle, ce qui amène à sous-diviser chaque domaine en sous-domaines A et B. Les boucles 1-2, 4-5 et 7-8 sont ainsi nommées sous-domaines IA, IIA et IIIA, tandis que les boucles 3, 6 et 9 sont nommées sous domaines IB, IIB et IIIB **(Figure 23)** [148].

Cette organisation est maintenue par 17 ponts disulfures qui assurent une stabilité et une flexibilité de la structure tertiaire de la protéine. L'albumine possède dans sa structure un seul résidu cystéine libre en position 34 (Cys-34) qui n'est pas impliqué dans ces liaisons disulfures et qui de ce fait se trouve à l'état réduit. Cette cystéine, qui est le principal site de neutralisation des radicaux libres hydroxylés, serait notamment impliquée dans des processus d'agrégation de la protéine par voie thermique [153].

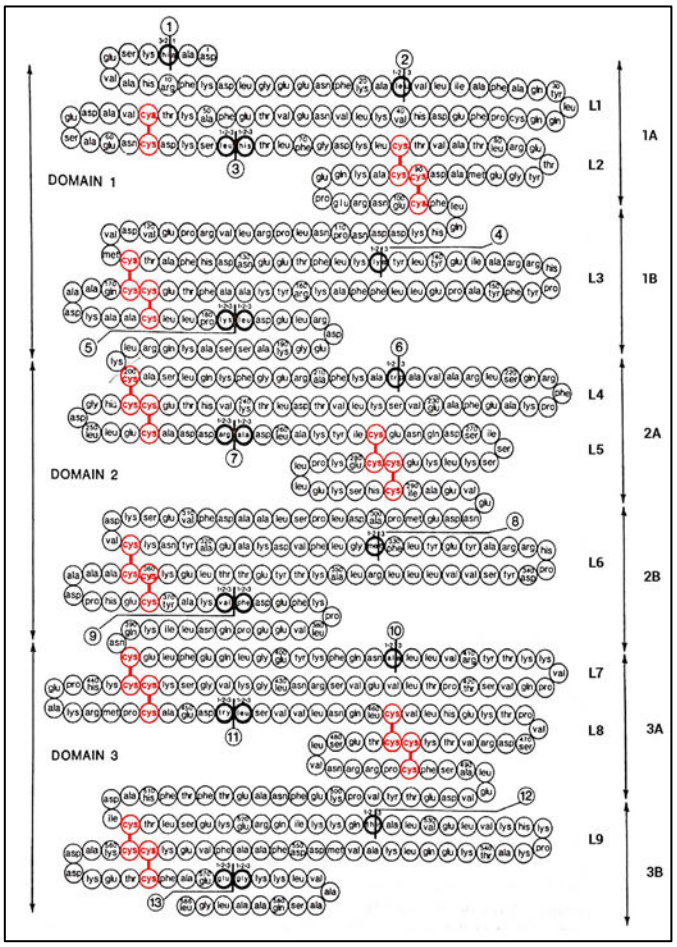


Figure 22. Les domaines et sous-domaines de l'albumine (L = loops ou boucle) (*sources : Peters T.)*

Parmi les acides aminés basiques présents dans la structure de l'albumine, soit 24 résidus arginine et 59 résidus lysine [148], certains ont été répertoriés pour être des sites privilégiés susceptibles d'être modifiés par la glycoxydation [154]. Des études ont montré que parmi ces résidus, la Lys-525 était le site privilégié de la glycation de l'albumine [154 , 155 , 156 , 157].

III.3- Les fonctions de l'albumine

L'albumine possède de nombreuses fonctions au sein de l'organisme qui peuvent être d'ordre physiologiques ou pharmacologiques. Elle est reconnue pour être un transporteur de métabolites mais aussi pour représenter un agent protecteur qui participe à l'homéostasie sanguine.

III.3.1-Régulateur de la pression oncotique

L'albumine est une protéine plasmatique indispensable dans la régulation de la pression oncotique. En effet grâce à son faible point isoélectrique (pH isoélectrique égale à 4,7) qui lui confère une charge nette négative à pH 7,4 (pH sanguin) et son faible poids moléculaire (67 kDa) [158], elle peut participer à l'équilibre de Donnan [159]. Ce dernier vise à avoir un équilibre de charges entre le plasma et le liquide interstitiel grâce à un équilibre du potentiel de diffusion ionique.

Ceci permet d'éviter le passage de l'eau des vaisseaux aux tissus lors d'un déséquilibre ionique. En effet, une diminution du taux d'albumine dans le sang (hypoalbuminémie) est problématique : la pression oncotique est abaissée, l'eau quitte alors les vaisseaux pour gagner les tissus provoquant ainsi des œdèmes. Ce cas est rencontré lors d'une hypoalbuminémie dans la maladie de Kwashiorkor affectant principalement les enfants d'Afrique ayant une dénutrition protéique grave [160].

III.3.2- Protecteur de l'organisme

À travers son rôle de transporteur, l'albumine apparaît comme un protecteur de l'organisme face à un catabolisme excessif. En effet grâce à la fixation de certaines substances à

l'albumine, les rendant ainsi inactives, la protéine contribue à protéger l'organisme d'un excès de métabolites libres dans le corps, pouvant induire une toxicité. Elle constitue donc à travers ce processus une forme de réserve circulante pour les métabolites, permettant ainsi, grâce à un relargage, de les rendre utilisables et actifs [148]. L'effet protecteur de l'albumine est attribué à ses capacités de fixation et de transport. L'albumine neutralise les activités néfastes de certains agents exogènes et endogènes par séquestration, grâce à son affinité pour ces derniers, diminuant ainsi leur effet toxique dans l'organisme [161].
C'est le cas de la bilirubine qui est un produit de dégradation de l'hémoglobine et qui peut être fortement toxique pour l'organisme lorsqu'elle se trouve à l'état libre. L'albumine va se fixer à la molécule de bilirubine pour inhiber son effet toxique mais aussi pour permettre son acheminement vers le foie où elle va être conjuguée à un acide glucoronique et devenir « inoffensive » [162].
Le caractère protecteur de l'albumine se manifeste aussi à travers des propriétés antioxydantes inhérentes à la protéine.

Parmi les nombreuses fonctions de l'albumine, les trois suivantes seront longuement détaillées puisqu'elles constituent les axes principaux de mes recherches.

III.3.3- Effet antioxydant

L'albumine possède des propriétés antioxydantes. Elle est considérée comme la principale molécule antioxydante dans le plasma mais aussi la plus abondante [86]. Le plasma est un compartiment en constante exposition au stress oxydant, ce qui rend important ce rôle d'antioxydant. Cette propriété particulière, notamment due à sa capacité de liaison à de nombreux ligands, peut être altérée lors de modifications structurales. Si d'autres protéines plasmatiques possèdent des propriétés protectrices équivalentes, comme la ceruloplasmine ou l'acide urique, 70 % de l'activité antioxydante du plasma est principalement due à l'albumine [86 , 161].
Ces propriétés antioxydantes sont attribuées à différentes parties ou éléments de l'albumine détaillés ci-après.

a. La cystéine 34

D'un point de vue structural, le résidu cystéine libre Cys-34 de l'albumine constitue l'un des principaux sites impliqués dans ses propriétés antioxydantes [86, 163 , 164].

Ce seul résidu cystéine à l'état réduit (-SH), représente un site essentiel de la protection antioxydante, contre les radicaux libres hydroxyles $OH^{\bullet\bullet}$, ainsi que contre des agents oxydants et nitrants puissants comme le peroxynitrite NO_3^- et l'oxyde nitrique NO^- [165]. L'oxydation de ce résidu Cys-34 (-SH) par le radical hydroxyle ($OH^{\bullet\bullet}$) ou par le peroxynitrite entraine la formation d'acide sulfénique (-SOH) qui représente le principal intermédiaire dans la modulation du statut redox [166 , 167]. Ce dernier est notamment impliqué dans la formation de disulfide (-SS-), attestant du rôle régulateur du résidu Cys-34 de l'albumine humaine dans le compartiment extracellulaire [163]. De plus, la présence d'un seul groupement thiol sur l'albumine permet la protection totale de cette dernière contre les radicaux peroxyles ($ROO^{\bullet\bullet-}$) [168].

b) Liaison à des métaux

La fixation de ligand type cationique, tel que l'ion cuivre (Cu^{2+}) et l'ion fer (Fe^{2+}) sur l'albumine contribue également à l'activité antioxydante de la protéine. En effet, ces cations sont à l'origine de la formation de radicaux peroxydes délétères pour l'organisme. Ces ions réagissent avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) selon la réaction de Fenton et contribuent à la formation de ROS. La fixation de ces ions métalliques sur l'albumine peut ainsi diminuer la formation de ROS en évitant qu'ils ne participent à la réaction de Fenton.

Si la concentration physiologique en fer est plus importante que celle en cuivre, c'est ce dernier qui réagit d'avantage (60 fois plus vite) avec le H_2O_2 pour former des radicaux hydroxyles ($OH^{\bullet}$) [64].

De même, l'albumine peut servir de transporteur d'oligo-éléments comme le zinc Zn (II), qui est un cofacteur de nombreux systèmes enzymatiques indispensables à la synthèse protéique et à la prolifération cellulaire [169]. Le zinc intervient également dans les défenses anti-oxydantes et le métabolisme thyroïdien [169]. Le Cu(II) endogène et le nickel Ni(II) possèdent un site de liaison spécifique sur l'albumine (humaine et bovine) qui se compose des 4 premiers acides aminés Asp-Ala-His-Lys (DAHK) de la partie N-terminale de la protéine [170].

Ce site constitue un facteur important dans la prévention de la formation des radicaux libres. En effet, certaines études montrent que des polypeptides ayant une séquence N-terminale analogue à l'albumine (DAHK), peuvent également avoir la capacité de séquestrer le cuivre et donc d'empêcher la formation de ROS [171].

Un second site de fixation au Cu(II) a pu être caractérisé chez l'albumine humaine et bovine. Ce second site n'est pas spécifique puisqu'il peut fixer de nombreux métaux comme le Ni(II), le Zn(II) ou le Cd(II) qui se lient avec des affinités identiques au cuivre. Ce site est localisé dans une région située entre les domaines I et II de la protéine [148].

c) Liaison à des molécules antioxydantes

La fixation de certaines molécules antioxydantes sur l'albumine contribue aux propriétés antioxydantes de cette dernière. Par exemple, la bilirubine est un composé toxique, mais également antioxydant qui neutralise les radicaux libres susceptibles d'infliger des dommages aux cellules. En se fixant à l'albumine, ce pigment rouge protège à la fois l'alpha-tocophérol contre les altérations induites par les radicaux peroxydes et contre la peroxydation lipidique des LDL [172].

Parmi les lipides, les acides gras polyinsaturés (AGPI) constituent des composés fortement oxydables du plasma. Ils participent à la protection contre les maladies cardiovasculaires en favorisant la baisse du cholestérol transporté par les LDL (lipoprotéine de basse densité). L'albumine possède des sites hydrophobes ayant une forte affinité pour les AGPI. La fixation de ces AGPI à l'albumine permet donc de les protéger de la peroxydation lipidique. Cette protection est augmentée lorsque l'albumine fixe en même temps des antioxydants, comme la bilirubine [173].

L'albumine a aussi la capacité de fixer l'homocystéine, qui est un produit soufré issu du catabolisme de la méthionine. Cette homocystéine peut provoquer un stress oxydant à forte concentration dans le plasma et ainsi engendrer la formation de ROS fortement impliqués dans l'athérosclérose. Le piégeage de l'homocystéine par l'albumine permet d'atténuer ces complications [174].

Enfin, d'autres études ont pu montrer que les six résidus méthionines de l'albumine constituent de véritables « éponges » à oxydants en protégeant la protéine de modifications importantes. En effet, les méthionines sont des acides aminés sensibles et leurs oxydations

n'affectent en rien la fonction biologique de la protéine. Grâce à ses méthionines, l'albumine se positionne comme un véritable système de neutralisation de ROS [74].
Tous ces exemples nous montrent comment l'albumine joue un rôle primordial dans les processus luttant contre le phénomène de stress oxydant au niveau plasmatique.

III.3.4- Les fonctions de transport

L'albumine a été précédemment décrite comme un transporteur, un protecteur et un antioxydant à travers ses multiples capacités de liaisons attribuées à la grande flexibilité de sa structure. La présence de 3 domaines sur sa structure apporte à l'albumine une grande variété de sites de liaisons.
De récentes études, utilisant des protéines recombinantes et la cristallographie par rayon X, ont pu donner de nouvelles informations sur les propriétés de liaisons de l'albumine à ses ligands [168, 175 , 176]. Les ligands de l'albumine sont souvent des molécules hydrophobes, qui grâce à leurs liaisons avec l'albumine facilitent leurs transports dans le sang [177].

a) Transporteur de métabolites et de drogues

L'albumine peut fixer de nombreuses molécules endogènes comme les hormones (hormones thyroïdiennes ou stéroïdes), les ions métalliques (Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}…) ou encore des acides aminés telles que le tryptophane et la cystéine [178]. Cette grande capacité de liaison fait de cette protéine un transporteur indispensable de métabolites.
C'est l'albumine qui permet le passage des sels biliaires (hydrophobes) de l'intestin grêle au foie. Aussi, la bilirubine produite par la rate, est transportée vers le foie par le biais de l'albumine. Cette protéine décrit différentes voies de transports selon la molécule qu'elle transporte **(Figure 23)**.

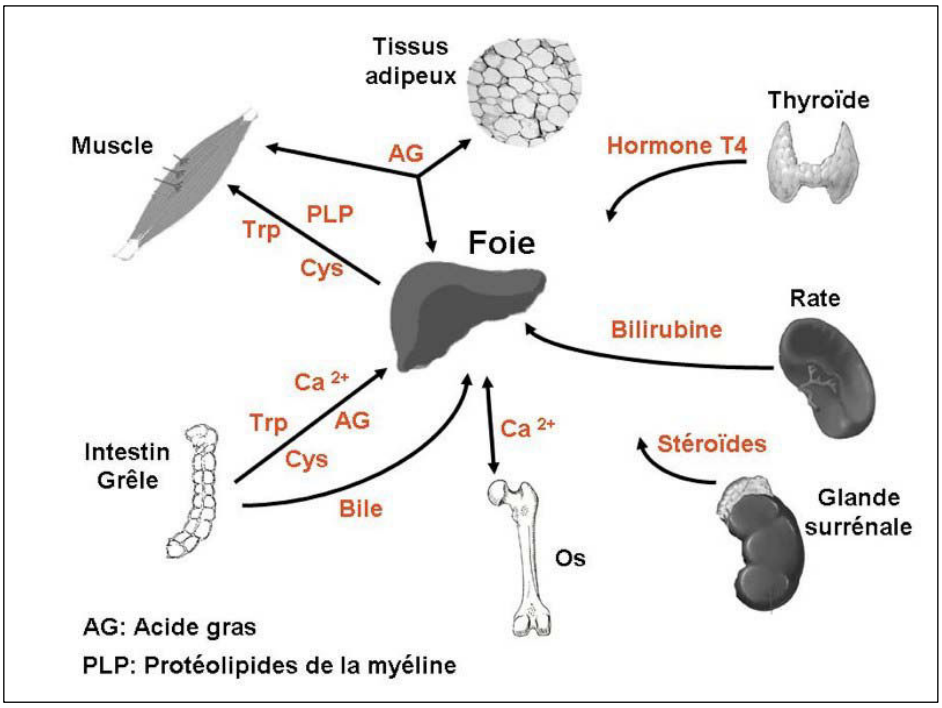


Figure 23. Les différentes voies de transport de l'albumine [29].

L'albumine constitue aussi un véritable transporteur de molécules exogènes comme les médicaments.

b) L'affinité de l'albumine pour les molécules thérapeutiques

L'albumine lie de manière réversible des molécules thérapeutiques hydrophobes et permet à ces dernières d'être plus solubles et d'augmenter leur durée de vie dans le sang, avant d'être métabolisées et excrétées. La fixation de médicaments aux protéines plasmatiques, et plus principalement l'albumine, conditionne les propriétés pharmacocinétiques de ces molécules en influençant directement leur distribution dans l'organisme et indirectement leurs métabolisations et leurs excrétions [179]. L'albumine permet aussi, grâce à ses capacités de liaison d'avoir un effet protecteur contre leurs oxydations [180]. Dans les nombreuses études sur l'affinité de la protéine aux médicaments, deux principaux sites de fixation ont été décrits au niveau de l'albumine : les sites de Sudlow I et II. En effet, la majorité des molécules à visée thérapeutique se fixe sur ces deux sites localisés respectivement dans les sous-domaines 2A et 3A [181]. Ces sites sont en constante concurrence car leurs capacités de fixation nécessitent des changements conformationnels de la structure tertiaire de la molécule d'albumine modifiant ainsi leurs accessibilités [148].

Le site I est connu pour lier en général des anticoagulants comme la Warfarine® et les anti-inflammatoires comme l'azapropazone, la phénylbutazone et des salicylates [182]. Pour ce site, les ligands sont souvent des acides carboxyliques ou des hétérocycles volumineux chargés négativement. Ce site est très large car il doit pouvoir également accueillir de grosses molécules comme la bilirubine. Plusieurs études suggèrent aussi que ce site est très flexible [119]. En effet, une grande variété de molécules chimiques de structures différentes liant cette région avec une grande affinité, suggère que ce site est très modulable [175].

Les médicaments comme l'Ibuprofène®, le Fénoprofène®, le Kétoprofène® et les benzodiazépines se lient plutôt au site II, qui est également le site de fixation de l'acide aminé essentiel, le L-tryptophane [1]. Les paracétamols, encore appelés acétaminophène, médicaments analgésiques couramment utilisés (Doliprane®, Efferalgan®), se fixent essentiellement aux résidus situés dans le sous-domaine 3A, correspondant au site II [164, 177]. Appelé aussi site indole-benzodiazepine, le site II est le site préférentiel des acides carboxyliques souvent aromatiques chargés négativement. Le site II semble être plus petit, ou plus étroit, que le site I [183]. Il semble aussi être moins flexible, et ses ligands sont souvent fortement affectés par la stéréosélectivité. L'exemple classique est la découverte que le L-tryptophan se lie à l'albumine avec une affinité 100 fois plus forte que son énantiomère D [184]. L'étude de la structure de l'albumine en cristallographie rayon X a pu montrer que le site II est une poche construite de la même façon que le site I.

Une liste de médicaments et molécules endogènes se liant aux différents sites de l'albumine est répertoriée dans le tableau I.

Tableau I. Exemples de ligands à grande affinité pour l'albumine, liés au site I ou II [1].

Site	*Ligands à affinité élevée pour l'albumine*	
	Médicaments	**Composés endogènes**
I	**Warfarine**, Azapropazone, Phenylbutazone Acenocoumarole , Salicylate Indomethacine Tolbutamide, Chlorpropamide, Iophenoxate Iodipamide, Sulfadimethoxine, Sulfathiazole, Furosemide, Quercetine, Benzylthiouracile	Bilirubine Eicosanoides 3-Carboxy-4-methyl 5-propyl-2- furanpropanoate
II	Diazepame, **Ketoprofène**, Chlofibrate, Iopanoate, Ibuprofen, Pirprofene, S-Naproxene Ethacrynate, Chlorothiazide, Flurbiprofene	Octanoate L-Tryptophane Monooleoyl glycerole L-Thyroxine, Chloride ion Indol-3-acetate Indoxylsulfate, Hippurate

De même, grâce à la cristallographie par rayon X, une carte de quelques sites spécifiques de l'albumine a pu être établie pour certains médicaments. D'autres sites minoritaires de l'albumine ont été identifiés pour leurs affinités à d'autres molécules thérapeutiques, comme les sites cleft, IB et IIIB illustrés sur la **Figure 24**.

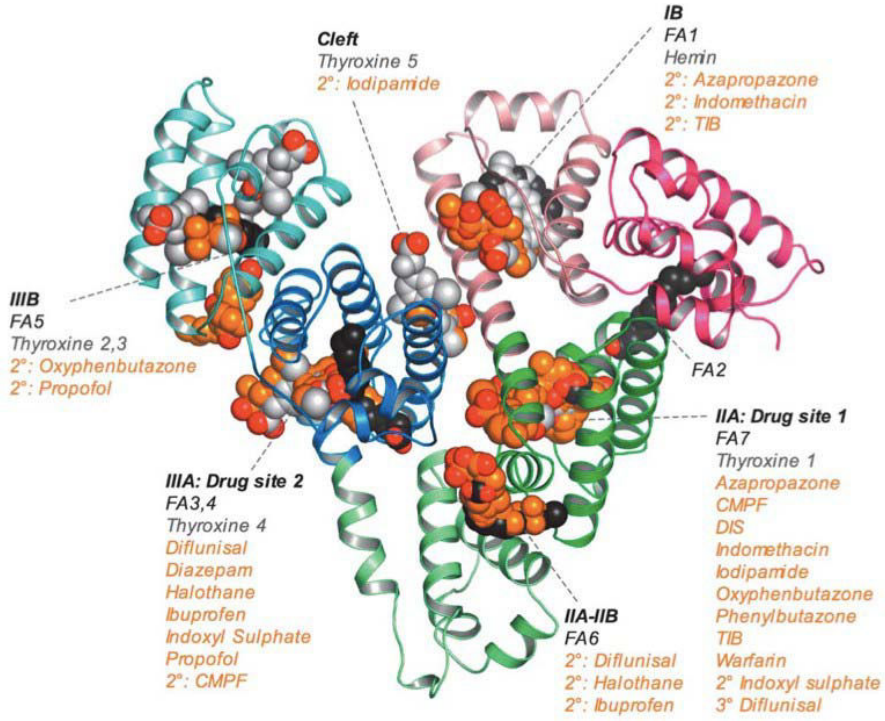


Figure 24. Quelques exemples de site de liaison de l'albumine observée par cristallographie rayon X [1]

c) Conséquences de l'affinité sur la pharmacocinétique

L'affinité de l'albumine pour certains médicaments déterminera la fraction libre de ces derniers dans le sang. La fraction libre d'un médicament étant considérée comme sa part active (fraction porteuse de l'effet pharmacologique), une augmentation de cette fraction peut être à l'origine d'une augmentation de l'effet de ce même médicament et donc d'un possible effet toxique. En effet, de nombreuses études suggèrent que les propriétés de liaison de l'albumine aux molécules thérapeutiques peuvent avoir des conséquences sur leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques [182]. Une modification structurale de l'albumine peut donc modifier la liaisons du médicaments à l'albumine et donc influencer leur effet thérapeutique [185]. L'ensemble de ces propriétés afférentes à l'albumine permettra de déterminer l'avenir de drogues dans l'organisme influençant leurs propriétés pharmacologiques et toxiques.

d) Exemple de médicaments se liant à l'albumine : La Warfarine® et le Kétoprofène®

Dans les études qu'on abordera, nous nous intéresserons à deux médicaments : la Warfarine® et le Kétoprofène®.

La Warfarine

Appelé également coumaphène ou encore (R,S)-4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phénylbutyl) coumarine, la Warfarine® est une substance active anticoagulante utilisée dans des produits phytosanitaires (pesticides) mais aussi en thérapeutique **(Figure 25)**. Cette molécule présente en effet des propriétés antivitaminiques K et inhibe la synthèse hépatique des facteurs procoagulants vitamine K-dépendants (II, VII, IX et X). Elle se lie fortement à l'albumine et constitue une sonde majeure permettant d'étudier la capacité de liaison du site I de l'albumine. Ce médicament possède une faible marge thérapeutique et peut être à l'origine d'une toxicité à l'état non lié. En effet, il a été établi que la concentration minimale efficace (CME) de la Warfarine® est comprise entre 1 et 7 mg/ml, tandis que sa concentration toxique minimale (CMT) est supérieure à 10 mg/ml [186]. Cela impose donc une surveillance stricte de son utilisation et de sa posologie, qui est propre à chaque malade. Ce dosage est souvent très laborieux car il est personnalisé et demande une connaissance des antécédents du malade concernant ce médicament [187].

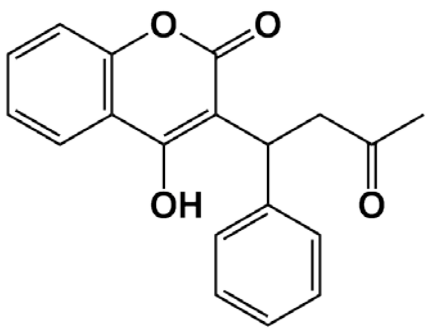


Figure 25. Structure de la Warfarine®

Le Kétoprofène

Ce médicament est le mélange racémique de l'acide (±)-2-(3-benzoylphényl)propionique **(Figure 26).** C'est un membre de la classe des dérivés de l'acide propionique, une subdivision des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) avec en plus des effets analgésiques et antipyrétiques. Il est connu pour se lier fortement au site II de l'albumine mais de récentes études ont pu montrer qu'il peut se fixer aussi au site I de manière stéréospécifique [188].

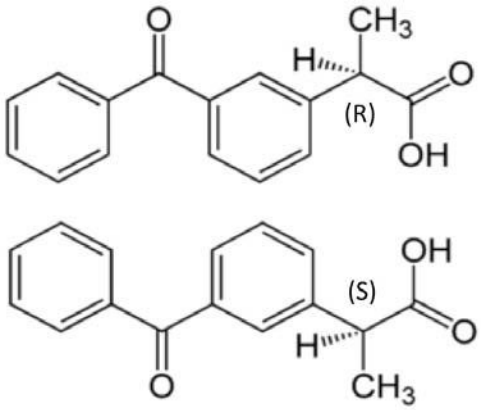


Figure 26. Structures des énantiomères *R*- et *S*-Kétoprofène

En effet, une étude des liaisons spécifiques effectuée à l'aide de ligand spécifique, servant de sonde, a pu démontrer que l'énantiomère S-Kétoprofène® se lie exclusivement au site I,

tandis que l'énantiomère R-Kétoprofène® possède une grande spécificité de liaison pour le site II [189].

Ces deux médicaments précédemment décrits ne sont pas prescrits dans le cadre du diabète mais sont des médicaments que les malades sont souvent contraints de prendre contre les complications liées au diabète.

III.3.5- Les fonctions enzymatiques

a. L'albumine : une pseudo-enzyme

En plus de ces capacités de liaison à des ligands, l'albumine possède des activités enzymatiques très intéressantes au sein de l'organisme, qui ont montrés leur importance physiologique.
En effet, l'albumine possède des propriétés de type enzymatique mais n'est pas considérée comme une enzyme comme la définition l'exige. Ces activités pseudo enzymatiques sont de plusieurs types :

- La HSA possède une activité de type énolase avec la dihydrotestostérone. Le site actif responsable de cette activité est assigné à l'extrémité C-terminal de la protéine. L'activité énolase dépend de la concentration en protéine et est inhibée par sa liaison avec des ions cuivre et nickel, à l'acide oléique, au cholestérol et à des agents tensioactifs [175].

- Une activité de type aryle acylamidase a également été démontrée chez l'albumine en utilisant comme substrat le o-nitroacetanilide. L'inhibition de l'activité de l'aryle acylamidase de l'albumine par le diisopropylfluorophosphate a été montrée. Les études réalisées sur cette activité aryle-acylamidase de l'albumine ont mis en évidence que le site actif de cette fonction enzymatique est identique au site de l'activité estérase [190 , 191].

- La HSA possède aussi une activité glucuronidase qui facilite l'isomérisation et l'hydrolyse stéréosélective de glucuroconjugués, et lui permet d'agir en tant que piégeur de glucuronide [192].

- Les albumines humaine et bovine ont la capacité de catalyser l'hydrolyse de molécules d'ARN entre les bases A et U [192 , 193]. Cette capacité de la HSA est inhibée, lorsque ces résidus lysines subissent certaines modifications (acétylation, glycation, N- homocysteinylation ou N-phosphorylation) [194].

- L'albumine sérique possède une activité de type peroxydase lipidique thiorédoxine-dépendante en présence de palmitoyl-CoA. En effet, la liaison au palmitoyl-CoA induit un changement conformationnel de la HSA, responsable de cette activité enzymatique. Le pont disulfure entre les résidus Cyst-392 et Cyst-438 peut être particulièrement réduit par la thiorédoxine. Cette réduction est responsable de l'activité peroxydase lipidique thiorédoxine-dépendante, située dans la région allant des résidus proline (Pro-299) à leucine (Leu-585) [192, 195].

- La HSA catalyse la réaction d'aldolisation de l'acétone et des aldéhydes aromatiques. Cette activité aldolase se produit au niveau du site FA7, où le résidu Lys-199 montre une valeur de pKa faible. En effet, une caractéristique commune des aldolases est la présence d'un résidu d'acide aminé avec une faible valeur pKa dans le site catalytique. Ce résidu est entouré d'un environnement hydrophobe, qui catalyse la réaction d'aldolisation ou de rétroaldolisation [192].

- L'albumine dispose ainsi de différents types d'activité hydrolytique, parmi lesquels l'activité estérase est la prédominante. En effet, l'étude des fonctions de l'albumine a également révélé l'importance du rôle de cette protéine en tant que catalyseur pour l'hydrolyse de différents composés, tels que les esters, les amides et les phosphates [196].

En effet, l'albumine possède une activité estérase à laquelle on s'intéressera dans le cadre des recherches entreprises lors de mon travail de thèse.

b. L'activité estérase

Cette activité enzymatique de l'albumine a été observée pour la première fois en 1951 et a été largement étudiée depuis des décennies [176]. Cependant, malgré les nombreuses études sur ces sites enzymatiques, leurs propriétés et leurs différences entre les espèces restent peu détaillées. En effet, il a été démontré que les activités enzymatiques de type estérase ont été observées plutôt chez les primates que chez les autres animaux [197]. L'albumine du cheval ne possède aucune activité de type estérase, alors que ses structures primaire et tridimensionnelle analysées par cristallographie rayon X diffèrent très peu par rapport à celle de la HSA [148].

L'albumine possède une activité enzymatique de type estérase située au niveau du sous-domaine IIA de HSA (Site I de Sudlow) responsable de la conversion de l'aspirine (acide acétylsalicylique) en l'acide salicylique [198]. L'albumine semble avoir aussi un site enzymatique très réactif et/ou de multiples sites non spécifiques situés quant à eux dans le sous-domaine IIIA, c'est à dire au niveau du Site II de Sudlow [180].

Afin d'identifier certains résidus impliqués dans l'activité estérase, Hiroshi Watanabe et son équipe ont étudié cette activité par mutagenèse dirigée. Ils ont muté deux résidus de la HSA particulièrement conservés dans l'évolution : les résidus arginine 410 et tyrosine 411. Ils ont utilisé le *p*-nitrophényl acétate comme substrat de l'activité estérase et ont suivi la réaction par spectrophotométrie à 400 nm. Suite à ces mutations, une absence de l'activité estérase a été observée montrant donc l'importance de ces deux résidus dans l'activité estérase de l'albumine [176].

Chez de nombreuses espèces animales (y compris le cheval), l'albumine possède également l'arginine et la tyrosine dans les mêmes positions que l'HSA, mais présente des activités enzymatiques différentes [148]. Par conséquent, d'autres facteurs importants actuellement inconnus doivent être aussi impliqués dans les propriétés de cette fonction.

Récemment cette activité estérase a pu être décrite comme utile pour convertir les pro-drogues en médicaments actifs dans le plasma. Cette activité estérase concerne certaines molécules d'une stéréoisomérie bien définie, en d'autres termes cette activité est stéréospécifique [176]. Ikeda et *al*. ont rapporté que certains médicaments inhibaient cette

activité. Il a donc été déduit que les sites catalytiques actifs les plus importants comme les sites pseudo-estérase de l'albumine sérique humaine sont étroitement apparentés aux sites de liaison des médicaments. Nous pouvons donner comme exemple le cas du site actif du para-nitrophényl acétate (PNPA) sur l'HSA, qui correspond au site de liaison de plusieurs benzodiazépines (site II). De même, le site enzymatique de l'hydrolyse aux aspirines est situé à proximité du site de liaison de la Warfarine® (Site I) [199].

c) Quelques exemples de l'activité estérase en pharmacologie

L'activité estérase est utilisée en pharmacologie afin de convertir les prodrogues en médicaments actifs dans l'organisme, permettant ainsi une diffusion du principe actif dans le temps et dans tout l'organisme.

Nous pouvons citer comme exemple l'aspirine. En effet, depuis son introduction en 1892 comme un anti-inflammatoire et puissant analgésique, l'aspirine et son interaction avec HSA, ont été étudiées pendant des décennies [200 , 201]. La structure du complexe HSA-aspirine a été mentionnée dans plusieurs rapports, mais aucun détail n'a été donné, par conséquent, plusieurs questions restent sans réponses. Même si en 1976, Walker proposa que le résidu impliqué dans l'activité estérase de l'HSA était la Lys199 [202], aucune information structurelle n'était connue jusqu'en 2006 où Yang et al élucidèrent la base structurelle de l'activité estérase de l'HSA. Ces récentes études révèlent que l'aspirine transfère son groupe acétyle à l'acide aminé Lys-199 de l'HSA. Les structures par cristallographie rayons X démontrent que l'aspirine et l'acide salicylique se lient à l'HSA à des endroits similaires (site I), mais dans des orientations très différentes [180]. L'acide salicylique peut ainsi effectuer sa fonction au sein de l'organisme, grâce à cette fonction enzymatique.

L'HSA peut aussi activer rapidement par hydrolyse Olmésartan médoxomil®, en médicament actif, l'Olmésartan antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II, un vasoconstricteur [176]. De même, l'HSA peut catalyser l'hydrolyse de composés tels que le para-nitrophényle acétate [203], cinnamoylimidazole, les insecticides organophosphates [204], et les esters d'acides gras à chaîne longue et courte.

L'albumine joue donc un rôle autant dans la physiologie que dans la pharmacocinétique et pharmacodynamique d'un médicament, autant par ses propriétés antioxydantes, ses capacités de liaison aux médicaments, que par son activité estérase. Les sites fonctionnels de ces activités sont cependant à proximité des sites de glycation. Ces fonctions de l'albumine se trouvent donc menacées par la glycoxydation qui a lieu lors d'une hyperglycémie chronique chez les diabétiques.

IV. L'ALBUMINE DANS LA PATHOLOGIE DIABETIQUE

Précédemment, nous avons défini le diabète comme une maladie métabolique à l'origine d'une hyperglycémie chronique. Ainsi, les protéines plasmatiques sont modifiées par le glucose selon un processus non-enzymatique appelé glycation. L'albumine, protéine plasmatique la plus abondante, fait partie de ces protéines particulièrement touchées par les effets délétères du diabète.

La glycation de l'albumine s'effectue au niveau des résidus aminés pour leurs propriétés hautement nucléophiles, comme la lysine et l'arginine, mais elle peut se dérouler aussi au niveau de la cystéine libre (Cys-34). Des études ont pu montrer que la Lys-525 était le site privilégié de la glycation de l'albumine et que les conséquences structurales sont nombreuses [154 , 155 , 156]. Cette fixation de molécules de glucose sur l'albumine augmente le poids moléculaire de la protéine proportionnellement au taux de glycation [205]. Suite à ces diverses modifications structurales, le point isoélectrique de l'albumine se retrouve donc modifié par ce processus [206].

La conformation de la structure tertiaire de l'albumine est aussi particulièrement affectée au niveau du tryptophane (Trp-134), localisé dans une poche hydrophobe proche du domaine I, mettant en évidence une dénaturation partielle de la protéine [207 , 208]. De même, il a été démontré qu'une incubation prolongée de l'albumine en présence d'oses pouvait générer au niveau de la structure de cette dernière la formation de feuillets bêta de type amyloïde, ainsi que la formation des agrégats [209].

L'impact de la glycation sur la structure de l'albumine peut avoir une incidence sur ses propriétés intrinsèques que sont le transport et la protection ainsi que des répercutions au niveau métabolique. Ses fonctions antioxydantes dans l'organisme peuvent être altérées, de même que ses propriétés de liaisons aux molécules. Il a été démontré que la glycoxydation pouvait affecter l'affinité de l'albumine pour de nombreux ligands. La glycoxydation de l'albumine humaine peut entraîner des modifications au niveau de la fixation des médicaments au site I et au site II, probablement dues à des changements conformationnels des différents sous-domaines.

Des taux élevés d'albumine glyquée induisent des dommages irréversibles associés aux troubles métaboliques observés dans le diabète sucré, tels que la rétinopathie, la néphropathie, la neuropathie et les maladies coronariennes [35 , 210].

Parmi les paramètres cliniques utilisés dans le contrôle de l'équilibre glycémique du patient diabétique figurent l'hémoglobine glyquée (HbA1c) et la glycémie à jeun [211]. La mesure du glucose sanguin constitue un suivi à court terme de l'équilibre glycémique (24h) tandis que l'HbA1c renseigne sur sa régulation à long terme (120 jrs). Les quantités d'albumine glyquée reflètent quant à elles, l'équilibre glycémique à moyen terme (21 jrs). De plus des études cliniques ont montrées que le pourcentage d'albumine glyquée était un meilleur indicateur de l'équilibre glycémique que l'HbA1c et la glycémie à jeun, chez les patients présentant des problèmes rénaux, hépatiques ou hémolytiques [212 , 213].

Les effets délétères de l'albumine glyquée et les produits avancés de glycation qui en résultent ont aussi été mis en évidence dans de nombreux *in vivo* et des études *in vitro*. Par exemple, la plupart des études disponibles réalisées par le professeur Cohen ont montré la connexion physiopathologique entre albumine glyquée et déficience rénale diabétique et la microangiopathie [214].

Une meilleure description de ces phénomènes et prédiction des changements conformationnels de l'albumine glyquée pourrait permettre de mieux caractériser les conséquences de cette protéine modifiée durant le diabète.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

La glycoxydation est un processus délétère responsable des altérations structurales affectant notamment les protéines circulantes. Il est la résultante de l'effet combiné de deux phénomènes mis en évidence chez les diabétiques : l'hyperglycémie et le stress oxydant.
L'albumine est la protéine la plus abondante du plasma, et constitue ainsi une cible privilégiée de la glycoxydation. Les modifications structurales causées par ce processus peuvent engendrer des conséquences importantes sur ses propriétés fonctionnelles.
L'objectif de ma thèse a consisté en la caractérisation des modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine dans le cadre de la pathologie diabétique.

L'origine des complications métaboliques liées au diabète est souvent associée aux complications causées par les AGE. Afin de mieux comprendre l'impact de ces AGE, des modèles moléculaires d'albumine humaine commerciale ou d'origine bovine sont souvent utilisés. Ces modèles qui miment l'état pathologique du diabète sont malheureusement limités et ne sont pas forcément identiques à l'albumine glyquée circulante dans les organismes vivants. Afin de mieux caractériser ces AGE et les conséquences du diabète sur la structure et la fonction de l'albumine, notre équipe a donc décidé d'entreprendre la purification d'albumines à partir du plasma provenant de patients diabétiques ou non dans le cadre de ces travaux. Ainsi, la structure et la fonction de préparations d'albumine glyquée *in vitro* seront comparées à celles d'albumines purifiées de patients diabétiques. L'utilisation des albumines glyquées *in vivo* nous permettra d'avoir une meilleure vue sur les altérations de type glycoxydative chez les patients diabétiques, mais aussi leurs conséquences dans la physiopathologique diabétique.

Nous parviendrons à ces objectifs en étudiant premièrement l'impact de ces changements structuraux sur les pouvoirs antioxydants de l'albumine dans les conditions diabétiques. Des modèles *in vitro* mimant les conditions pathologiques (25 mM de glucose) et supra-pathologiques (100 mM de glucose et 10 mM de méthylglyoxal) seront ainsi comparés au modèle de glycation *in vivo* issue de la purification de plasma de diabétiques. Aussi, nous analyserons la réponse physiologique de ces différents modèles d'AGE sur deux modèles de lignées cellulaires humaines.

Nous avons également mentionné le rôle important de l'albumine dans la pharmacologie du médicament. On étudiera donc dans un deuxième temps l'effet de la glycoxydation sur les propriétés de liaison de l'albumine à la Warfarine® et au Kétoprofène®. En outre, les propriétés de liaison de l'albumine seront appréhendées en mesurant les constantes de liaison et la fraction libre des différents ligands étudiés en présence de différentes préparations d'albumines. Afin d'établir le rôle direct de la glycation dans ces propriétés pharmacologiques, nous étudierons la relation entre le degré de glycation et l'importance des modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine à travers l'affinité pour le Kétoprofène® et l'activité estérase.

Étant donné le rôle de certains métaux circulants dans le stress oxydant, nous avons choisi d'étendre l'étude des phénomènes de type glycoxydatif à l'observation de l'interaction des ions métalliques dans le processus de glycation de l'albumine. Le but de cette dernière étude est de clarifier le rôle des métaux comme le cuivre (Cu^{2+}) ou le zinc (Zn^{2+}) dans les processus de glycoxydation, d'agrégation et d'oxydation protéique, sur un modèle d'albumine glyquée. Cette étude a pour but de donner des éléments de compréhension sur l'impact des métaux dans les altérations structurales et fonctionnelles à l'origine du développement des maladies métaboliques, neurodégénératives et des complications chroniques liées au diabète.

Ainsi, les résultats obtenus au cours de ma thèse permettront, je l'espère, de mieux caractériser les modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine induites par la glycoxydation dans le cas du diabète et permettront de démontrer l'importance de l'albumine glyquée *in vivo* dans l'étude des AGE responsables des complications liées au diabète.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1

ÉTUDE COMPARATIVE DES PROPRIETES ANTIOXYDANTES DE L'ALBUMINE GLYQUEE *IN VITRO* ET *IN VIVO,* DANS LE CADRE DE LA PATHOLOGIE DIABETIQUE.

Introduction

Le corps humain est en constante exposition à des perturbations d'ordres oxydatifs ou métaboliques pouvant occasionner des altérations de la physiologie cellulaire. Ces perturbations peuvent être apportées par notre alimentation, notre environnement, mais aussi par des mécanismes pathologiques, comme la glycation et le stress oxydant. Pour faire face à ces perturbations, notre métabolisme possède de nombreux systèmes de défense, dont font partie les antioxydants.

Les molécules antioxydantes sont primordiales dans la lutte contre le stress oxydant causé par un surplus de radicaux libres et de ROS. Même si ces derniers sont des éléments indispensables dans les processus de nombreuses voies métaboliques, leurs excès peuvent être néfastes et peuvent entraîner l'altération de certains constituants biologiques, comme les protéines. Ce stress oxydant est souvent observé dans des pathologies comme le diabète ou les maladies associées.

Les antioxydants peuvent avoir des origines endogènes comme exogènes. En effet, ils peuvent être apportés par notre alimentation ou être produits par l'organisme, c'est le cas de l'albumine synthétisée par le foie [161]. L'albumine est une protéine plasmatique multifonctionnelle, parmi ses nombreuses et différentes fonctions, elle possède des propriétés antioxydantes. C'est l'une des molécules antioxydantes la plus abondante du plasma. Le sang est un compartiment en constante exposition à un stress oxydant, rendant son activité antioxydante primordiale.

Cependant, cette exposition rend l'albumine sensible à de nombreuses modifications structurales résultant de pathologies comme le diabète (hyperglycémie, stress oxydant) [119 , 215]

Comme nous l'avons abordé dans la partie bibliographique, la glycoxydation est une altération pathologique rencontrée dans le cadre du diabète. L'albumine subit ce phénomène de glycoxydation dû à la forte présence de sucres dans le sang. Les sucres vont se lier préférentiellement aux amines libres de l'albumine modifiant ainsi la structure de la protéine.

Ainsi nous avons voulu détailler l'impact de ce phénomène sur la structure et la fonction antioxydante de l'albumine dans le cadre de la pathologie diabétique.
Cependant, de nombreuses études scientifiques concernant l'impact de la glycoxydation sur l'albumine ont souvent été réalisées sur l'albumine humaine ou bovine, d'origine commerciale, et suivant un procédé de glycation *in vitro* [206, 216 , 217]. Très peu d'études utilisent des modèles *in vivo* de glycation de l'albumine issue de patients diabétiques.
Dans cette étude, nous avons donc souhaité dans un premier temps comparer l'impact de la glycation *in vitro* et *in vivo* sur la structure et la fonction antioxydante de la sérum albumine humaine. Par ailleurs, l'effet inflammatoire potentiel de l'albumine glyquée *in vivo* a rarement été mis en évidence [218 , 219]. Nous nous sommes donc intéressés dans un deuxième temps aux conséquences de l'interaction des produits avancés de glycation (AGE) issus des différents modèles de glycation avec le récepteur spécifique RAGE, sur un modèle adipocytaire humain.

L'intérêt de cette étude est de montrer l'importance de l'utilisation des modèles de glycation *in vivo* issus de patients diabétiques, pour décrire les phénomènes pathologiques associés au diabète.

Résultats

Article 1 : « New insights into deleterious impacts of in vivo glycation on albumin antioxidant activities ».

Jennifer Baraka-Vidot, Alexis Guerin-Dubourg, Fanny Dubois, Bertrand Payet, Emmanuel Bourdon, Philippe Rondeau. Biophys Acta - general subjects (2013) 1830, 3532-41

Biochimica et Biophysica Acta 1830 (2013) 3532–3541

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagen

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-kB –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 relied 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).

0304-4165/$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.01.019

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. Material s

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-methylamidinopropane) or AAPH (440914), fluorescein, p-nitrophenyl-phosphate (PNPP), dichlorofluorescin 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 (% $HbA_{1C} = 11.0 \pm 1.9$) and another pool was from fourteen non-diabetic subject (% $HbA_{1C} = 5.5 \pm 0.4$) 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 diagnostic 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 glycophore [14,22] and tryptophan fluorescence [23]. The fluorescence spectra were carried out on Horiba Scientific Fluoromax-4 spectrometer. The formation of glycophore was monitored at 355 nm excitation wavelength and in 360–600 nm emission range. The results were expressed as % increase of glycophore level and calculated as follow:

$$\%\text{Glycophore increase} = \frac{\delta F_1 - F_0}{\delta F_0} \times 100$$

where F_0 is the maximum fluorescence of HSA-ND_{G0} and F_1 is the max 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 1.10^8 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 (HT_{50} 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 μl) in six replicates and fluorescein solution (80 nM, 150 μl). Trolox solutions at different concentration (6–50 μM) 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 μl) 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:

$$\text{ORACvalue} = \frac{(\text{AUCsample} - \text{AUCblank})}{(\text{AUCTrolox}_{50\mu\text{M}} - \text{AUCblank})} \cdot ([\text{Trolox}]/[\text{Sample}]):$$

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% CO_2 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 μl DMEM containing 1% FBS and treated with modified albumin samples (20 μM or 80 μM) 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 μM or 80 μM) 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 H_2O_2 (500 μM) or/and modified albumin samples (20 μM or 80 μM)), 20 μl of the MTT dye (5 mg/ml) was added into each well followed by 4 h of incubation. After discarding the media, 200 μl 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 μM of HSA samples (control cells were untreated). After 24 h of treatment, cells were fixed in p-formaldhyde 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 μM dichlorofluorescin 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 μM of DCF-DA at 37 °C for 1 h following by a stimulation with 80 μM of HSA samples ($HSA\text{-}ND_{G0}$ and $HSA\text{-}ND_{MGO}$) for 20 min.

2.12. NFκB and AP-1 activation

RAW-Blue™ cells (invivogen, France) have been stably transfected RAW 264.7 macrophages with a construct in which NF-kB and AP1 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% CO_2 incubator. RAW-Blue™ cells previously platted in 96-well plate (100,000 cells/well) were exposed to normal culture medium (FBS 1%) or treated with LPS (1 μg/ml) or/and modified albumin samples (20 μM or 80 μM) at 37 °C in a 5% CO_2 incubator for 24 h. After incubation, $1 \cdot 10^{-3}$ M of p-nitrophenyl-phosphate (PNPP) (dissolved in 0.1 M glycine buffer containing 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $ZnCl_2$, pH 10.4) was added to 40 μl of each supernatant at 37 °C for 120 min.

PNPP + H_2O 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 μg of RNA was reversed transcripted 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′-CCAGTGGATTTGAGGAGAGG-5′

2.14. Flow cytometry analysis

Cells were cultured in 6-wells plate at a density of $3 \cdot 10^5$ cells/well with 20 μM 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 glycated albumin models and use suprapathological 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 glycated 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 glycated 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 glycophore 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 increased in glycophore 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 attested the increase of AGE level for in vitro and in vivo glycated 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 increased 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 glycated 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 glycated 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 (HT_{50}) for unmodified HSA (vs. PBS control), which attests of the antioxidant capacity exerted by native albumin in this test. This protected action of native HSA is partially (−64%, p b 0.05 for HSA-ND_{G100}) or totally (−100%, p b 0.001 for HSA-ND_{MGO}) lost when the protein was in vitro glycoxidized. A marked and significant decrease (−87%, p b 0.001) in albumin antiradical 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 glycoxidation modifications (Fig. 2b). Enhanced ORAC values are about 50% for HSA-ND_{MGO} (+49.7%, p b 0.001) and around 15% for diabetic HSA (+15.6%, p b 0.001) when compared with native HSA. Secondly, actions of our different glycated 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)	Glycophore fluorescence increase (% control)
HSA-ND_{G0}	100.0±7.3	13.3±0.98	1.11±012	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-NDG100	224.8±13.9	10.4±0.20□□	12.4±1.88□□□	0.286±0.011□□□	
HSA-NDMGO	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 glycophore 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 b 0.001, □□ p b 0.01, □ p b
0.05.

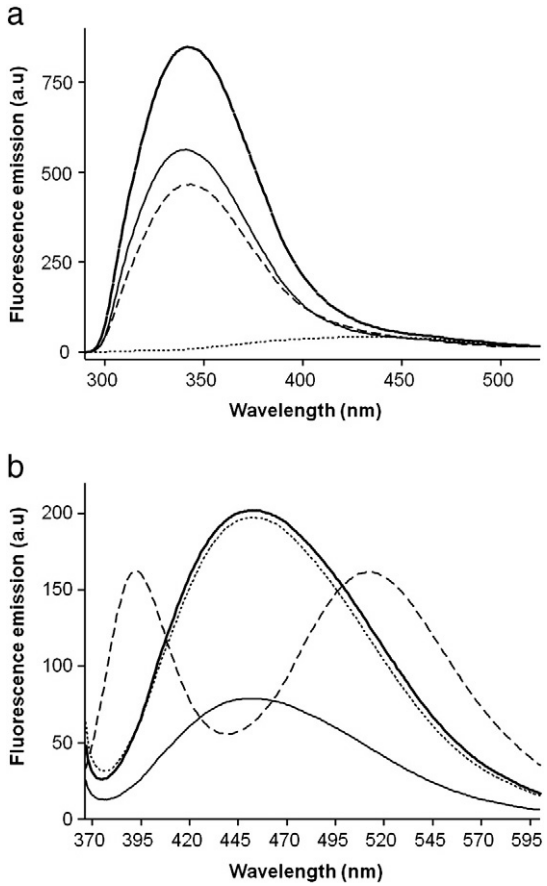


Fig. 1. a) Fluorescence spectra of tryptophan (270 nm excitation wavelength); b) Glycophore emission fluorescence spectra (370 nm excitation wavelength) for HSA-ND_{G0} (——), HSA-ND_{G25} (····), HSA-ND_{MGO} (— —) and HSA-D (—·—). Fluorescence spectra of all samples are shown after data normalization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

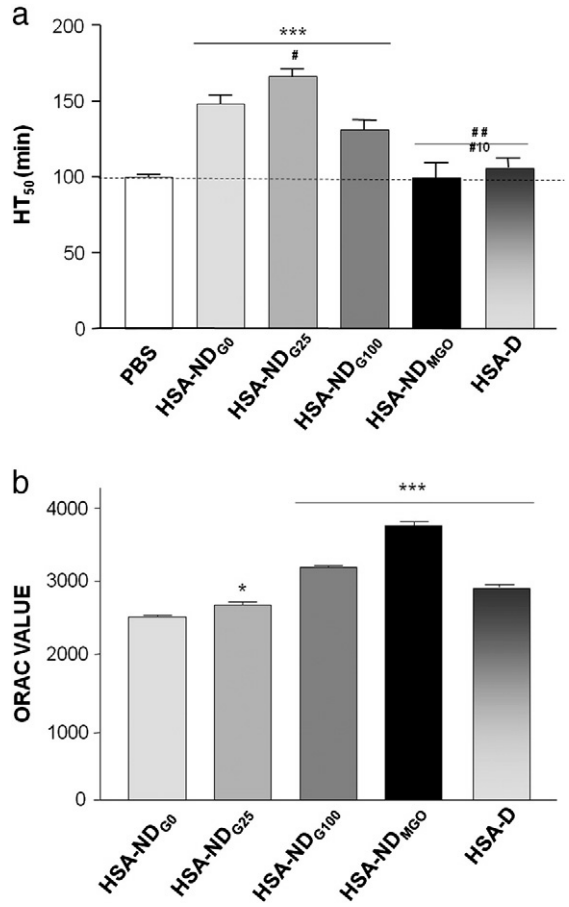


Fig. 2. Differential effect of glycated albumin in two in vitro free radical-scavenging activity tests. a) Effect of in vitro or in vivo glycoxidation on antiradical properties of albumin was assessed by the free radical-mediated blood hemolysis test. Histograms represent half-time hemolysis (HT_{50} in min) expressed as means±sd (n=3). b) Antioxidant properties of glycoxidized albumin were assessed using the ORAC test. Histograms represent ORAC values expressed as means±sd (n=6).

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 H_2O_2 (250 μM or 500 μM) in both cell lines. If this beneficial role is partially lost upon in vitro glycoxidation, 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 glycoxidized 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-NDG0	HSA-NDG25	HSA-NDMGO	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.

To assess the effect of glycated albumin in intracellular free radical generation, we measured dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) fluorescence in adipocyte cells treated with 20 μM native or glycated 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 glycoxidized albumin for 24 h significantly increased intracellular ROS levels, this was particularly observed in adipocytes treated with HSA-ND_{G100} (+7.2%, $p<0.05$ vs. HSA-ND_{G0}) and with HSA-D (+8.1%, $p<0.05$ 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 glycated HSA and HSA-D (+18.2%, $p<0.05$ vs. HSA-ND_{G0}) (Fig. 5b).

Because glycated HSA samples stimulate intracellular ROS production, NF-κB 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-κB and AP-1. As shown in Fig. 6, cell incubation in the presence of 20 μM or 80 μM glycated albumins or LPS (1 μg/ml) significantly induced NF-κB activation. The most significant enhancements in NF-κB activation were measured in cells treated with albumin glycated with 100 mM of glucose and also with albumin purified from diabetics.

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

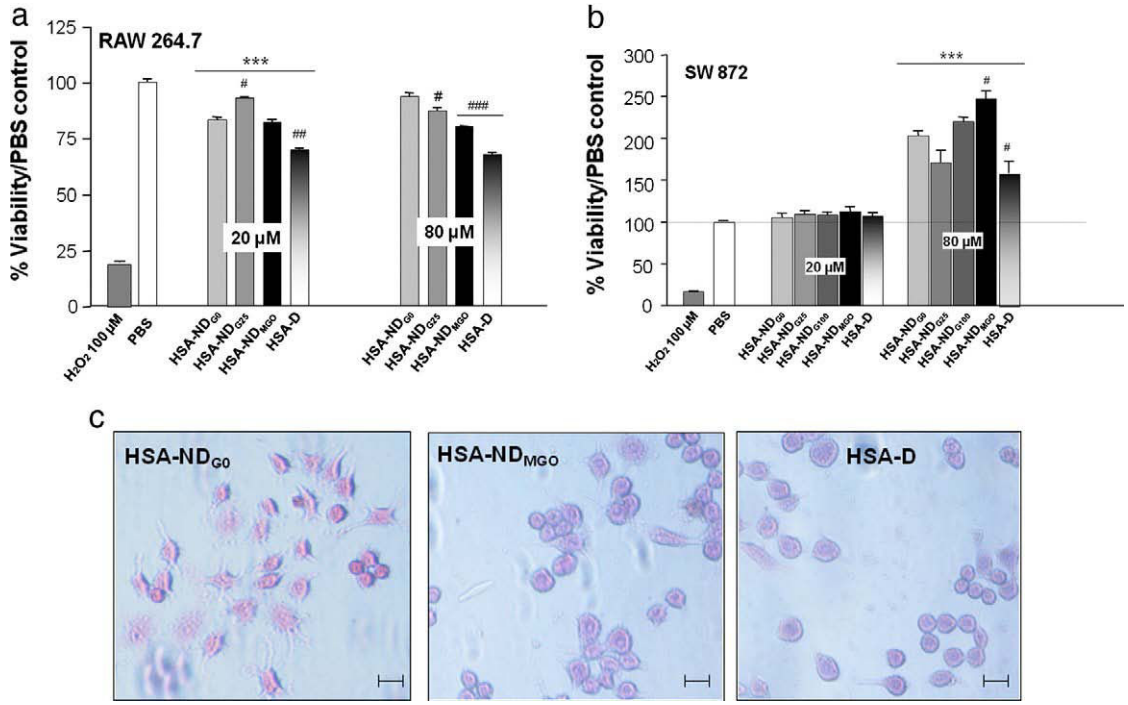


Fig. 3. Albumin from diabetics impaired cellular viability and morphology. The relative viability (%) of cells (vs. control PBS) incubated 24 h with 20 µM or 80 µM of HSA-ND, HSA-AGEs or HSA-D was determined by MTT assay. a) in RAW 264.7 macrophage cells; b) in SW 872 adipocyte cells; c) H&E staining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

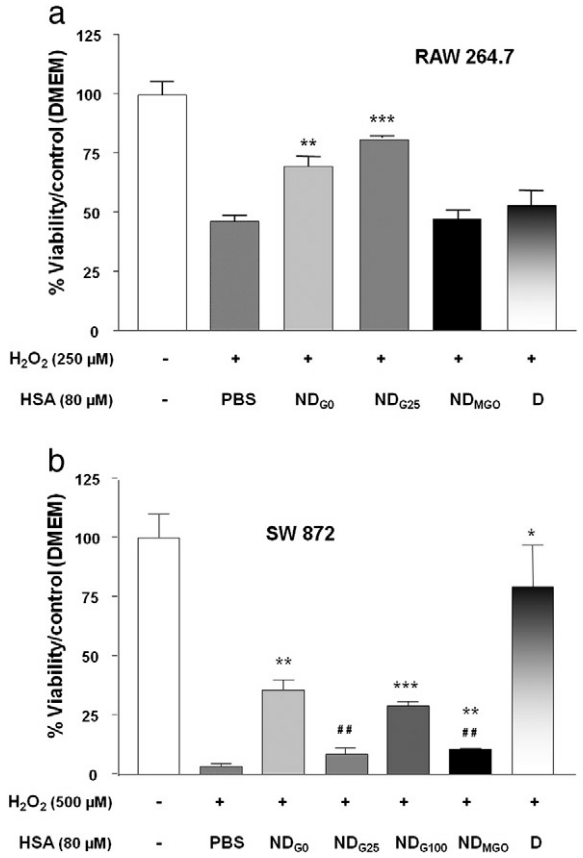


Fig. 4. Impaired protective action of albumin after glycation. The relative viability (%) of cells (vs. control DMEM wo H_2O_2) incubated 24 h with 80 µM of HSA samples in presence of H_2O_2 (250 µM or 500 µM) was determined by MTT assay. a) in RAW 264.7 cells; b) in SW 872 cells.

RAW-Blue™ cells incubated with 20 µM of native albumin (-24%, pb0.05 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 signi ficant 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-ND$_{G0}$, p b 0.05). To our knowledge, RAGE expression at the surface of liposarcoma SW872 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-ND$_{G25}$, 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-ND$_{G0}$, p b 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

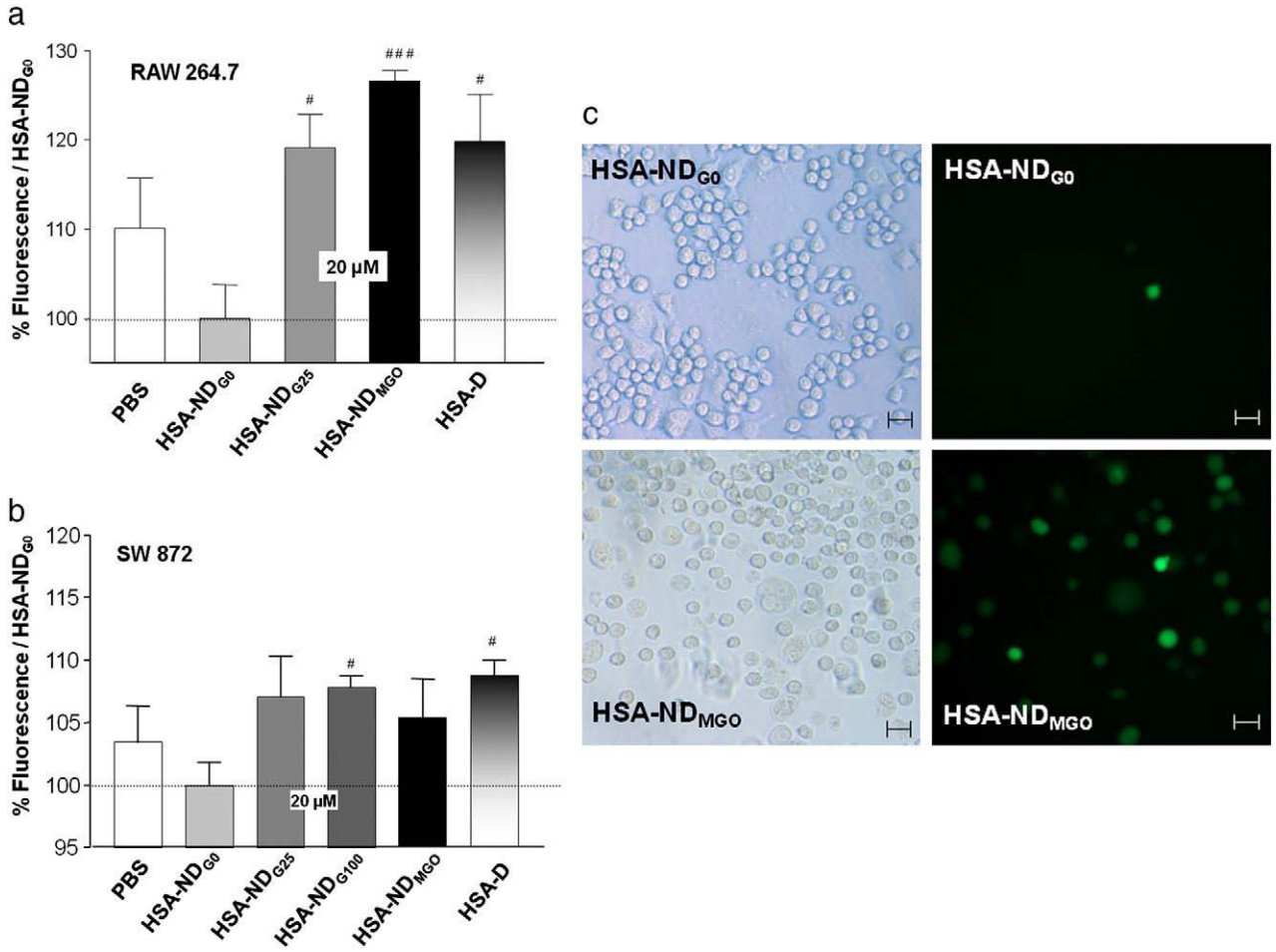


Fig. 5. Albumin from diabetics enhanced intracellular oxidative stress. Intracellular ROS production in macrophages and adipocyte cells was determined by DCF fluorescence assay. The relative increase (%) of DCF fluorescence (vs. HSA-ND$_{G0}$) was determined for cells incubated 24 h with 20 µM of HSA-ND, 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$_{MG0}$ (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 glycoxidation. 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.

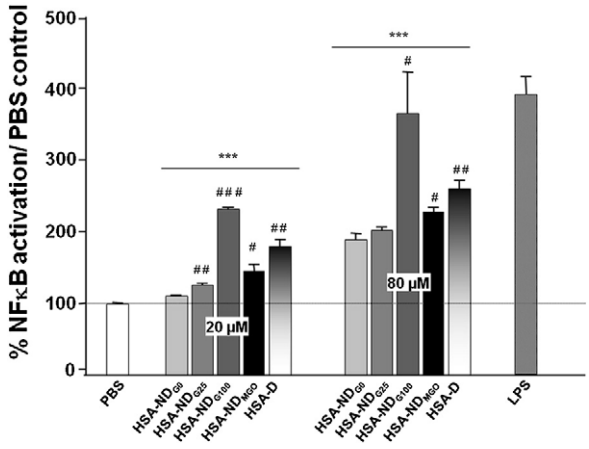


Fig. 6. Albumin from diabetics enhanced NFκB activation. NFκB activation was determined in RAW-Blue cells after 24 h of incubation with 20 µM or 80 µM of HSA-ND, HSA-AGEs or HSA-D. Data are presented as % control (PBS) and are expressed as mean ± sd (n = 3).

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, suprapathological 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 cystein (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

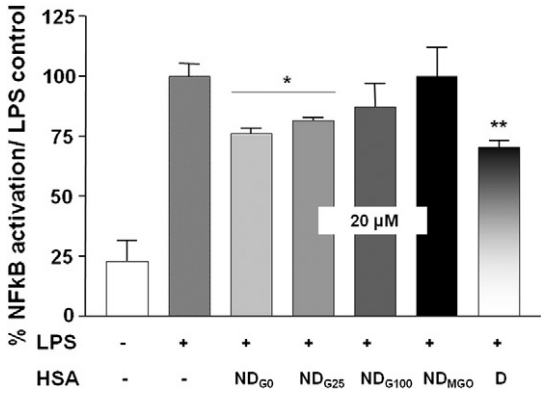


Fig. 7. Impaired anti-inflammatory activity of albumin after glycation. NFκB activation was measured in RAW-Blue cells after a 24 h incubation with LPS (1 μg/ml) plus 20 μM of HSA-ND, HSA-AGEs or HSA-D. Data is presented as % control (with only LPS) and are expressed as mean ± sd (n = 3).

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 paradoxal 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 H_2O_2 deleterious effect. This enhanced metabolic activity observed for some glycated models, should not be considered as a protective action of glycated albumin. Indeed, the MTT assay also evidenced a lost of protective effect of albumin upon in vitro glycation. The oxidative stress induced by some glycated albumin samples 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 glycated 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

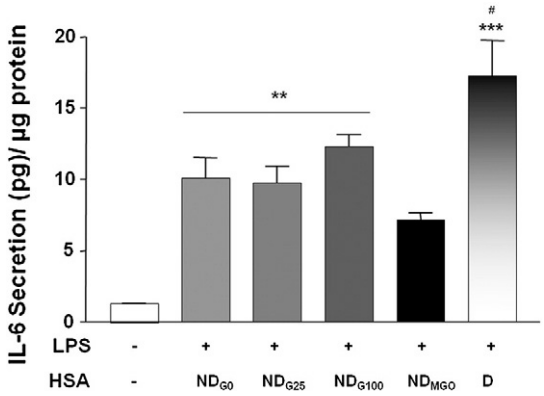


Fig. 8. Albumin from diabetics enhanced IL6 secretion by adipocytes. IL6 secretion was measured in SW872 cells after 24 h incubation with LPS (1 μg/ml) plus 20 μM of HSA-ND, HSA-AGEs or HSA-D. Data is presented as % control (with only LPS) and are expressed as mean ± sd (n = 3).

induced by LPS and this protective role seems to be affected upon glycation. On one hand, supraphysiological glycation models and diabetic albumin could induced 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 paradoxal 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 glycated albumin on cellular physiology were performed with in vitro AGE models, which do not reflect the physiopathology of a hyperglycemic situation. In order to obtain significant cellular responses, glycated albumin 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, glycated BSA appeared to enhance proteolytic activities in THP-1 cells, whereas glycated HSA induced an inhibition of these proteosomal 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 glycated HSA 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 glycated form 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.

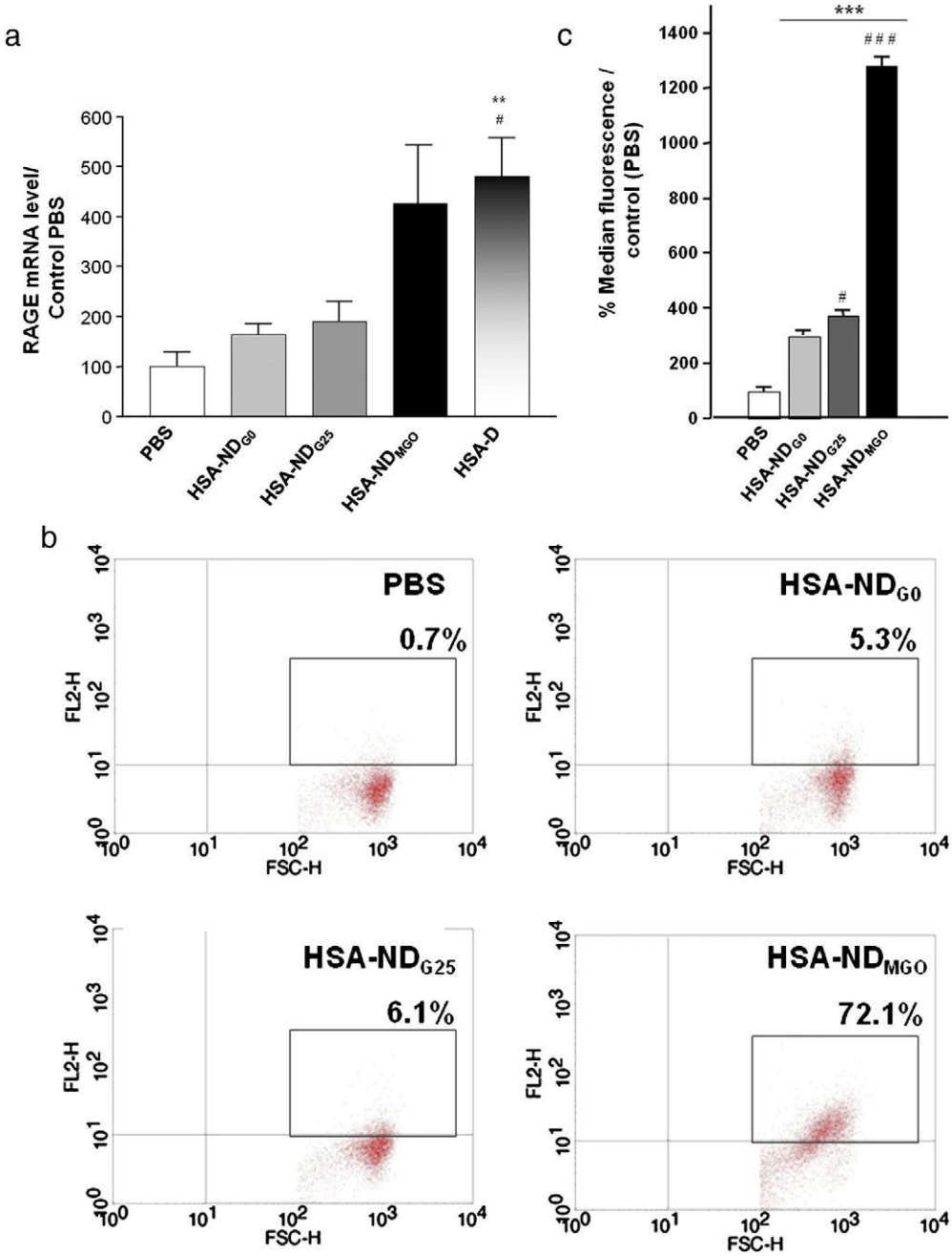


Fig. 9. RAGE signaling inflammation pathway of glycoxidized HSA. a) RAGE mRNA expression levels determined by real time q-PCR; b) RAGE cellular surface expression induced by PBS, HSA-ND$_{G0}$, HSA-ND$_{G25}$ and HSA-ND$_{MGO}$ in SW872 cells. SW 872 cells are identified as events labeled with RAGE in 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 ± 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. Cacciabaudo, 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 H_2O_2-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. Carballal, 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, I.-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-Î± 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.

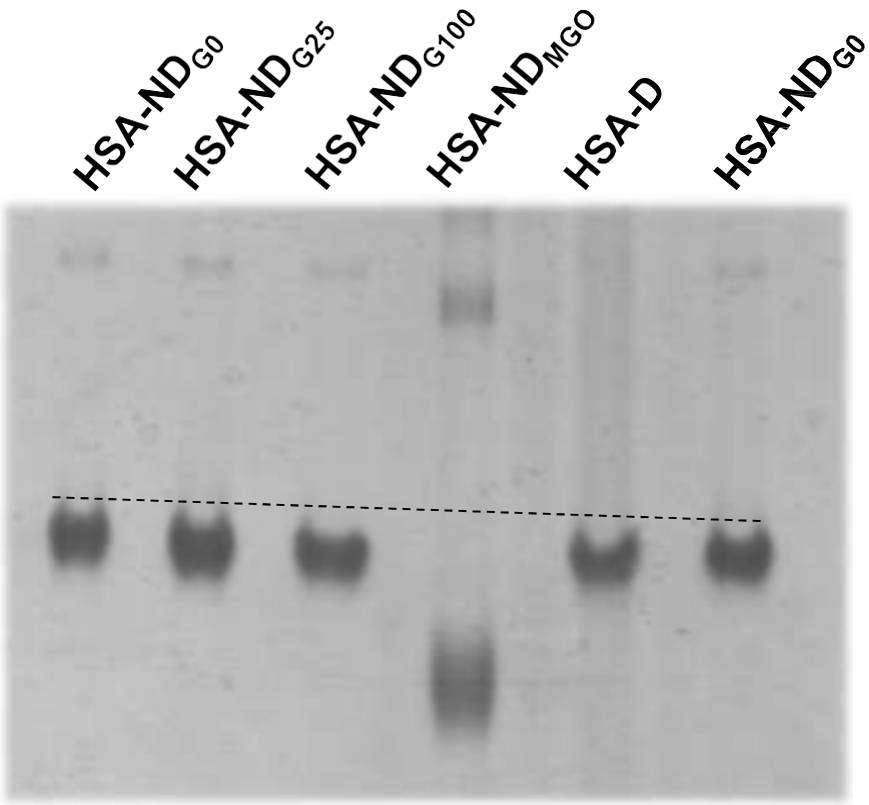
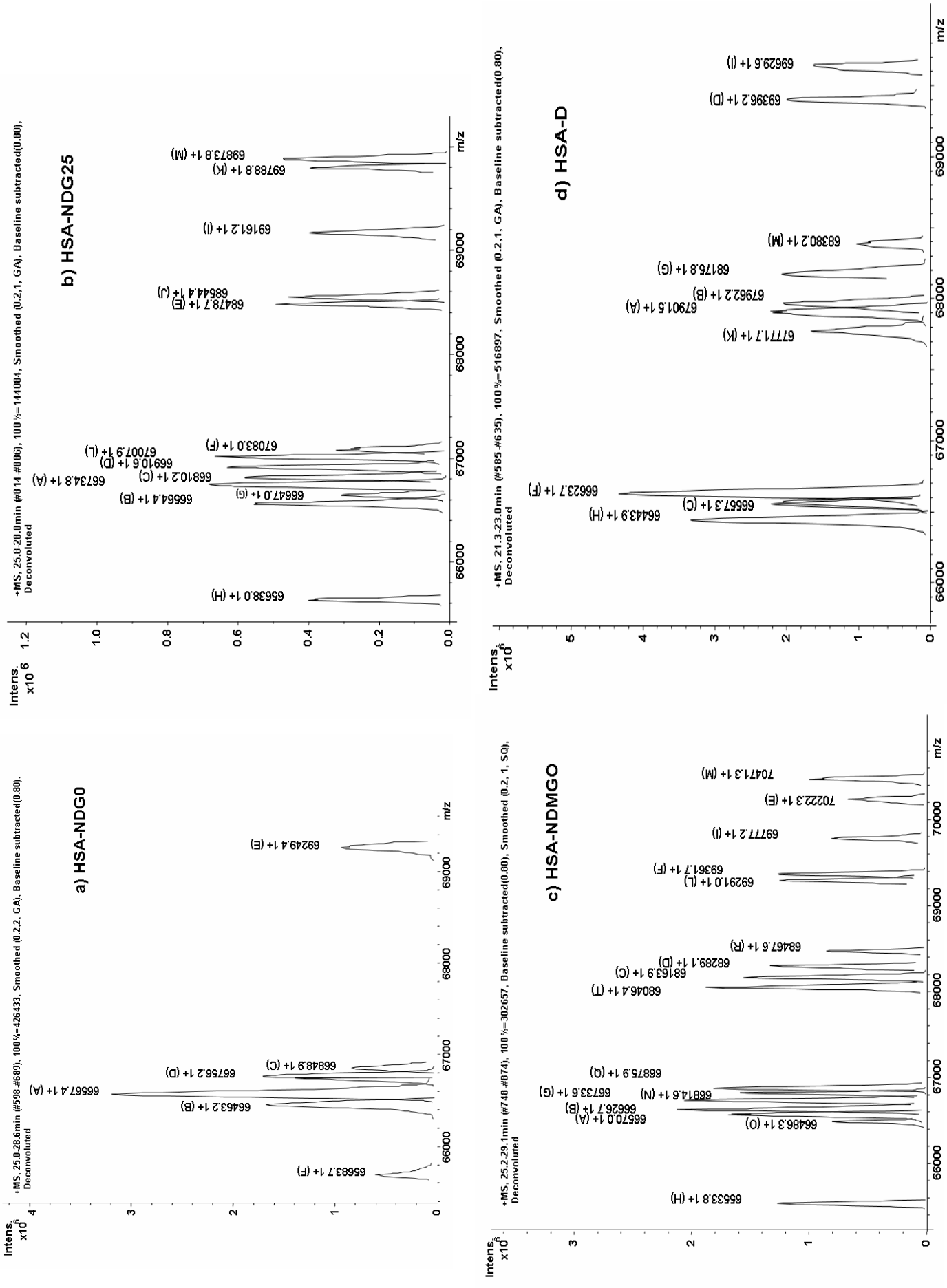


Figure S1: Characterization of purified (HSA-ND and HSA-D) modified albumin by native PAGE electrophoresis (12%)

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.



Discussion

Ces travaux sont consacrés à l'étude comparative de l'impact de la glycation *in vitro* et *in vivo* de l'albumine humaine sur ses propriétés structurales et antioxydantes.

En ce qui concerne les propriétés structurales de ces différents modèles de glycation, des modifications bien distinctes sont observées selon l'origine de l'albumine. Par exemple, des différences significatives pour le degré de glycation et pour le statut redox sont constatées entre le modèle *in vitro* (25 mM de glucose) mimant les conditions du diabète et celui *in vivo*.

Par ailleurs, on constate que les altérations de l'activité antioxydante diffèrent selon les modèles d'albumines glyquées et selon la méthode de mesure utilisée. La technique de mesure par hémolyse des globules rouges met en évidence une perte des propriétés antioxydantes amplifiées avec l'accroissement du degré de glycation tandis que la technique ORAC montre un résultat opposé. En effet, les pouvoirs anti-radicalaires de l'albumine glyquée observés par la méthode ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) suggèrent que la glycation induit une augmentation de l'activité antioxydante des albumines glyquées *in vitro* et *in vivo*.

Ces résultats paradoxaux montrent bien que les capacités antioxydantes de l'albumine ne dépendent pas seulement de l'état d'oxydation de la cystéine en position 34 (Cyst-34), mais aussi de la conformation moléculaire de l'albumine. En effet, l'altération de la capacité antioxydante de l'albumine glyquée en présence de MGO a déjà été corrélée dans des études précédentes au processus d'agrégation, à travers le test d'hémolyse [60, 207 , 220]. Dans cette présente étude, l'altération des capacités antioxydantes pourrait être en partie expliquée par l'état d'agrégation induite par le processus de glycation des protéines. Ces résultats paradoxaux nous ont poussés à approfondir notre étude en utilisant des modèles cellulaires macrophagique et adipocytaire.

Par ailleurs, l'étude de l'impact de nos modèles de glycation sur la physiologie cellulaire d'adipocytes et de macrophages indique l'établissement d'un stress oxydant, simultanément à une augmentation de l'activité métabolique de ces cellules. Ces résultats laissent supposer une relation possible entre ces deux phénomènes pouvant être induits par les AGE.

Deux hypothèses peuvent être avancées :
1) On peut supposer que le stress induit par les AGE stimule le métabolisme cellulaire ou 2) que ces deux phénomènes sont stimulés de manière indépendante par les AGE et agissent parallèlement. Une étude plus approfondie pourrait être envisagée afin de comprendre les relations possibles entre ces deux phénomènes.

Plusieurs études montrent aussi que les protéines glyquées peuvent induire une réponse inflammatoire. Dans cette étude, les résultats montrant la surexpression des récepteurs RAGE sur les cellules SW-872 laissent supposer leur implication dans l'activation de l'expression de la cytokine inflammatoire IL-6 à travers la voie de signalisation des ROS et de l'activation de NF-| B.
On en conclut que l'altération des activités antioxydantes et anti-inflammatoires de l'albumine glyquée *in vivo* et *in vitro* diffèrent. Pour la première fois, nous pouvons mettre en évidence les effets néfastes plus marqués pour la protéine modifiée par une glycation *in vivo* que pour celle modifiée *in vitro* dans les conditions mimant la pathologique diabétique.
Même si l'albumine glyquée semble être un biomarqueur approprié du stress oxydant dans la pathologie diabétique, il apparaît important d'étudier également l'impact de la glycation *in vivo* sur les autres propriétés de l'albumine. Cette étude souligne aussi l'importance de l'utilisation d'un modèle de glycation *in vivo* pour l'albumine, afin de mieux comprendre et décrire les mécanismes pathologiques liés au diabète. Cette meilleure compréhension passe par une étude détaillée de l'albumine glyquée *in vivo* à travers une étude clinique regroupant un large panel de plasmas de patients diabétiques, mais nécessitant de trouver alors une méthode de purification adaptée de l'albumine.

Résultats complémentaires : « Stratégie de purification de l'albumine »

Introduction

L'étude de l'albumine glyquée *in vivo* s'avère très intéressante au vu des résultats obtenus dans l'article précédent sur les albumines purifiées de patients diabétiques. Ces albumines glyquées ont été purifiées à partir de plasma par chromatographie d'affinité utilisant du Bleu de Cibacron 3G couplé à l'agarose (Amersham), ceci représentant la technique de purification couramment utilisée afin de purifier l'albumine. Cependant cette technique est longue,

laborieuse et nécessite une grande quantité de plasmas afin d'obtenir une concentration suffisante en albumine, de plus elle semble peu adaptée dans le cadre d'une étude clinique portant sur un large panel de plasmas.

Nous avons donc souhaité prospecter d'autres techniques de purification et les comparer afin de déterminer celle qui serait la plus adaptée, dans le cadre d'une étude clinique. Cette étude comparative a pour objectif d'évaluer leurs efficacités en termes de rendement, rapidité et qualité (conservation de l'intégrité structurale de l'albumine).

Matériels et méthodes

Les trois méthodes de purification présentées ci-dessous ont été appliquées à un mélange de plasmas de patients diabétiques ou non obtenus auprès du CHU de Bellepierre.

Chromatographie d'affinité sur du bleu de Cibacron

Pour cette technique de chromatographie d'affinité sur du bleu de Cibacron, une étape de dialyse du plasma (25 mL) est tout d'abord réalisée contre le tampon d'équilibre Tris-HCl 50 mM. Le plasma est ensuite déposé sur une colonne de gel de bleu de Cibacron (volume 50 mL) qui possède une forte affinité pour l'albumine. Après différentes étapes de lavage (4 à 5 volumes) avec le tampon d'élution (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) qui permet d'éliminer tous les composés non liés au gel, le tampon Tris-HCl 50mM, NaCl 4,5 M est ensuite utilisé comme tampon de décrochage. L'ajout de NaCl dans le tampon a pour rôle de décrocher l'albumine retenue par la colonne (débit 0,1 mL/min)

Batch

Cette deuxième technique est réalisée sur le même principe de purification sur gel bleu de Cibacron, mais dans des volumes plus petits. Elle est appelée technique par « Batch » (volume de 1 mL). Un volume de 0,5 mL de plasma est déposé sur le gel déjà équilibré et incubé pendant une heure à faible agitation à 4 °C. Après une première centrifugation (5 min, 3000 rpm), le surnageant est collecté. Par la suite, le gel est lavé 6 fois avec 1 mL de tampon d'élution afin d'éliminer tous les autres composés, dans les mêmes conditions. L'albumine liée au bleu de Cibacron est décrochée du gel à l'aide de 5 ou 6 volumes de tampon de décrochage (Tris-HCl 50 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,4).

Pour ces deux premières méthodes, un dosage protéique est effectué par les méthodes BCA et BCG sur les différentes fractions obtenues, afin de regrouper les échantillons les plus concentrés en albumine. Une dialyse contre du PBS 1X est ensuite effectuée afin d'obtenir la solution d'albumine purifiée. Une étape de concentration est également réalisée si nécessaire à l'aide de filtre Amicon® (PMNL ou poids moléculaire nominal limite de 10 KDa)

Précipitation à l'ammonium sulfate

Cette troisième technique de purification d'albumine repose sur la solubilité de l'albumine et elle est réalisée et mise au point sur des petits volumes de plasma (0,5 ml). À l'aide d'une solution saturée en ammonium sulfate (767 g/L, pH 7,4 ajusté avec du NH_4OH), les protéines du plasma vont être précipitées sélectivement en fonction du pourcentage en sel utilisé. La solution d'ammonium sulfate est ajoutée au plasma jusqu'à obtenir une concentration finale de 54 % en sel, afin de précipiter les globulines. Après centrifugation (10 min, 5000 g), le surnageant est récupéré et mélangé à une solution d'ammonium sulfate jusqu'à obtenir la concentration finale de 70 % en sel. Cette seconde étape permet de précipiter l'albumine, qui sera ensuite séparée par centrifugation (30 min, 10 000 g). L'albumine récupérée dans le culot est solubilisée dans du PBS 1X et lavée plusieurs fois à l'aide d'un filtre Amicon® (PMNL ou poids moléculaire nominal limite de 10 KDa).

Dosage protéique

Afin de pouvoir calculer les rendements pour chaque technique de purification, mais aussi de connaître la concentration en albumine récupérée après chaque méthode de purification, on a procédé à deux dosages protéiques.

BCA

La quantité en protéines des différents échantillons d'albumine est déterminée par dosage colorimétrique en utilisant le réactif BCA (acide bicinchoninique ou acide 2,2'-biquinoline-4, 4'-dicarboxylique) en présence de sulfate de cuivre ($CuSO_4$). Les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu (II) en Cu (I) en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique est un réactif ayant une grande spécificité pour le Cu (I), formant alors un complexe pourpre possédant une absorption optique maximale à 562nm [221].

BCG

La concentration en albumine des différents échantillons purifiés est déterminée par un dosage colorimétrique en utilisant du vert de bromocrésol (BCG) utilisé en médecine clinique, à l'aide d'un étalon de BSA commerciale. Un complexe albumine-BCG se forme à pH 4,3 et est mesuré par absorbance à 578 nm.

Caractérisation structurale

Afin d'évaluer l'intégrité des albumines purifiées, on a effectué des mesures du nombre de groupements thiols libres par albumine selon la méthode d'Ellman [222], ainsi que le dosage des groupements amines libres à l'aide du réactif 2, 4, 6 trinitrobenzènesulfonique (TNBS) [223], détaillé dans les articles précédents. La pureté des fractions de lavage et d'élution a été évaluée et comparée au plasma sur un gel de polyacrylamide à 12 % en condition native.

Fluorescence du tryptophane

Une mesure de la fluorescence a été réalisée sur la sérum albumine isolée du plasma afin de nous apporter des informations sur la conformation tridimensionnelle de la protéine. Une mesure de la fluorescence du tryptophane à la longueur d'onde d'excitation de 280 nm et de 340 nm pour l'émission a donc été faite [224].

Résultats

Les résultats obtenus sur gel natif montrent une bonne purification de l'albumine pour les trois méthodes **(Figure 27a)**. De plus, l'intégrité structurale est bien conservée avec des valeurs de thiols et d'amines par albumine correspondantes aux valeurs attendues et comparables à l'étude précédente [225] **(Figure 27b et 27d)**. L'émission de fluorescence du tryptophane ne met en évidence aucun changement significatif de la structure tridimensionnelle de l'albumine dans l'environnement du tryptophane **(Figure 27c)**.

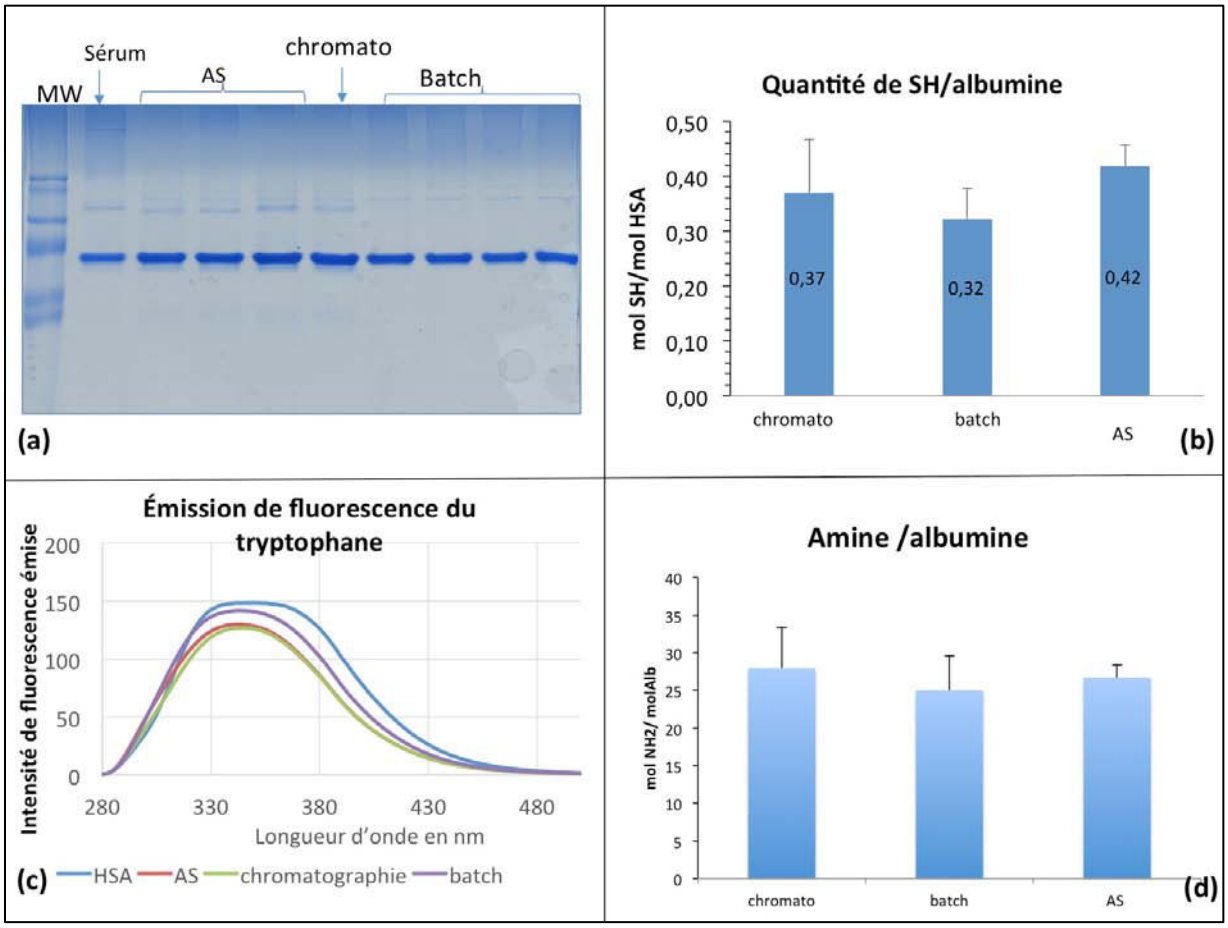


Figure 27. Caractérisation structurale de l'albumine purifiée par différentes méthodes.

(a) Gel natif à 12 % d'acrylamide des différentes fractions de purification (b) Dosage thiols contenus dans les différentes fractions d'albumine (c) Spectre d'émission de fluorescence du tryptophane (d) Dosage des amines libres sur l'albumine des différentes fractions purifiées. (Chromato = purification par chromatographie d'affinité ; « batch » = purification par technique de batch et AS = purification par précipitation à l'ammonium sulfate)

Même si l'intégrité structurale des albumines purifiées par ces différents protocoles est conservée, ces trois méthodes sont distinctes en terme de temps, de volume de plasma utilisé et en terme de coût. En effet, l'ammonium sulfate a un coût peu élevé par rapport à celui du gel de bleu de Cibacron **(Tableau II)**.

Tableau II. Tableau récapitulatif des critères de rendement, volume et temps de chaque purification.

	Chromatographie d'affinité	Batch	AS
Volume de plasma De départ	25 ml	0,5 ml	0,5 ml
Rendements	68,1 %	48,6 % ± 6,4	46,4 % ± 7,5
Temps de réalisation	4 jrs	3 jrs	4 h
Avantages	Précis Grand volume	Petit volume	Petit volume et rapide
Inconvénients	Temps trop long Couteux	Couteux	faible coût

Le rendement de chaque méthode a été obtenu par le rapport entre la concentration en albumine de chaque purification et la concentration en albumine plasmatique initiale.

Discussion

Dans le cadre d'une étude clinique, nous disposons d'une faible quantité de sang provenant du patient, nous devons donc travailler sur des petits volumes de plasma. La chromatographie sur colonne n'est donc pas appropriée. Les techniques par Batch et par précipitation en ammonium sulfate sont donc les deux techniques les plus adaptées pour l'étude de l'albumine glyquée *in vivo*. Concernant la répercussion de la purification sur la structure de l'albumine, on observe très peu de différences pour la teneur en thiols et en amines libres ainsi qu'au niveau de la structure tridimensionnelle de la protéine. La technique d'ammonium sulfate semble, de plus, être la plus rentable en raison de sa rapidité et de son faible coût par rapport aux autres techniques.

En conclusion, cette méthode de purification sera celle qu'on pourrait envisager dans les études cliniques visant à mieux décrire l'albumine glyquée *in vivo* de patients diabétiques.

Conclusion et perspectives

Les différences observées dans cette étude entre le modèle *in vivo* et *in vitro* montrent clairement que le modèle de glycation *in vivo* purifié à partir de plasma de patients diabétiques semble être le modèle le plus approprié pour les recherches scientifiques sur les complications du diabète. En effet ce modèle *in vivo* semble être le modèle qui se rapproche le plus des conditions pathologiques du diabète. De même, ce modèle pourrait être utilisé dans des études futures afin de mieux comprendre les modifications fonctionnelles de l'albumine, comme l'étude des fonctions pharmacologiques développée dans la prochaine partie. La technique de purification par précipitation à l'ammonium sulfate, vue précédemment, semble être une bonne méthode de purification rapide et efficace applicable dans le cadre d'études cliniques à grande échelle, sur les propriétés de l'albumine glyquée dans la pathologie diabétique et les maladies associées.

CHAPITRE 2

ETUDE DES PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DE L'ALBUMINE GLYQUEE *IN VIVO* ET *IN VITRO*

Introduction

Dans la première partie de notre travail nous nous sommes focalisés sur les propriétés structurales et antioxydantes de l'albumine dans le contexte du diabète, à travers un modèle de glycation *in vivo*, ainsi que différents modèles de glycation *in vitro*. Nous avons pu montrer une altération de ces propriétés antioxydantes liée aux modifications biochimiques, structurales et conformationnelles de la protéine. Nous avons également pu mettre en évidence également des similarités entre les différents modèles concernant ces propriétés.

Mais ces propriétés antioxydantes ne sont pas les seules propriétés de l'albumine. En effet, comme développée dans ma partie bibliographique, l'albumine possède également des fonctions de transporteur de médicaments et des activités enzymatiques qui témoignent de l'importance de l'albumine en pharmacologie.

Dans le cadre de la pathologie diabétique, les patients sont amenés à suivre des traitements liés à cette maladie mais également aux complications qui lui sont associées. En étant le principal transporteur de médicaments, l'albumine joue donc un rôle très important dans ces traitements thérapeutiques. Cependant l'albumine est la cible de la glycoxydation, d'où la nécessité d'étudier l'efficacité thérapeutique de certains médicaments dans ces conditions pathologiques.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux propriétés de transport et d'affinité de l'albumine dans un contexte diabétique à travers les différents modèles *in vivo* et in *vitro* de glycation utilisés lors de l'étude précédente. Cette étude de l'affinité de l'albumine glyquée a été réalisée pour deux médicaments : la Warfarine®, un anticoagulant ainsi que le Kétoprofène®, un anti-inflammatoire, tous les deux pouvant être utilisés dans le cadre des soins apportés aux patients diabétiques.

Résultats

<u>Article 2</u> : « Impaired drug-binding capacities of in vitro and in vivo glycated albumin ».

Baraka-Vidot, J., Guerin-Dubourg, A., Bourdon, E. and Rondeau, P. Biochimie. (2012). 94:1960-7

Biochimie 94 (2012) 1960e1967

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

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 CYROI, 15, avenue René Cassin e 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 glycoxidation. 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.: þ33 262 262 93 86 48; fax: þ33 262 262 93 82 37.
E-mail address: rophil@univ-reunion.fr (P. Rondeau).

0300-9084/$ e see front matter © 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.biochi.2012.05.017

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 diabetes.

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-bindings 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 suprapathological 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 $3,3^0,5,5^0$-tetramethyl-benzidine liquid substrate (TMB) system for ELISA, warfarin and ketoprofen were all purchased from Sigma.

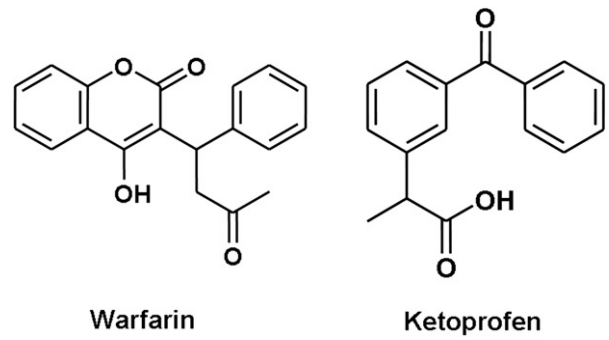


Fig. 1. Structures of warfarin and ketoprofen.

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} ¼ 11.0 ± 1.9) and 14 non-diabetic (% HbA_{1C} ¼ 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**
HbA1c (%)	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 5,5^0-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 acetonitrileeTriseHCl (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 x 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]:

$$\log \frac{\delta F_0 - F_C Þ}{F_C} ¼ \log K_A Þ n \log ½ Cl$$

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 ± 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 a-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 suprapathological 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 ± 0.12	0.609 ± 0.013	13.36 ± 0.98	100.00 ± 7.35
HSA-ND$_{G25}$	5.07 ± 0.35***	0.333 ± 0.067**	12.44 ± 0.83	111.42 ± 10.89
HSA-ND$_{G100}$	12.43 ± 1.88***	0.286 ± 0.011***	10.42 ± 0.20**	224.84 ± 13.93***
HSA-ND$_{MGO}$	9.25 ± 1.46***	0.250 ± 0.026***	5.10 ± 0.54***	455.67 ± 69.68***
Purified HSA-D				
HSA-D$_{G0}$	2.13 ± 0.58*	0.307 ± 0.012***	10.38 ± 0.80*	95.66 ± 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 ± 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-NDG0, 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 glycated 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 glycated 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, glycated 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 glycated 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 ¼ 6.98 mmol/L) than for warfarin (K_d ¼ 9.52 mmol/L). These results also showed significant variations between native HSA and in vitro or in vivo glycated 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 glycated albumin, but to a lesser extent, in vivo glycated albumin from diabetic patients had a lower affinity for both drugs with elevated dissociation constants for ketoprofen (K_d ¼ 9.98 mmol/L) and warfarin (K_d ¼ 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).

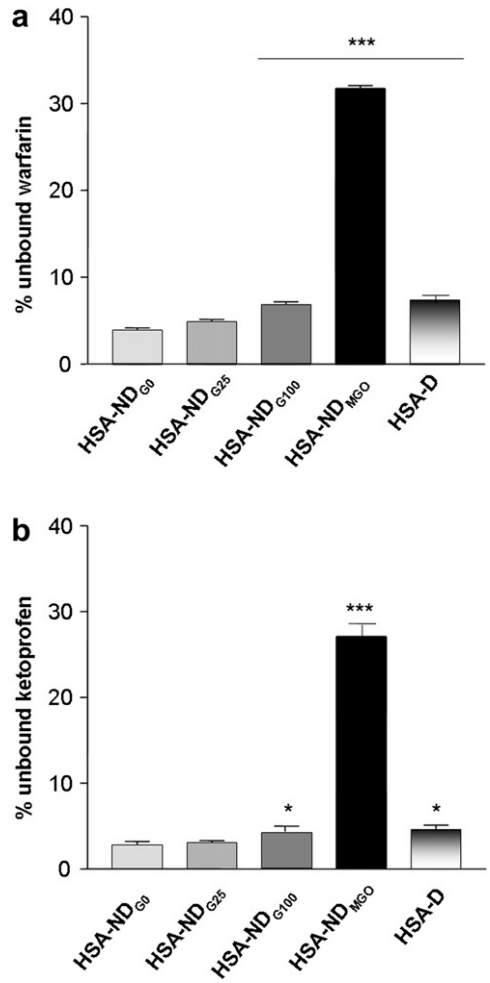


Fig. 2. Percentage of unbound warfarin and ketoprofen concentrations in various albumin preparations. All data are expressed as means ± SD from three independent experiments. *Effect of glycation or diabetes on purified HSA (vs. HSA-ND_{G0}); ***$p < 0.001$, *$p < 0.05$.

3.3. Binding of both drugs to in vivo glycated 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 ($(F_0 - F_C)/F_C$) 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

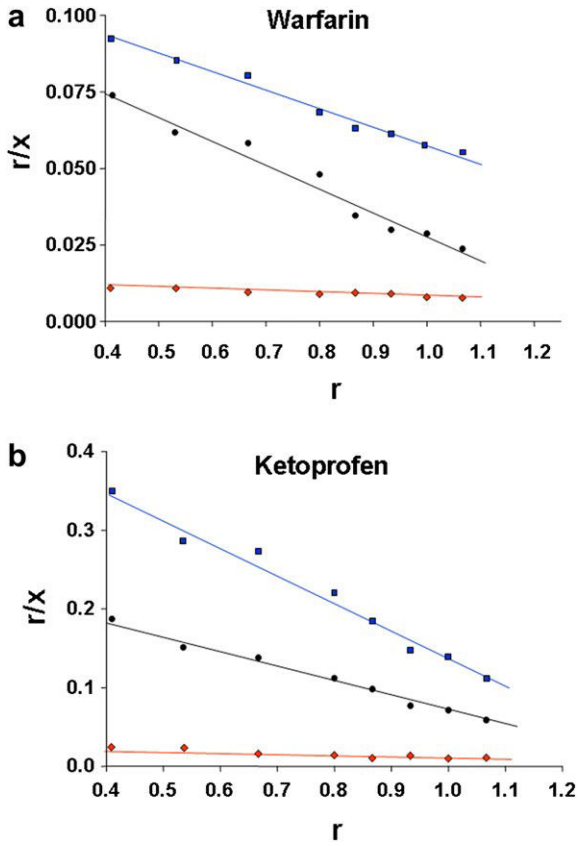


Fig. 3. Scatchard plots of warfarin and ketoprofen in various albumin preparations. Scatchard plot of: (a) warfarin and (b) ketoprofen binding in native human albumin HSA-ND_{G0} (-), in vitro glycated albumin HSA-ND_{MGO} (A) and diabetic albumin HSA-D (C).

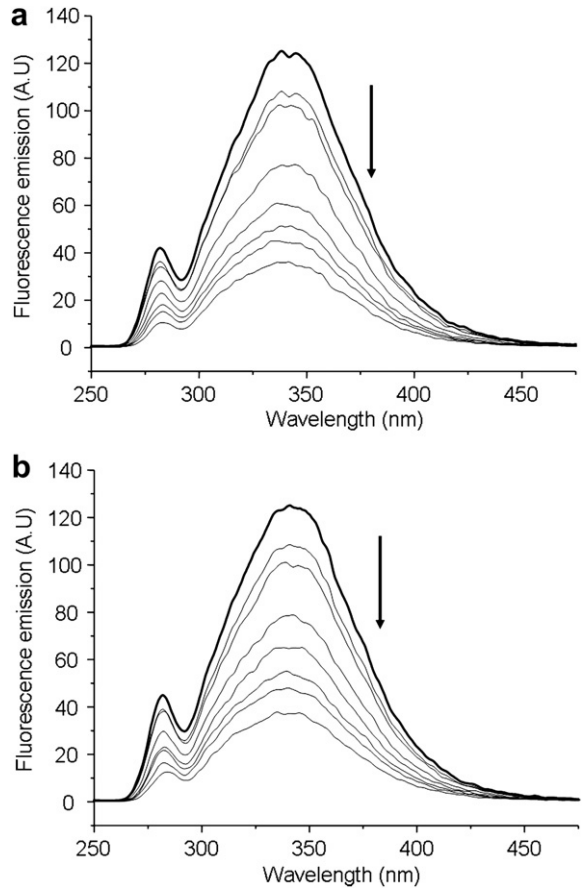


Fig. 4. Effects of warfarin and ketoprofen on the fluorescence emission spectrum of native HSA (HSA-ND_{G0}). Native albumin at 10 mM was incubated without (thick curve) and with different concentrations of (a) warfarin and (b) ketoprofen of between 5 and 70 mM at 37 °C for 5 min.

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 ¼ 6.15 x 10^6 L/mol) is higher than the one calculated for warfarin (K_A ¼ 2.23 x 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 ¼ 1.03 (n ¼ 1.08) with the in vivo glycation of warfarin (ketoprofen) in comparison to the native albumin, which had around n ¼ 1.44 (n ¼ 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}): ***$p < 0.001$, **$p < 0.01$, *$p < 0.05$.

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

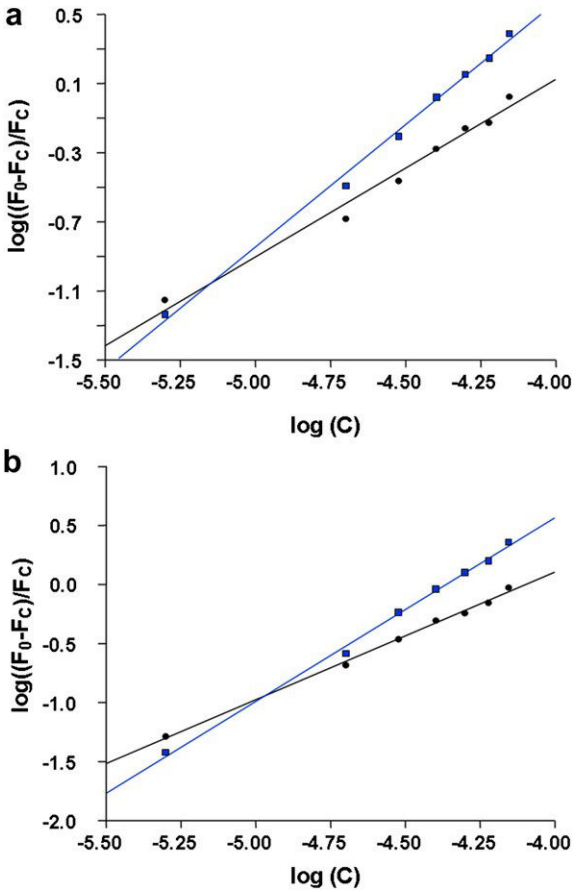


Fig. 5. The log plots ((F0 – FC)/FC) vs. log [C] for warfarin and ketoprofen binding with native and diabetic albumin. F_0 and F_C are the tryptophan fluorescence intensities of native albumin, HSA-ND_{G0} (–) and diabetic albumin, HSA-D (C) in the absence and presence of (a) warfarin or (b) ketoprofen 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 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 glycated with glucose (2 mol glucose/mol albumin) [22], whereas a decrease in binding with early stage glycated 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 glycated HSA.

In this study, we first characterized our different glycated 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 glycated albumin purified from a pool of plasma from diabetic patients with very high glycated hemoglobin levels (HbA_{1C} ¼ 11.0% ± 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 suprapathological glycation models displayed a considerable level of glycation associated with an increased oxidative state. Furthermore, compared to the data obtained for in vivo glycated HSA (HSA-D), in vitro glycated 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 glycated 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 glycated 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

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.

pockets, as detected by 1-anilinonaphthalene-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 at 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 exited 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 ¼ 6.15 x 10^6 L/mol) was markedly higher than the one calculated (K_A ¼ 1.17 x 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. Shaklai, 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. Duche, 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. Schmoldt, 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. Esquerra, 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. Cacciabaudo, 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. Lakowitcz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Spinger, 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, Spectrochimi. Acta Part B: At. Spectrosc. 43 (1988) 651e660.

Si cette première partie a mis en évidence l'altération de l'affinité de l'albumine pour des médicaments à travers les modèles de glycation *in vivo* et *in vitro*, cela n'a pas permis de déterminer le rôle de la glycation sur cet impact. Suite à ces résultats, nous avons cherché à détailler, dans un deuxième temps, une relation entre le degré de glycation et l'importance des modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine, à travers deux propriétés pharmacologiques : l'affinité pour le Kétoprofène® et l'activité estérase.

Article 3 : «Glycation alters ligand-binding, enzymatic and pharmacological properties of human albumin »

Jennifer Baraka-Vidot, Cynthia Planesse, Indira Dennemont, Olivier Meilhac, Valeria Militello, Jean Van den Elsen, Emmanuel Bourdon, Philippe Rondeau.

Soumis à JBC (Journal of Biological Chemistry)

GLYCATION ALTERS LIGAND-BINDING, ENZYMATIC AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF HUMAN ALBUMIN*

Jennifer Baraka-Vidot[1], Cynthia Planesse[1], Olivier Meilhac[1,2], Valeria Militello[3] Jean Van den Elsen[4], Emmanuel Bourdon[1], Philippe Rondeau[1]

[1]Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO) EA 4516, Université de La Réunion, Plateforme CYROI, Saint Denis, La Réunion, France.
[2]Inserm U1148, CHU X. Bichat, APHP, 46 Rue Henri Huchard, 75018 Paris, France
[3]Dipartimento di Fisica–Chimica, Università di Palermo, Viale delle Scienze Edificio 18, 90128 Palermo, Italy
[4]Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, Claverton Down, Bath BA2 7AY, UK

*__Running title:__ *Pharmacological properties of human glycated albumin*

To whom correspondence should be addressed: Philippe Rondeau, GEICO - Université de la Réunion 15, avenue René Cassin – BP 7151 - 97715 Saint Denis Messag Cedex 09 La Réunion – France - Tel: (+262) 262 93 86 48 - Fax: (+262) 262 93 82 37
E-mail: rophil@univ-reunion.fr

Keywords: Diabetes, Albumin, Glycation, Esterase activity, Ketoprofen.

Background: Albumin exerts crucial pharmacological activities through its drug binding capacities.
Results: Glucose-mediated glycation significantly impaired the pharmacological and structural properties of human albumin.
Conclusion: Significant correlations can be established between glycation-mediated changes in structural and pharmacological properties of albumin.
Significance: This work highlights the important role for albumin glycation in the variability in drugs responses in diabetes situation.

ABSTRACT

Albumin, the major circulating protein in blood, can undergo increased glycation in a diabetes context. Albumin exerts crucial pharmacological activities through its drug binding capacities, including ketoprofen, and via its esterase-like activity enabling the conversion of pro-drugs into active drugs. In this study, the impact of the glucose mediated glycation on the pharmacological and structural properties of human albumin was investigated. Aggregation product levels and redox state were investigated to assess glycation mediated changes in the structural properties of albumin. Glucose-mediated changes in ketoprofen-binding properties and esterase-like activity were evaluated using fluorescence spectroscopy and *p*-nitrophenyl acetate hydrolysis assays, respectively. With the exception of redox parameters, significant dose-dependent alterations in biochemical and functional properties of *in vitro* glycated albumin were observed. We also found that the dose-dependent increase in levels of glycation, protein aggregation and average molecular mass changes correlated with a gradual decrease in albumin's affinity for ketoprofen and its esterase-like properties. In parallel, significant alterations in both pharmacological properties were also evidenced in albumin purified from diabetic patients. Partial least squares regression analyses established a significant correlation between glycation-mediated changes in structural and pharmacological properties of albumin, highlighting the important role for glycation in the variability in drugs responses in diabetes situation.

Diabetes mellitus is now described as a pandemia affecting over 300 million people in the world. This disease is characterized by high blood glucose levels that result from defects in the body's ability to produce and/or use insulin. This hyperglycemia can affect numerous proteins through a non-enzymatic process known as glycation or glycoxidation (1). This condensation reaction between the aldehyde function of carbohydrates and amino groups of circulating proteins results in the formation of Schiff bases and subsequent Amadori products that can give rise to advanced glycation end products (AGE) in the case of uncontrolled hyperglycemia (2). Numerous studies showed that non-enzymatic glycation and AGE formation were associated with diabetes complications, such as retinopathy, nephropathy, neuropathy and coronary artery disease (3,4).

Albumin, the most abundant protein in blood plasma is the most common protein affected by this phenomenon (5,6). The high lysine and arginine residue contents in albumin structure explains the potential target of this protein for glycation (7).

Albumin exerts several physiological and pharmacological functions, including antioxidant properties (8), oncotic pressure regulation, catalytic activities and particularly capacities of binding and transport for numerous endogenous and exogenous compounds, like drugs (9). Albumin can binds a remarkably wide range of therapeutic drugs. The albumin-bound form of the drug provides temporary storage as well as controlled release to the target receptor in order to prevent its rapid metabolism or toxicity (10). Thus this plasma protein could act as a circulating depot for many drugs (11). Albumin affinity capacity plays a major role in absorption, distribution, metabolism, and excretion for drugs (ADME) (12). This key role is particularly important for drugs with narrow therapeutic index, like warfarin, which could be toxic in the free form.

The two major binding site for drugs are called Sudlow site I and II (13). Sudlow site I is large and flexible and preferentially binds bulky heterocyclic compounds such as warfarin. By contrast, site II, also named the indole-benzodiazepine site (14), is small and less flexible and binds to aromatic carboxylic acid containing drugs, such as, ketoprofen, consisting of a hydrophobic center with a negatively charged carboxy group at one end of the molecule. The most prominent catalytic, esterase-like, active sites of human serum albumin were shown to be closely related to its drugs binding sites, because various drugs inhibited this activity (15). Albumin exerts several types of hydrolytic activity, among which the esterase-like property constitutes the most prominent. This activity was first discovered in 1951 and confirmed in 1991 by Honma *et al* (16). The relation between esterase activity of human serum albumin (HSA) and the mechanism of conversion of aspirin has been extensively studied for decades. Recently, it was shown that this activity is useful for converting prodrugs into active drugs (17).

These two functions (drug-binding capacity and esterase-like activity) play a important role in the pharmacological properties of drugs especially because the interaction with HSA can be stereospecific (18). Structural alterations caused by glycoxidation in a diabetes situation could alter these two properties and recent studies from our group reported that *in vitro* and *in vivo* glycation on albumin indeed induced structural modification affecting albumin's antioxidant properties (19) and binding capacities (20,21). However, the direct contribution of the glycation process in drugs pharmacological properties of albumin still remains to be elucidated. To clarify the close relationship between structural and functional alterations caused by glycoxidation, we investigated the esterase-like activity and affinity capacity for ketoprofen of albumin in a diabetes context through *in vitro* and *in vivo* models of glycation. The *in vitro* models include glycated HSA resulting from the incubation of commercially available human serum albumin with increasing concentrations of glucose and *in vivo* models consist of plasma purified HSA from diabetic patients with different degrees of severity in their diabetes. In this paper we use both models to establish the relationship between the degree of glycation of the protein with its structural and functional properties by attempting a partial least regression method (PLS) across different *in vitro* models of glycated albumin.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals and reagents-Human serum albumin (96 to 99%), bicinchoninic acid,

ketoprofen, D-(+)-glucose, Congo Red, *m*-aminophenylboronic acid–agarose and *p*-nitrophenyl acetate were all purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

In vitro Glycation of HSA

Commercial human serum albumin was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, to yield a stock solution of 0,6 mM. Glycated human serum albumin was prepared as previously described (22) by incubating filtered solutions of HSA prepared without and with glucose (5, 25, 50, 100, 200, and 500 mM) in PBS, pH 7.4, under sterile conditions and nitrogen gas in capped vials at 37°C for three weeks. After incubation, protein samples were dialysed against PBS, sterile-filtered through a 0.2 µm Millipore filter and stored at -80 °C. Final concentration of glycated proteins was determined by using bicinchoninic acid assay (BCA).

Preparation of glycated human serum albumin from diabetic patients- Samples of blood from diabetic patients (% H_bA1c = 8.7 ± 0.7, N=15) with different degree of diabetes type 2 and non-diabetic subjects (% H_bA1c = 5.5 ± 0.3, N=5) were obtained by 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. Albumin was purified from fresh human plasma by performing a dialysis against Tris/HCl followed by affinity chromatography using Cibacron Blue 3G linked to agarose (Amersham cat# 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 with a 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4). Each fraction of eluate was examined by gel electrophoresis and the most purified and concentrated extracts were pooled before the remaining immunoglobulins removal with sepharose-protein A, followed by extensive dialysis against PBS and storage at -80°C.

Structural characterizations-Fructosamine and ketoamine derivatives were determined using the method developed by Johnson *et al* (23) with the nitroblue tetrazolium (NBT) reagent.

The 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) assay is a sensitive method for determining the primary free amino groups in proteins (24). This method was described in detail in a previous study by our group (25).

The thiol groups in modified albumin were measured by Ellman's assay using 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (26) which was well described in a previous study (27).

Level of carbonylation of proteins was determined by spectrophotometric assay based on recognition of protein-bound DNPH in carbonylated proteins by using an anti-DNP antibody (28). This method was described in detail in a previous study (29). Carbonyl was expressed as mol carbonyl/mol protein and determined by the following formula:

$$Carbonyl(mol)\ /\ protein(mol) = \frac{(OD_{370})*\mathcal{M}_{M\,276\,protein}}{(OD_{276} - 0.43*(OD_{370}))*\mathcal{M}_{M\,370\,hydrazone}})$$

In previous formula $\mathcal{M}_{M276\ protein}$ equals 46,824, molar absorptivity of HSA and $\mathcal{M}_{M370\ hydrazone}$ equals 22 000, molar absorptivity of the hydrazone (30).

Global charge modifications in glycated albumin samples were analyzed by native Polyacrylamide gradient gels (5 to 15% of acrylamide) and stained by Coomassie blue according to Laemmli's method (31).

Discriminating analysis of glycated and non-glycated albumin was performed using MPBA polyacrylamide electrophoresis (32). 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 an 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.

Boronate affinity chromatography- The formation of Amadori products was also assessed by the percentage retention of modified albumin on boronate affinity columns. The technique of batch separation was used. One ml of separating gel (*m*-aminophenylboronic acid–agarose) was transferred into 2 ml tubes equilibrated with

five bed volumes of binding buffer (0.2 M ammonium acetate, pH 8.8). One ml of albumin solution samples (diluted in PBS at 1 $mg.ml^{-1}$) was applied to 1 ml of separating gel. After a first centrifugation (2,000×g for 2 min), the supernatant fraction was collected. The gel was washed five times with the binding buffer, in the same conditions. When all non modified HSA, which was not retained on the gel, was entirely collected, "boronate-bound" albumin, corresponding to glycated HSA was eluted using 5-6 bed volumes elution buffer (NaCl 0.15 M, $MgCl_2$ 10 mM, D-mannitol 0.2 M, pH = 3.4). Absorbance at 278 nm was measured in all the fractions to monitor the presence of proteins and to determine the percentage of glycated albumin for each sample. The gel was regenerated successively with three bed volumes of NaOH 0.02 M, acetic acid 0.05 M and binding buffer.

Mass spectroscopy analysis- Analysis of albumin by mass spectrometry (MS) was performed using SELDI-TOF (surface-enhanced Laser Desorption Ionization Time Of Flight) MS technology (Biorad). Ten micrograms of purified human albumin were added to 100 microliters of 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8 (binding buffer) for incubation with Q10 ProteinChip arrays (Biorad), an anionic exchanger surface. After 120 minutes of incubation with gentle shaking, the ProteinChip array was washed with the binding buffer. Finally, arrays were washed with water and allowed to air-dry before adding the matrix, consisting of a saturated solution of α-cyano-4-hydroxy cinnamic acid matrix (Biorad) in 100µl acetonitrile (100%) and 100µl trifluoroacetic acid (1%). The m/z values of proteins retained on Q10 surface were determined from time-of-flight measurements using a ProteinChip Reader (PCS 4000; Biorad). Data were collected by averaging 500 laser shots for each sample. The peak intensities were normalized by using the total ion current of all spectra.

Fluorescence AGE determination- The fluorescence intensity measurement of glycated product was obtained with 335 (pentosidine) (33) and 380 nm (crossline + vesperlysine) (34) excitation wavelengths using a Horiba FluoroMax®-4 spectrophotometer. The excitation and emission slits were equal to 5 and 10 nm, respectively. All protein samples were prepared at 1.5 mg/ml in 50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.4. The relative percent of AGEs formation (pentosidine and crossline+ vesperlysine) was calculated using the following formula:

$$AGE\% = 100 * \left(\frac{I_{maxG} - I_{maxG0}}{I_{maxG0}}\right)$$

Where AGE% is relative percent of AGE, I_{maxG} is maximum fluorescence intensity of glycated HSA, I_{maxG0} is the maximum fluorescence intensity of not glycated HSA_{G0}.

Albumin cobalt binding- The albumin cobalt binding (ACB) test reported by Bar-Or *et al.* was originally designed to detect ischemia modified albumin (IMA) in patients with ischemia (35,36). This assay based on the reduced binding affinity of the human serum albumin for metal ions (Cobalt, Co^{2+}) was applied here on albumin samples. Preparations for the Co (II) albumin binding protocol consist on the addition of 20 µl of samples (1/4 dilution) to 15 µl of a 0.2% cobalt chloride solution, followed by vigorous mixing and 15-min incubation at 37°C. Dithiothreitol (20 µl of a 1.5 g/l solution) was then added and mixed. After 2 min. incubation, 20 µl of 0.9 M NaCl solution was added. The absorbance was read at 470 nm using a microplate reader. The blank was prepared similarly without DTT.

Albumin affinity for ketoprofen- This method is based on the quenching of albumin fluorescence induced by its interaction with drugs (10). The intrinsic fluorescence of human albumin is mainly attributed to the tryptophan residue (Trp-214). Different series of assay solutions were prepared by mixing 20 nmol of different HSA preparations with ketoprofen at variable concentrations ranging from 0 to 160 nmol. Each solution was heated for 30 min at 37 °C and transferred into a quartz cell. The fluorescence spectra were recorded in the range of 250-500 nm under excitation at 270 nm. The binding parameters (i.e. the binding constant K_A and the binding site number (n) for ketoprofen were obtained from the equation given below:

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

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 constant formation of the complex formed between the drug and albumin, expressed as L/mol.

Esterase-like activity- The reaction of *p*-nitrophenyl acetate with HSA was followed spectrophotometrically at 400 nm with an Infinite M200 pro spectrofluorometric analyzer (TECAN) by monitoring the absorbance of *p*-nitrophenol. The reaction mixtures contained 5 µM *p*-nitrophenyl acetate and 20 µM HSA in 67 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). Reactions were followed at 25 °C. Under these conditions, pseudo-first-order rate constant analysis could be applied, as described in previous reports (37,38), and apparent hydrolysis rate constant (k_{obs}) was calculated as follow (18):

$$k_{obs} = \frac{v_0}{[HSA]}$$

where v_0 is the initial linear velocity of the reaction and [HSA] the concentration of albumin sample (here 20 µM). The velocities were obtained from the initial linear period (20% of total reaction) by linear regression of the decay.

Partial least square regression approach- Partial least square regressions (PLS) were performed to establish correlation between structural and functional data across different HSA samples. All samples were used to calibrate the PLS model and the performance of this model was assessed by the coefficient of correlation (r^2) and the root mean square error of calibration (RMSEC) between predicted and measured values of esterase activity (k_{obs}) and binding affinity (log K_A) on data set.

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}}$$

Where n is the number of data, y_i is the measured value of data point i and $\hat{y}_i$ is the predicted value based on the model of calibration. The Unscrumbler (Camo ASA) was used for performing regression analysis.

Statistical analysis- The data are expressed as the means ± 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. Univariate correlation coefficients were calculated according to Pearson's method.

Results

HSA was *in vitro* glycated by subjecting the protein to a range of glucose concentrations followed by a range of structural and functional assessments in order to determine the impact of glucose-induced glycation on albumin's properties. The biochemical and structural parameters relating to the *in vitro* glycated HSA models are summarized in Table 1. Glycated HSA is referred to as HSA_{Gx}, where x is the amount of glucose incubated with the plasmatic protein (x = 5, 25, 50, 100, 200, and 500 mM).

Structural characterization of in vitro glycated HSA samples- Biochemical characterization of albumin samples revealed that glycation with increasing concentrations of glucose caused a dose-dependent elevation in ketoamine levels (up to four-fold higher for HSA_{G500} compared to HSA_{G0}, $p<0.001$). This increase of early glycation products is accompanied by formation of fluorescent AGE in a dose dependent manner for pentosidine, vesperlysine and crossline products, as well. Indeed, glycation in the presence of 500 mM of glucose induced the more intensive formation of pentosidine (34.5%, $p<0.001$) and vesperlysine (35.9%, $p<0.01$). Two direct consequences are observed with the glycation process with growing concentrations of glucose: the increase in average molecular weight accompanied by aggregates formation.

As reported in previous studies, glycation of albumin was shown to generate thermodynamically more stable high molecular weight aggregates with high β-sheet structure content leading to formation of amyloid type structures (39-41). Here, the significant increase in average molecular weight was noticed for most glycated albumin samples. The molecular weight in HSA_{G25} was approximately increased with 127 Da, while glycation of HSA with 500 mM of glucose lead to an increase of approximately 1621 Da corresponding to a condensation of around ten

glucose units with the protein (one glucose unit is equivalent to a mass increase of 160 Da). The measurement of Congo red absorbance performed to detect β-fibrillar structure in albumin samples featured significant increase only for highly glycated models HSA_{G200} (+15.4%, $p<0.05$) and HSA_{G500} (+22.1%, $p<0.01$) attesting the presence of such aggregate structures. These results correspond with the thioflavin-T assays showing an enhanced fluorescence upon binding of the dye to amyloid fibrillar structures in highly glycated albumins (data not shown). As expected, the progressive glycation, correlated with the glucose concentration, also showed a dose dependent decrease of free amino groups that react with the TNBS reagent. If native albumin (HSA_{G0}) displayed about 26.4 free amine groups, this level dropped up to 13.3 for the most glycated HSA (HSA_{G500}) reflecting the direct involvement of lysine and arginine residues in glycation reaction. As a direct consequence of the modification of these positively charged residues with glucose a significant changed in the isoelectric point of albumin can be observed with native PAGE electrophoresis (Fig.1a) resulting in an enhanced electrophoretic migration as a function of glucose concentration. Similarly, MPBA gel electrophoresis shows an increase in intensity of glycated HSA (1) as well as a reduction of native HSA levels (2) as a function of glucose concentration.

Surprisingly, the decrease in free thiol levels in albumin (from 0.122 ± 0.015 to 0.087 ± 0.003 mol/mol HSA) upon glucose glycation, as assessed by the Ellman did not show a significant impact of glycation on oxidative parameters. Similarly, the increase in carbonyl levels (from 4.3 ± 0.83 to 4.9 ± 0.68 mol/mol HSA) did not reach significance. Here, the low impact of glycation on redox properties of the protein is highlighted.

Table 2 features that the significant correlations (above 0.78) established between main structural parameters (except for thiol and carbonyl levels) reflect the direct impact of glycation extent on major structural modifications of the protein.

Impact of glycation on albumin affinity for ketoprofen- To study the impact of glycation on the drug binding characteristics of albumin we selected ketoprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug with analgesic and antipyretic properties. Ketoprofen constitutes a site-selective probe for Sudlow site II. The interaction between ketoprofen and glycated HSA *in vitro* models was investigated using a method based on fluorescence quenching. Ketoprofen acts as a quencher via interaction with albumin protein and induces a reduction in tryptophan fluorescence (F) emission intensity as illustrated in Fig. 2a. The binding constant (K_A), shown in Fig. 2b was calculated using the plots representing by $(F_0-F_c)/F_c$ for each albumin samples in which the binding site n is the slope and log Ka is the intercept (data not shown). The binding constant for ketoprofen ($K_A = 4.75 \times 10^8$ L/mol) dropped considerably with the rate of glucose (c) condensed to the protein. This impairment in affinity for ketoprofen is the highest for HSA_{G500} ($K_A = 4.98 \times 10^6$ L/mol). In addition, the gradual loss in albumin affinity for ketoprofen is confirmed by the reduction in number of binding sites resulting from the glycation process (from 1.82 ± 0.05 sites to 1.41 ± 0.03, data not shown).

In order to translate these results to the clinical situation, the affinity for ketoprofen of albumins purified from plasma of non diabetic and diabetic patients was also investigated. Fig. 3a shows the log K_A values in function of the H_bA1c level of each patient. The glycated hemoglobin (H_bA1C) level primarily reflects mean blood glucose levels over time and hyperglycemic severity. A significant relationship was observed ($r = 0.75$, $p < 0.01$) between albumin affinity and H_bA1C levels and our results clearly established that in diabetes context, the affinity of albumin for ketoprofen ($K_A = 4.17 \times 10^4$ L/mol) is significantly impaired compared to albumin of healthy subject ($K_A = 1.82 \times 10^6$ L/mol).

*Esterase-like activity of glycated HSA samples-*The effect of glycation of the catalytic activity of glycated HSA was investigated by monitoring the hydrolytic conversion of *p*-nitrophenyl acetate to *p*-nitrophenyl. Preliminary studies showed that human serum albumin had significantly greater esterase-like activity than bovine serum albumin (data not shown). Fig. 4 shows initial rate constants (k_{obs}) for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate by HSA as a function of glycation extent. Similar to the affinity constant for ketoprofen, esterase-like rate constants

decreased significantly in a dose dependent manner with increased glycation of the protein, as exemplified by the 22.5% drop in the initial rate constant from 0.273 s^{-1} (for HSA_{G0}) to 0.211 s^{-1} (for HSA_{G500}).

The *in vivo* glycated albumin samples purified from plasma of diabetic and non diabetic patients showed a significant and inverse correlation between esterase-like activities of the protein with the hyperglycemic severity of patients (identified by H_bA1C). As shown in Fig. 5a a significant relationship ($r = 0.67$, $p<0.001$) was obtained between both parameters. Comparison between non-diabetic and diabetic groups in Fig. 5b further confirms these results.

Relationship between structural and functional parameters: a linear regression approach- To establish a potential link between albumin affinity for ketoprofen (log K_A), its esterase-like activity (k_{obs}) and the change in structural parameters we employed the partial least-squares regression method (PLS-2). All structural parameters are included in this regression (glucose, ketoamine, free primary amine, thiol, ACB, carbonyl, fluorescent AGE, average molecular weight and δ-amyloid levels). Partial least squares regression combined the features of principal component analysis and multiple regressions by compressing a large number of variables to a few latent variables (PLS factors) in order to find a linear regression model by projecting the predicted variables and the observable variables to a new space. Fig. 6 illustrates the predicted values as a function of the measured values for log K_A (Fig. 6a) and k_{obs} (Fig. 6b). The regression models developed here produced log K_A and k_{obs} values very close to reference values. The PLS model related to albumin affinity for ketoprofen shows a very high correlation ($r^2 = 0.96$) with a very low root mean square error (0.159) indicating the good accuracy of this model of log K_A prediction from structural parameters. The regression model generated for the prediction of esterase-like activity via k_{obs} values also show satisfactory accuracy ($r^2 = 0.97$, RMSEC = 4.56).

Both PLS models show that the two functional properties of *in vitro* glycated HSA (affinity and esterase activities) could be correctly estimated from structural parameters.

Discussion

Chronic diabetes complications (nephropathy, atherosclerosis…) have been shown to be closely linked to protein glycoxidation in cellular physiopathology (3,42). Numerous *in vitro* studies report on the impact of glycoxidation on main functional properties of albumin, the most target protein of glycoxidation in circulatory system (19-21). These observations suggest a link between the intensity of HSA glycation and the severity of the complications observed in diabetes. However, none of these studies have been able to establish whether there is a quantitative relationship between the degree of glycation and the extent of the structural and functional modifications of *in vitro* and *in vivo* glycated HSA. In this study we try to establish this link by focusing on two important functions of HSA involved in the pharmacokinetics of therapeutics: drug-binding and esterase-like properties.

With respect to the main aspects of the pharmacokinetics of drugs (absorption, distribution, metabolism, and excretion), HSA plays a major role in the distribution of drugs through the plasma. Alterations in the binding affinity of albumin could have serious consequences for the pharmacokinetic and pharmacodynamics properties of a wide variety of drugs. For example, impaired drug binding capacity of HSA could lead to increased levels of the pharmacologically active fraction of a drug in circulatory system and thereby contribute to its side-effects. In addition to albumin's crucial pharmacological role in binding and transporting therapeutic drugs, it also exhibits a range of hydrolase-type activities, among which the esterase property is the most prominent (43). Esterase enzymes are known to be involved in the conversion of many prodrug esters to active drugs such as aspirin, ketoprofen glucoronide or nicotinic acid (44-46).

The drug binding and esterase activities sites are located very close to each other in the three-dimensional structure of HSA. The primary reactive centre of its esterase activity is composed of arginine residue Arg410 and tyrosine Tyr411 (18,47) and is located in Suddlow site II, which also acts as the binding site for ketoprofen and several benzodiazepines. A secondary esterase site was

reported to be in close vicinity of the warfarin binding site (Suddlow site I) (15).

In this study, we first characterized numerous structural parameters of albumin (redox state, modified amino residues, aggregation, glycation products formation and molecular weight) as a function of the dose of the glycation agent. We compared *in vitro* models of glycated albumin mimicking normoglycemia with physiological concentration of glucose (5 mM), and HSA glycated with pathological glucose concentrations, reflecting the conditions found in diabetes (25 mM), and suprapathological conditions (50–500 mM) that are often used in studies related to diabetes pathology.

As expected and consistent with previous studies, we found that *in vitro* glycation of albumin with glucose contributed to the formation of intermediary (ketoamine) and advanced (fluorescent AGE) glycation products. Structural characterization of glycated HSA indicated that glycation promoted the formation of β-structure aggregates associated with an increase in the albumin molecular weight due to the attachment of one or several glucose molecules to the protein. This conformational change of HSA into an intermolecular β-sheet structure suggests an impact of glycation on the tertiary structure of albumin and corresponds to results reported in previous studies (21,25,48). The decrease in free amino group level with glycation indicates the involvement of numerous exposed negatively charged residues such as lysine and arginine that are neutralized by glucose. Our data show that all these glycation-induced structural parameters occur in gradual manner and are strongly correlated with glucose concentration.

In contrast to other studies, the oxidative parameters of HSA (thiol and carbonyl levels) do not appear to significantly be impacted by incubation with glucose, with the exception of highly glycated albumin. This could be explained by the highly oxidative state of the commercial HSA used for this study, as evidenced by the low thiol levels observed (0.122 mol/mol HSA) compared to expected levels (between 0.480 and 0.650 mol/mol HSA) (19-21). The short incubation time could also explain the lower levels of oxidation. However, previous studies have shown significant structural alterations in glycated HSA without marked changes in oxidation (21,25). The regions mostly affected by the observed changes in three-dimensional conformation of HSA caused by glycation are located around tryptophan residue Trp214 and involve the partial unfolding of the hydrophobic pockets of albumin where Sudlow sites I and II are located. Consequently, these conformational changes associated with modification of specific amino residues (lysine and arginine) have a direct bearing on the intrinsic biological functionality of albumin including its binding and catalytic capacities.

The affinity of albumin for ketoprofen was evaluated by using tryptophan fluorescence quenching caused by molecular rearrangement or change in the microenvironment close to Trp214, resulting from drug-induced unfolding. This fluorescence quenching can occur via two mechanisms: static and dynamic (49). Numerous studies reported that the quenching mechanism of HSA by ketoprofen occurs in static mode corresponding to a ground state formation of a non-fluorescence complex between the fluorophore and the quencher (10,50). Using this spectrophotometric method, we were able to accurately investigate the binding characteristics of interaction between ketoprofen and the protein by calculating the number of binding sites and the affinity constant (K_A). The results suggested that the glycated albumin affinities were considerably altered as a function of the concentration of glucose used in the glycation process. The reduction of the binding constant was associated with a decrease in the number of binding sites. We have already reported, in a previous study, such impairment in albumin capacity for ketoprofen and also for warfarin, an anti-coagulant drug, in glycative context (20).

Although it has been reported by several studies that oxidation contributes to these structural changes in HSA, we saw no impact of glycation on the redox state of albumin (51) indicating that the impaired binding properties observed here are result from the glycation process alone. This finding is confirmed by the results obtained with *in vivo* glycated HSA purified from diabetic patients, showing a strong correlation between alterated drug binding capacity and the levels of H_bA1C (used as a measure for *in vivo* glycation in the blood over a long period (around 3 months)).

In addition to the evaluation of the affinity properties of albumin for ketoprofen, we investigated the catalytic activity of the glycated albumin with respect to the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate. As reported by a number of authors, the esterase-like hydrolytic activity of HSA depends on the source of the protein and also on its content in fatty acids, which inhibit this activity (52). The HSA used in this study is not defatted and displayed an enzymatic activity (0.273 s^{-1}) which is significantly higher than that of wild type has, as determined by Watanabe et al (0.085 s^{-1}) (18). Similarly, the esterase activity of HSA for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate was partially impaired with the glycation process. The alteration in the catalytic property could be explained by the proximity between the main catalytic site and specific target site of glycoxidation. It has indeed been suggested that the primary reactive site for ketoprofen binding (Sudlow site II) involves Arg410, which is known to be the most reactive glycation site together with Lys-525 (53). This indicates that glycation of Arg410 in the *in vitro* as well as the *in vivo* glycated HSA undoubtedly contributes to the impairment of esterase-like activity of the protein. A comparison of the two sets of *in vivo* data showed that esterase activity in human albumin of healthy subject was about 40 times higher that in HSA purified from diabetic patients.

Finally, our study showed that partial least squares regression was an effective method to retrieve functional parameters such as esterase activity or binding capacity from biochemical parameters of *in vitro* models of glycated albumin. Despite the use of very few samples, this PLS model featured good predictive performance. Such regression method could be applied, in the future, for plasmatic samples obtained from a large panel of diabetic patients displaying variable severity in their diabetes and their complications.

Two important findings emerge from this work:

- The reduced binding capacity of glycated albumin for ketoprofen was observed for both *in vitro* and *in vivo* glycated HSA and is strongly correlated with the extent of glycation. This functional impairment of albumin was also associated with an alteration of its esterase-type capacity.
- The linear relationship established between glucose, biochemical and functional parameters of albumin in glycative context demonstrated that pharmacological properties of albumin are strongly correlated with the glycation process alone.

In summary, alterations in structure and function of glycated HSA are strongly linked to glucose concentration, indicating that the severity of hyperglycemia in diabetes can lead to significant disturbances in drug metabolism. This could be of utmost importance for drugs with narrow therapeutic index or for the more recent use of prodrugs.

REFERENCES

1. Guthrow, C. E., Morris, M. A., Day, J. F., Thorpe, S. R., and Baynes, J. W. (1979) Enhanced nonenzymatic glucosylation of human serum albumin in diabetes mellitus *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4258-4261
2. Maillard, L. (1912) Action des acides aminés sur les sucres: . in *Formation des mélanoïdes par voie méthodique (*Sci.CRA ed., Paris
3. Brownlee, M. (1995) The pathological implications of protein glycation *Clin Invest Med* **18**, 275-281
4. Hartog, J. W., Voors, A. A., Bakker, S. J., Smit, A. J., and van Veldhuisen, D. J. (2007) Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications *Eur J Heart Fail* **9**, 1146-1155
5. Anguizola, J. A., Basiaga, S. B., and Hage, D. S. (2013) Effects of Fatty Acids and Glycation on Drug Interactions with Human Serum Albumin *Curr Metabolomics* **1**, 239-250
6. Rondeau, P., and Bourdon, E. (2011) The glycation of albumin: structural and functional impacts *Biochimie* **93**, 645-658
7. Armbruster, D. A. (1987) Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness *Clin Chem* **33**, 2153-2163
8. Halliwell, B. (1988) Albumin--an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol* **37**, 569-571
9. Ghuman, J., Zunszain, P. A., Petitpas, I., Bhattacharya, A. A., Otagiri, M., and Curry, S. (2005) Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin *J Mol Biol* **353**, 38-52
10. Bi, S., Yan, L., Sun, Y., and Zhang, H. (2010) Investigation of ketoprofen binding to human serum albumin by spectral methods *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **78**, 410-414
11. Joseph, K. S., and Hage, D. S. (2010) The effects of glycation on the binding of human serum albumin to warfarin and L-tryptophan *J Pharm Biomed Anal* **53**, 811-818
12. Kragh-Hansen, U. (1990) Structure and ligand binding properties of human serum albumin *Dan Med Bull* **37**, 57-84
13. Sudlow, G., Birkett, D. J., and Wade, D. N. (1976) Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin *Mol Pharmacol* **12**, 1052-1061
14. Lagrange, F., Penhourcq, F., Matoga, M., and Bannwarth, B. (2000) Binding of ketoprofen enantiomers in various human albumin preparations *J Pharm Biomed Anal* **23**, 793-802
15. Ikeda, K., and Kurono, Y. (1986) [Enzymatic activity and drug binding activity of human serum albumin] *Yakugaku Zasshi* **106**, 841-855
16. Honma, K., Nakamura, M., and Ishikawa, Y. (1991) Acetylsalicylate-human serum albumin interaction as studied by NMR spectroscopy--antigenicity-producing mechanism of acetylsalicylic acid *Mol Immunol* **28**, 107-113
17. Yang, F., Bian, C., Zhu, L., Zhao, G., Huang, Z., and Huang, M. (2007) Effect of human serum albumin on drug metabolism: structural evidence of esterase activity of human serum albumin *J Struct Biol* **157**, 348-355
18. Watanabe, H., Tanase, S., Nakajou, K., Maruyama, T., Kragh-Hansen, U., and Otagiri, M. (2000) Role of arg-410 and tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity *Biochem J* **349**, 813-819
19. Baraka-Vidot, J., Guerin-Dubourg, A., Dubois, F., Payet, B., Bourdon, E., and Rondeau, P. (2013) New insights into deleterious impacts of in vivo glycation on

albumin antioxidant activities *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1830**, 3532-3541
20. Baraka-Vidot, J., Guerin-Dubourg, A., Bourdon, E., and Rondeau, P. (2012) Impaired drugs-binding capacities of in vitro and in vivo glycated albumin *Biochimie* **94**, 1960-1967
21. Guerin-Dubourg, A., Catan, A., Bourdon, E., and Rondeau, P. (2012) Structural modifications of human albumin in diabetic context *Diabetes Metab* **38**, 171-178
22. Rondeau, P., Singh, N., Caillens, H., and Bourdon, E. (2008) Oxidative Stresses Induced by glycated human or bovine serum albumins on human monocytes *Free Radic Biol Med* **45**, 799-812
23. Johnson, R. N., Metcalf, P. A., and Baker, J. R. (1983) Fructosamine: A new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control *Clinica Chimica Acta* **127**, 87-95
24. Snyder, S. L., and Sobocinski, P. Z. (1975) An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines *Anal Biochem* **64**, 284-288
25. Rondeau, P., Navarra, G., Cacciabaudo, F., Leone, M., Bourdon, E., and Militello, V. (2010) Thermal aggregation of glycated bovine serum albumin *Biochim Biophys Acta-Proteins & Proteomics* **1804**, 789-798
26. Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups *Arch Biochem Biophys* **82**, 70-77
27. Chesne, S., Rondeau, P., Armenta, S., and Bourdon, E. (2006) Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine serum albumin on its structure and on cultured adipose cells *Biochimie* **10**, 1467-1477
28. Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., and Shacter, E. (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins *Methods Enzymol* **233**, 346-357
29. Baraka-Vidot, J., Navarra, G., Leone, M., Bourdon, E., Militello, V., and Rondeau, P. (2014) Deciphering metal-induced oxidative damages on glycated albumin structure and function *Biochim Biophys Acta* **1840**, 1712-1724
30. Levine, R. L., Wehr, N., Williams, J. A., Stadtman, E. R., and Shacter, E. (2000) Determination of carbonyl groups in oxidized proteins *Methods Mol Biol* **99**, 15-24
31. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **227**, 680-685
32. Morais, M. P., Mackay, J. D., Bhamra, S. K., Buchanan, J. G., James, T. D., Fossey, J. S., and van den Elsen, J. M. (2009) Analysis of protein glycation using phenylboronate acrylamide gel electrophoresis *Proteomics* **10**, 48-58
33. Meerwaldt, R., Links, T., Graaff, R., Thorpe, S. R., Baynes, J. W., Hartog, J., Gans, R., and Smit, A. (2005) Simple noninvasive measurement of skin autofluorescence *Ann N Y Acad Sci* **1043**, 290-298
34. Schmitt, A., Schmitt, J., Munch, G., and Gasic-Milencovic, J. (2005) Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics *Anal Biochem* **338**, 201-215
35. Bar-Or, D., Lau, E., and Winkler, J. V. (2000) A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report *J Emerg Med* **19**, 311-315
36. Lee, E., Eom, J. E., Jeon, K. H., Kim, T. H., Kim, E., Jhon, G. J., and Kwon, Y. (2014) Evaluation of albumin structural modifications through cobalt-albumin binding (CAB) assay *J Pharm Biomed Anal* **91**, 17-23
37. Kurono, Y., Kushida, I., Tanaka, H., and Ikeda, K. (1992) Esterase-like activity of human serum albumin. VIII. Reaction with amino acid p-nitrophenyl esters *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **40**, 2169-2172

38. Ozeki, Y., Kurono, Y., Yotsuyanagi, T., and Ikeda, K. (1980) Effects of drug binding on the esterase activity of human serum albumin: inhibition modes and binding sites of anionic drugs *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **28**, 535-540
39. Bouma, B., Kroon-Batenburg, L. M., Wu, Y. P., Brunjes, B., Posthuma, G., Kranenburg, O., de Groot, P. G., Voest, E. E., and Gebbink, M. F. (2003) Glycation induces formation of amyloid cross-beta structure in albumin *J Biol Chem* **278**, 41810-41819
40. Khan, M. W., Rasheed, Z., Khan, W. A., and Ali, R. (2007) Biochemical, biophysical, and thermodynamic analysis of in vitro glycated human serum albumin *Biochemistry (Mosc)* **72**, 146-152
41. Sattarahmady, N., Moosavi-Movahedi, A. A., Habibi-Rezaei, M., Ahmadian, S., Saboury, A. A., Heli, H., and Sheibani, N. (2008) Detergency effects of nanofibrillar amyloid formation on glycation of human serum albumin *Carbohydr Res* **343**, 2229-2234
42. Cohen, M. P. (2003) Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin *Arch Biochem Biophys* **419**, 25-30
43. Kragh-Hansen, U., Chuang, V. T., and Otagiri, M. (2002) Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin *Biol Pharm Bull* **25**, 695-704
44. Dubois-Presle, N., Lapicque, F., Maurice, M. H., Fournel-Gigleux, S., Magdalou, J., Abiteboul, M., Siest, G., and Netter, P. (1995) Stereoselective esterase activity of human serum albumin toward ketoprofen glucuronide *Mol Pharmacol* **47**, 647-653
45. Rainsford, K. D., Ford, N. L., Brooks, P. M., and Watson, H. M. (1980) Plasma aspirin esterases in normal individuals, patients with alcoholic liver disease and rheumatoid arthritis: characterization and the importance of the enzymic components *Eur J Clin Invest* **10**, 413-420
46. Salvi, A., Carrupt, P. A., Mayer, J. M., and Testa, B. (1997) Esterase-like activity of human serum albumin toward prodrug esters of nicotinic acid *Drug Metab Dispos* **25**, 395-398
47. Yoshida, K., Kurono, Y., Mori, Y., and Ikeda, K. (1985) Esterase-like activity of human serum albumin. V. Reaction with 2,4-dinitrophenyl diethyl phosphate *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **33**, 4995-5001
48. Wei, Y., Chen, L., Chen, J., Ge, L., and He, R. (2009) Rapid glycation with D-ribose induces globular amyloid-like aggregations of BSA with high cytotoxicity to SH-SY5Y cells *BMC Cell Biol* **10**, 10
49. Lakowitcz, J. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Spinger, New York
50. Thomas, M., Nelson, G., Patonay, G., and Warner, I. (1988) Analysis of drug binding sites on human serum albumin using multidimensional fluorescence measurements *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **43**, 651-660
51. Oettl, K., and Stauber, R. E. (2007) Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties *Br J Pharmacol* **151**, 580-590
52. Wolfbeis, O. S., and Gurakar, A. (1987) The effect of fatty acid chain length on the rate of arylester hydrolysis by various albumins *Clin Chim Acta* **164**, 329-337
53. Ahmed, N., Dobler, D., Dean, M., and Thornalley, P. J. (2005) Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity *J Biol Chem* **280**, 5724-5732

FOOTNOTES

*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 (« Rédox » project), the Université de La Réunion and the fédération Environnement Biodiversité Santé- FED4126. JBV is supported by a fellowship from the Conseil Régional de La Réunion and l'Europe.

Author contributions: J.B.V. researched data, contributed discussion, wrote and reviewed manuscript. C.P researched data, reviewed manuscript. O.M. contributed discussion, reviewed manuscript. V.M contributed discussion, reviewed manuscript. J.vd.E. reviewed manuscript. E.B. contributed discussion, reviewed manuscript. P.R. researched data, wrote, reviewed and edited manuscript.

The abbreviations used are: AGE, advanced glycation end-products; HSA, human serum albumin; HSA_{GX}, commercial human serum albumin incubated with X mM of glucose; HbA1C, glycated hemoglobin level; PBS, phosphate-buffered saline; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid; DTNB, 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); MPBA, methacrylamido phenylboronic acid.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Characterization of glycated HSA by PAGE electrophoresis. (a) electrophoretic migration profile in native PAGE electrophoresis (gradient polyacrylamide gel 4%-15%); (b) separation of HSA samples using phenylboronate acrylamide gel electrophoresis (mPAGE) (polyacrylamide gel 12% /MPBA 0.5%). Arrows (1) and (2) indicate the localization of glycated and native forms of HSA, respectively.

FIGURE 2. Binding of ketoprofen to *in vitro* glycated HSA samples obtained by fluorescence spectroscopy. Affinity of ketoprofen to albumin modified by increasing concentration of glucose (5 to 500 mM) was investigated with 20 nmol of albumin samples by quenching fluorescence. (a) Effect of ketoprofen on the fluorescence emission spectrum of albumin. (b) The binding constant K_A was calculated as described in the materials and methods section. Values are means ± S.D. for three experiments. Significance of differences compared with native albumin (*vs.* HSA_{G0}): $^{***}P < 0.001$.

FIGURE 3. Binding of ketoprofen to *in vivo* purified HSA samples from plasmas obtained by fluorescence spectroscopy. Affinity of ketoprofen to *in vivo* glycated albumin purified from plasma of non diabetic subjects (N=5) and diabetic patients (N=15) was investigated with 20 nmol of albumin samples. (a) Plots of binding constant K_A values against H_bA1C (%) for 20 purified HSA; (b) Comparison of binding constant K_A average values between control (N=5) and diabetic (N=15) groups. Significance of difference between both groups (*vs.* control): $^{***}P < 0.001$.

FIGURE 4. Esterase-like activity of *in vitro* glycated HSA samples. Hydrolysis rate constants (k_{obs}) were determined after reacting 5 μM *p*-nitrophenyl acetate with 20 µM native or glycated HSA in 67 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), followed at 25 °C. Shown are the mean values ± S.D. for three experiments. Significance of differences compared with native albumin (*vs.* HSA_{G0}): $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$.

FIGURE 5. Esterase-like activity of *in vivo* purified HSA samples from plasmas. Hydrolysis rate constants (k_{obs}) of *in vivo* glycated albumin purified from plasma of non diabetic subjects (N=5) and diabetic patients (N=10). (a) Plots of k_{obs}values against H_bA1C (%) for 15 purified HSA; (b) Comparison of k_{obs}average values between control (N=5) and diabetic (N=10) groups. Significance of difference between both groups (*vs.* control): $^{***}P < 0.001$.

FIGURE 6. PLS regression model performance linking structural parameters to ketoprofen binding capacity and esterase-like activity. Scatter plots describing the measured and predicted

values for: (a) binding constant K_A for ketoprofen; (b) Hydrolysis rate constants k_{obs}. Relationship between structural and functional data was performed by using PLS algorithm. r^2 is the coefficient of determination between model predictions and measured values, and RMSEC is the root mean square error of data prediction.

TABLE 1. Structural parameters in different HSA samples. 1) Glycation level determined by boronate affinity chromatography; 2) Ketoamine level obtained with the NBT assay; 3) Unmodified primary amino groups content in proteins by TNBS assay; 4) Free thiol group content as assessed by the Ellman's method; 5) Carbonyl level as assessed by spectrophotometric carbonyl assay; 6) albumin cobalt binding (ACB) index; 7) % Increase in Fluorescent AGE level obtained by maximum fluorescence emission at excitation wavelength of 335 nm (Pentosidine) and 380 nm (Vesperlysine); 8) Average molecular mass (kDa) obtained by ESI/MS; 9) % Increase in β-amyloïd aggregates formation probed with congo red reagent. All data are expressed as means ± SD of three independent experiments. *Effect of glycation in native HSA (vs. HSA_{G0}): $^{***}p<0.001$, $^{**}p<0.01$, $^{*}p<0.05$.

Methods	Glycation level %	Ketoamine / HSA (mol/mol)	Free amino groups /HSA (mol /mol)	Thiols/ HSA (mol/mol)	Carbonyl/ HSA (mol/mol)	ACB index	Fluorescent AGE (% HSA_{G0}) Vesperlysine	Fluorescent AGE (% HSA_{G0}) Pentosidine	Average Molecular Weight (kDa)	β-amyloid formation (% HSA_{G0})
HSA_{G0}	0	4.77 ± 1.96	26.43 ± 1.15	0.122 ± 0.015	4.29 ± 0.83	0.404 ± 0.061	100	100	66.287 ± 0.036	100.00 ± 8.82
HSA_{G5}	7.49	4.61 ± 1.84	24.94 ± 1.86	0.119 ± 0.020	4.26 ± 0.71	0.407 ± 0.051	100.71 ± 0.95	116.06 ± 1.53	66.212 ± 0.096	102.58 ± 0.94
HSA_{G25}	15.79	5.60 ± 1.95	25.37 ± 1.97	0.126 ± 0.014	4.16 ± 0.57	0.441 ± 0.054	105.37 ± 1.72	111.93 ± 7.65	66.414 ± 0.068*	100.45 ± 1.25
HSA_{G50}	22.56	6.01 ± 1.64	23.43 ± 1.30*	0.162 ± 0.009	4.04 ± 0.03	0.460 ± 0.053	114.21 ± 5.89*	121.38 ± 2.49	66.483 ± 0.045*	110.58 ± 5.05
HSA_{G100}	46.5	8.20 ± 1.56*	21.40 ± 2.57*	0.102 ± 0.003	4.44 ± 0.87	0.467 ± 0.040	110.57 ± 3.36	115.27 ± 9.69	66.713 ± 0.069**	112.04 ± 4.03
HSA_{G200}	56.43	12.13 ± 1.82**	21.30 ± 0.63**	0.097 ± 0.004	4.32 ± 0.63	0.478 ± 0.041*	125.78 ± 8.96***	127.38 ± 13.65*	67.092 ± 0.043***	115.38 ± 1.70*
HSA_{G500}	66.73	17.90 ± 3.84***	13.30 ± 0.77***	0.087 ± 0.003	4.97 ± 0.68	0.555 ± 0.052***	134.48 ± 5.11***	135.91 ± 10.96**	67.908 ± 0.013***	122.09 ± 3.46***

TABLE 2. Statistical analysis of structural and functional parameters. Univariate correlation coefficients and significance between different structural and functional parameter values compared by peer were calculated according to Pearson's method.

	Glycation	Ketoamine	Amine	Thiols	Carbonyl	ACB	MW	ϒ-amyloid	Fluo AGE	Esterase	Ket affinity
Glucose	0.737*	0.972***	0.956***	0.435	0.801**	0.901**	0.982***	0.782**	0.848**	0.723*	0.583*
Glycation		0.837**	0.788**	0.440	0.485	0.833**	0.824**	0.897**	0.941***	0.902**	0.868**
Ketoamine			0.920***	0.138	0.715*	0.894**	0.993***	0.829**	0.905**	0.754*	0.654*
Amine				0.060	0.785**	0.930***	0.940***	0.857**	0.820**	0.807**	0.668*
Thiols					0.243	0.263	0.102	0.050	0.038	0.050	0.066
Carbonyl						0.599*	0.743*	0.477	0.424	0.388	0.263
ACB							0.929***	0.864**	0.899**	0.888**	0.881**
MW								0.829**	0.902**	0.763*	0.646*
ϒ-amyloid									0.903**	0.872**	0.797**
Fluo AGE										0.833**	0.776**
Esterase											0.966***
Ket affinity											

Figure 1:

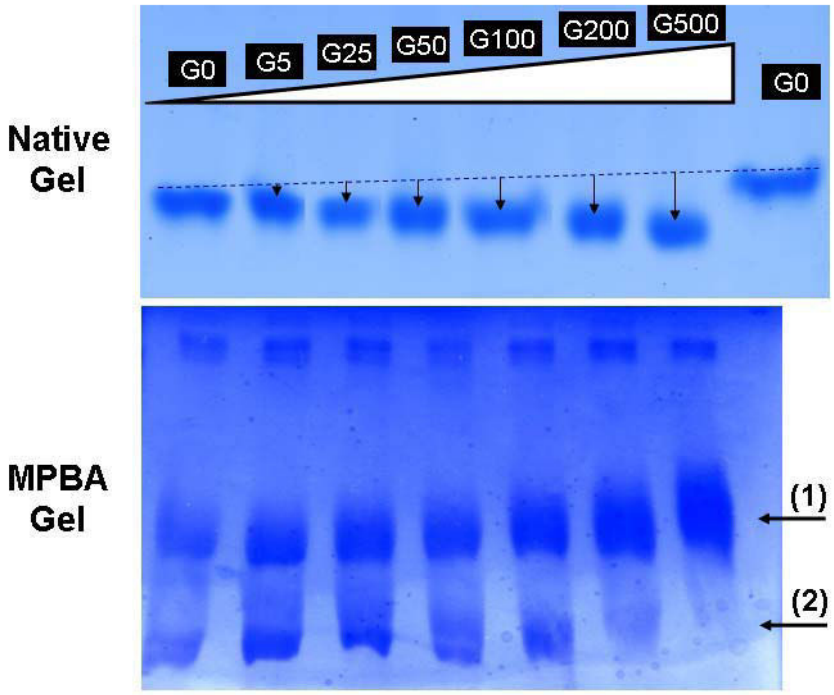


Figure 2:

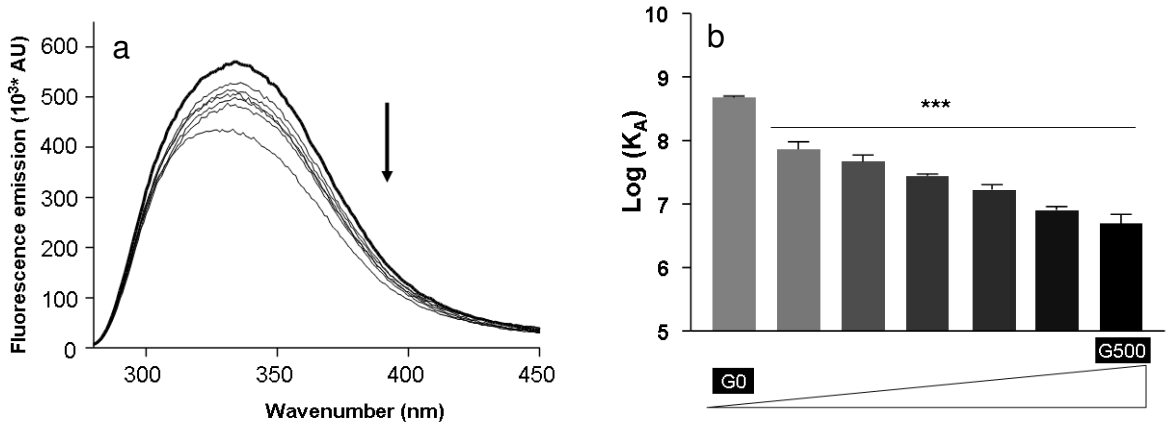


Figure 3:

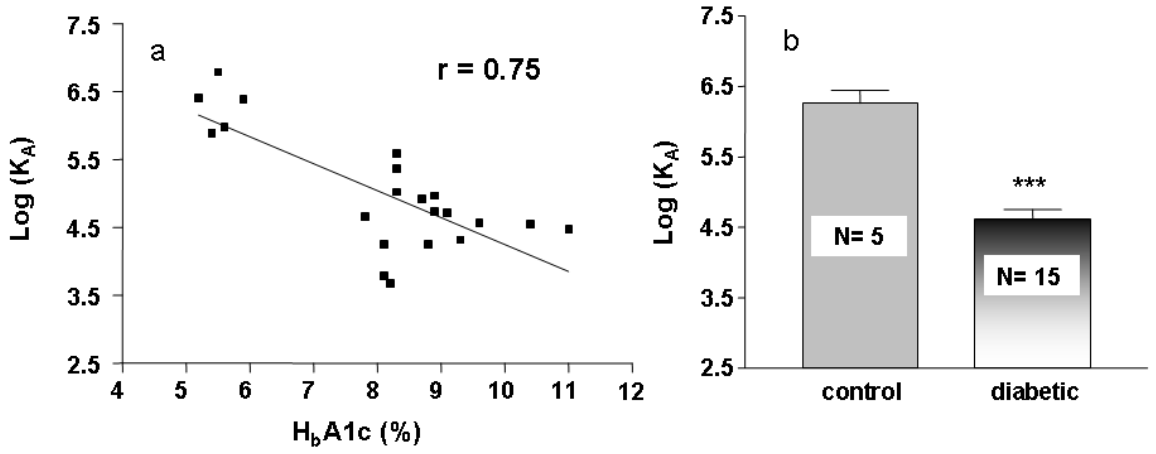


Figure 4:

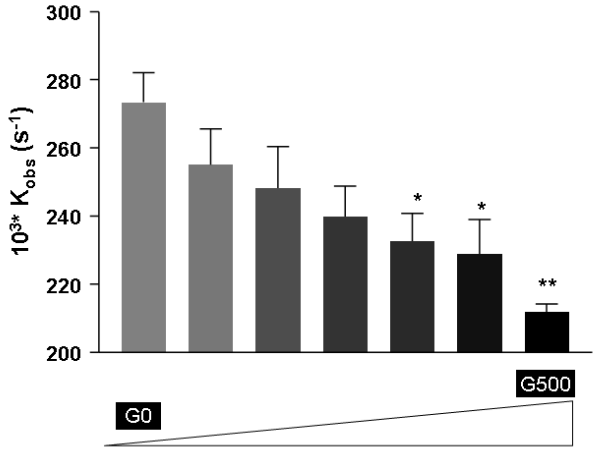


Figure 5:

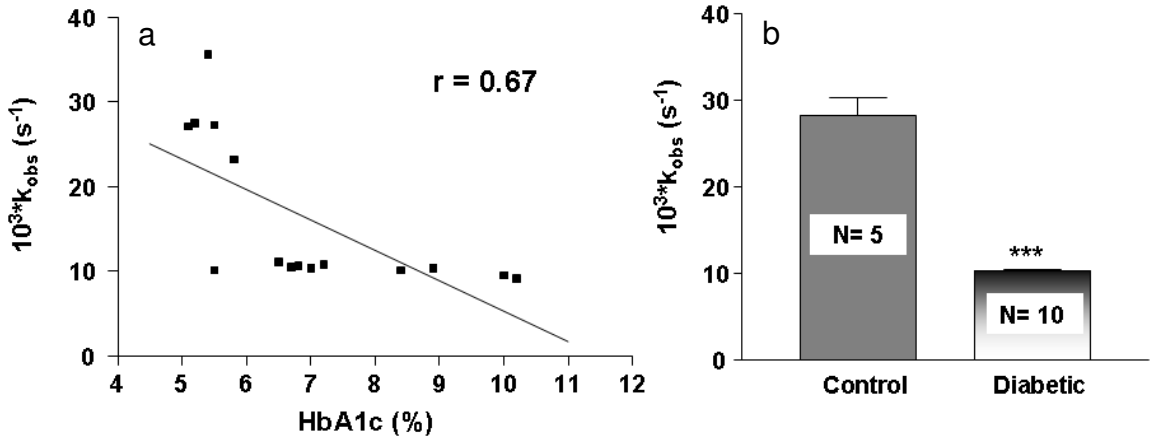
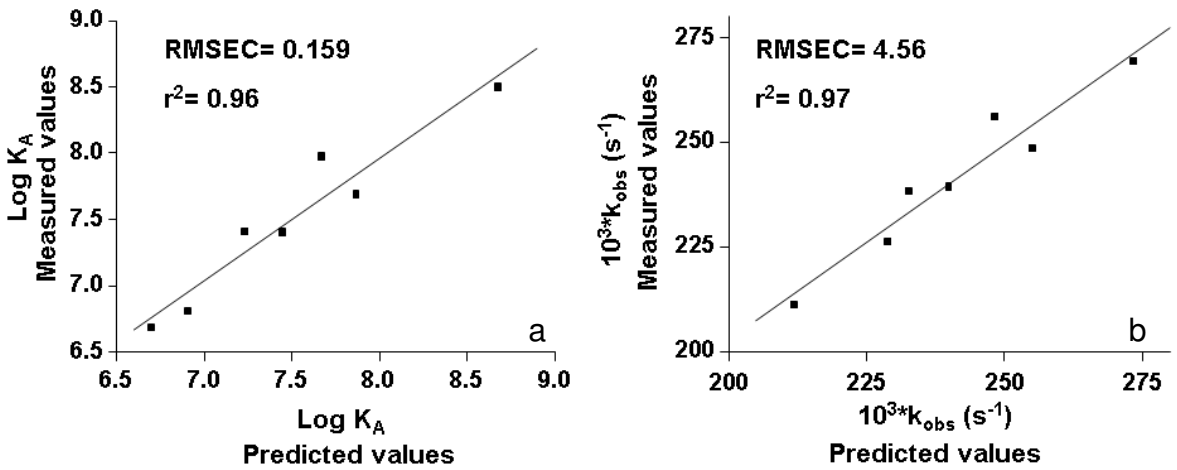


Figure 6:



Discussion

Les résultats de la première étude montrent distinctement que l'affinité des différents modèles de glycation pour la Warfarine® et pour le Kétoprofène® est affaiblie. Ces valeurs d'affinité obtenues à l'aide de deux méthodes distinctes, par chromatographie et par spectroscopie, montrent des résultats similaires. Cette baisse d'affinité de l'albumine pour ces médicaments est notamment due à des changements majeurs de la structure biochimique et tridimensionnelle de la protéine.

Ces modifications nous donnent des informations concernant la conformation de la protéine mais aussi concernant l'évolution locale de la structure de l'albumine glyquée autour des sites I (Warfarine®) et II (Kétoprofène®) de Sudlow. L'altération de la structure de l'albumine glyquée diminue l'affinité de cette dernière pour ces médicaments, mais fait apparaître de nouveaux sites de liaison avec une plus faible affinité. La quantité de médicaments libres obtenue à l'aide de la méthode chromatographique, est une valeur très intéressante surtout concernant l'étude de certains médicaments comme la Warfarine®, dont l'ajustement thérapeutique est difficile chez les patients diabétiques. Ces altérations montrent bien l'importance de l'intégrité structurale de l'albumine concernant ces propriétés fonctionnelles de l'albumine.

Nous avons pu montrer dans la première partie que la glycation a une influence sur la structure de l'albumine qui contribue aux modifications fonctionnelles. En revanche, nous ne pouvons pas affirmer que le phénomène de glycation constitue la seule cause de cette altération.
Pour répondre à cette question, nous avons mimé différents degrés de glycation en incubant de l'albumine commerciale avec un taux croissant de glucose et suivi l'évolution structurale, biochimique et fonctionnelle de ces différents modèles de glycation.

Les résultats de la partie précédente ont montré l'implication du phénomène de glycoxydation sur l'altération structurale et fonctionnelle de l'albumine accompagnée d'un changement de l'état redox. Par contre, les résultats des paramètres structuraux de cette partie ne détectent

aucun changement de l'état redox pour tous ces modèles de glycation, montrant ainsi que les changements biochimiques et structuraux impliquent uniquement le phénomène de glycation.

En ce qui concerne les propriétés fonctionnelles, nous avons pu constater pour nos modèles de glycation *in vitro*, une altération des propriétés de liaison de l'albumine au Kétoprofène® et une dégradation de l'activité estérase de manière graduelle en fonction du degré de glycation. Ces résultats témoignent d'une corrélation étroite qu'on a pu établir entre le taux de glucose, les paramètres biochimiques et fonctionnels de l'albumine dans un contexte de glycation, supposant que les propriétés pharmacologiques de l'albumine sont étroitement liées au phénomène de glycation uniquement.

Par ailleurs, nous avons pu confirmer que cette relation étroite entre les modifications fonctionnelles et le degré de glycation est aussi constatée pour de l'albumine purifiée à partir de plasma de patients diabétiques ou non. En effet, les résultats concernant les modèles *in vitro* sont en concordance avec ceux obtenus pour l'étude des modèles de glycation *in vivo* qui montrent bien une altération de ces deux propriétés linéairement au taux croissant de HBA1c, qui est un indicateur de la régulation du glucose dans le sang.

Bien que les conditions expérimentales utilisées dans nos travaux soient semblables à celles utilisées dans l'étude réalisée par Olsen et *al* [179], nous avons observé des différences concernant la fraction libre de la Warfarine® avec l'albumine native, qui est cinq fois plus élevée dans notre étude. Cette différence peut être attribuée au fait que nos échantillons d'albumine n'ont pas été préalablement délipidés contrairement au protocole de Olsen et *al*. En effet les acides gras libres peuvent réduire l'affinité de liaison de l'albumine quand ils sont liés à la protéine. Il nous est donc apparu important de confronter ces résultats de notre étude en mettant en place une délipidation préalable de notre albumine.

Résultats complémentaires : « Délipidation de l'albumine »

Introduction

Dans les études précédentes, de l'albumine glyquée *in vivo* purifiée à partir de plasma ainsi que de l'albumine commerciale ont été utilisées sans aucun processus de délipidation.

Cependant, dans certaines études on peut observer que l'albumine délipidée est souvent utilisée, car la HSA lie les acides-gras [226].
Nous avons donc essayé de mettre au point un protocole de délipidation de l'albumine et d'évaluer ensuite son impact sur quelques fonctions importantes de l'albumine.

Matériels et méthode

Collection des plasmas
Les plasmas sanguins provenant de sujets diabétiques ou non ont été recueillis auprès du service de biochimie du Centre Hospitalier de La Réunion (CHR- Saint-Denis) et mélangés afin d'obtenir après purification notre échantillon d'albumine *in vivo*.

Purification de l'albumine à partir de plasmas
L'albumine humaine est purifiée à partir de plasmas par chromatographie d'affinité sur du Bleu de Cibacron 3G couplé à l'agarose (Amersham), selon le protocole détaillé dans le chapitre 1.

Délipidation de la HSA plasmatique
La délipidation de la HSA, décrite par l'équipe du professeur Omar Belgacem [227] est réalisée à partir de la solution d'albumine purifiée par chromatographie selon le protocole précédent. L'albumine purifiée est lavée avec du méthanol aqueux à 5% à travers une membrane d'ultrafiltration (PMNL ou poids moléculaire nominal limite de 10 KDa). Cette étape préalable permet l'élimination des sels et d'autres contaminants de faible masse moléculaire. Ensuite, les étapes suivantes sont réalisées successivement :
- Ultrafiltration à 13 000 rpm
- Récupération de la solution et ajout d'un mélange d'éthanol froid : éther diéthylique 3:1 (v/v)
- Incubation pendant 2 h à - 25°C
- Centrifugation à 6000 rpm pendant 30 secondes à 4°C
- Le culot contenant les protéines sont remises en suspension dans une solution d'éthanol froid : éther 3:2 (v/v)
- Incubation pendant 1h à -25°C
- Centrifugation à 10 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C

Les lipides présents dans le surnageant sont éliminés et les protéines du culot sont remises en suspension dans du PBS1X.

Caractérisations biochimique, structurale et fonctionnelle

Ces différentes caractérisations ont été réalisées sur des albumines purifiées et commerciales délipidées ou non.

Caractérisations biochimiques

Dosage des amines libres

Le nombre de résidus d'amines libres est évalué après incubation de 30 min des protéines à température ambiante, en présence du réactif TNBS (acide 2, 4, 6 trinitrobenzènesulfonique). Cette quantité d'amines libres est observée après lecture de l'absorbance à 410 nm. Les résultats sont exprimés en nombre de mole d'amines libres par mole d'albumine à l'aide d'une gamme étalon réalisée avec des solutions de 0 à 200 nmol de L-Glycine.

Dosage du taux de carbonyle par ELISA

Le taux de carbonylation des albumines correspondantes est déterminé à partir d'un dosage immunoenzymatique (ELISA) direct, mis au point dans notre laboratoire, et dont le principe décrit dans nos précédentes études, repose sur la reconnaissance de la 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) fixée sur les sites carbonylés des protéines au moyen d'un anticorps anti-DNPH [29].

Dosage des groupements cystéine libre

Le dosage des groupements thiols de l'albumine permet d'évaluer le degré d'oxydation de cette protéine. Le protocole de dosage, basé sur la méthode d'Ellman [222] et largement décrit dans nos précédentes études, a été adapté ici pour l'analyse de faibles volumes réactionnels en plaque 96 puits.

Caractérisations structurales

Fluorescence du tryptophane

Des mesures de fluorescence ont été réalisées sur les différents échantillons d'albumine, afin de nous apporter des informations au niveau de la structure conformationnelle. La mesure de

l'émission de fluorescence du tryptophane a été effectuée à la longueur d'onde d'excitation de 280 nm et de 340 nm pour l'émission [224].

Fluorescence des sites hydrophobes

La fluorescence de l'acide 1-anilino-8-naphtalènesulfonique (ANSA) dont l'émission est obtenue à 440 nm avec une longueur d'onde d'excitation à 355 nm, est utilisée comme un marqueur fluorescent des sites hydrophobes de la protéine.

Caractérisations fonctionnelles

Test KRL® ou hémolyse des globules rouges

Les propriétés antiradicalaires des plasmas et des albumines sont évaluées à l'aide du test *in vitro* KRL basé sur la comparaison des cinétiques d'hémolyses des globules rouges, induites par les radicaux libres en fonction des conditions expérimentales. Ce protocole est détaillé dans les travaux précédents [60]. Pour chaque échantillon, on déterminera le temps de demi-hémolyse (HT_{50}) normalisé par rapport au HT_{50} obtenu pour une hémolyse en présence de PBS.

ORAC

La capacité antioxydante de l'albumine peut être également mesurée selon la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) décrite par Huang [228]. Ce test est réalisé par spectrofluorimétrie et consiste à mesurer la protection exercée par une molécule, ici l'albumine, contre l'oxydation de la fluorescéine par un radical libre stable, l'AAPH (2, 2'-azobis (2-amidinopropane)).

Etude des propriétés de liaison

Afin de déterminer avec précision si les modifications structurales induites par la glycation ont affecté les sites de liaison aux médicaments, nous avons étudié la capacité de fixation de du Kétoprofène® pour les différentes formes d'albumine modifiée. La méthode reposant sur le « quenching » de fluorescence induit par l'interaction avec un ligand a été utilisée pour évaluer cette affinité [188].

Activité enzymatique

L'activité enzymatique de type estérase a été mesurée par absorbance à 412 nm pour chaque échantillon d'albumine en présence du substrat *p*-nitrophényl acétate (PNPA). Ce protocole a été décrit en détail dans l'article précédent.

Résultats

Modifications biochimiques

L'évaluation du taux d'amines libres et des fonctions carbonyles sur les albumines délipidées (commerciales et purifiées) montre une légère augmentation mais non significative. Par contre le dosage d'Ellman met en évidence un nombre de mole de thiols par albumine supérieur à la valeur théorique (inférieure ou égale à 1) en ce qui concerne l'albumine purifiée délipidée **(Figure 28)**.

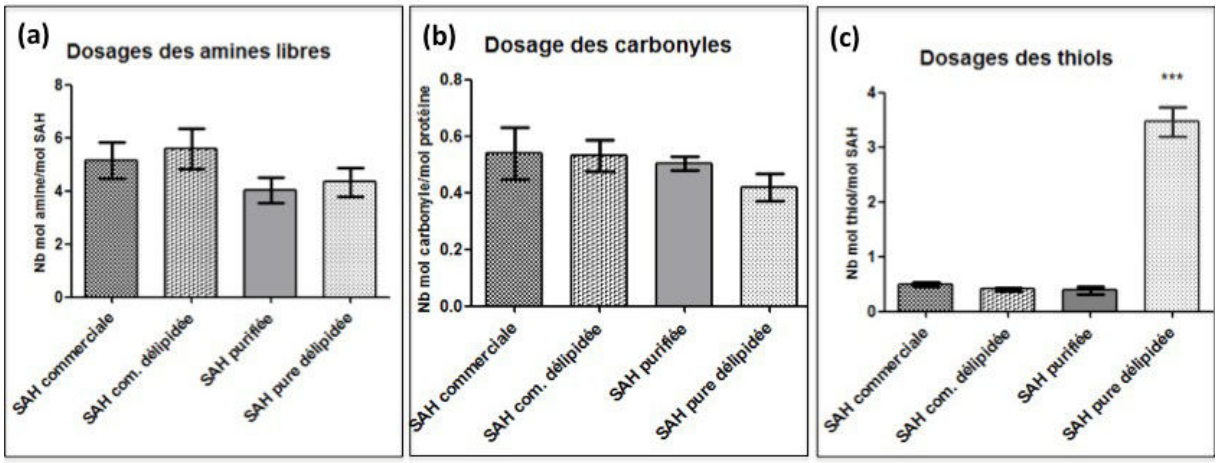


Figure 28. Evaluation biochimique de l'impact de la délipidation sur l'albumine commerciale et sur l'albumine purifiée à partir de plasma.

(a) dosage des amines libres (b) dosage des carbonyles (c) dosage des thiols selon la méthode d'Ellman. *La significativité des résultats est évaluée par le test t de Student pour séries non appariées,* par rapport à la HSA purifiée non délipidée. **** p<0.0001.*

Modifications structurales

L'émission de fluorescence du tryptophane, mesurée pour chacun de ces échantillons, met en évidence une augmentation conséquente pour les deux types d'albumine délipidée. De même, la mesure de l'émission de fluorescence de l'ANSA des différents échantillons met en

évidence un décalage vers les plus grandes longeurs d'onde (red shift) du maximun de fluorescence pour les albumines délipidés **(Figure 29)**. Si pour l'albumine commerciale ce décalage est important (environ 6 nm), pour l'albumine purifiée ce décalage est moins marqué (environ 3 nm). Les résultats suggèrent une modification conformationnelle similaire de ces protéines délipidées, qui correspond à une plus grande exposition du tryptophane et une plus forte polarité de la molécule, en l'absence de lipide lié.

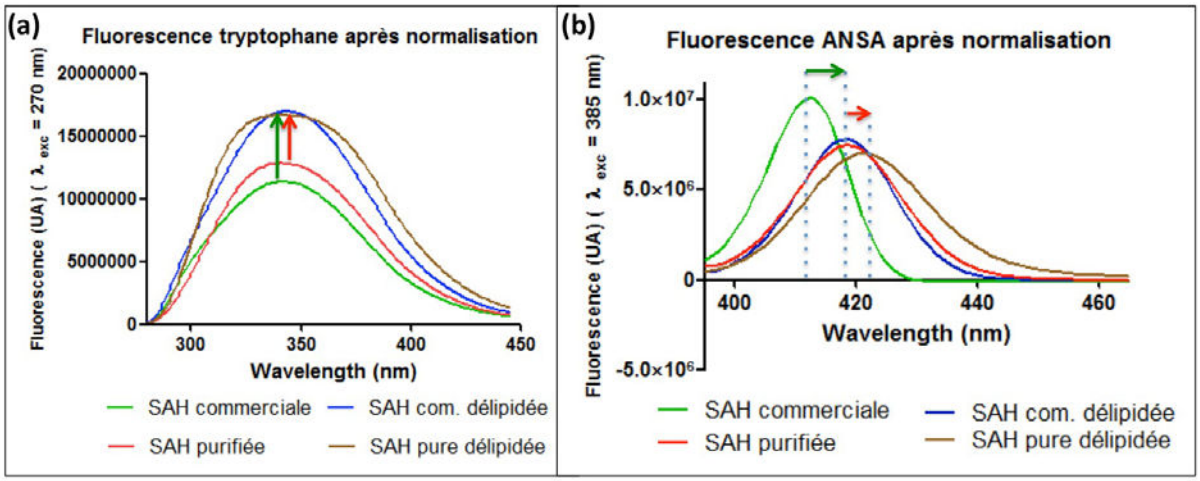


Figure 29. Mesure de la fluorescence du tryptophane (a) et de l'ANSA (b) sur des échantillons d'albumine délipidée ou non.

Modifications fonctionnelles

Les tests de l'hémolyse des globules rouges et d'ORAC n'ont pas pu mettre en évidence des différences significatives entre les albumines délipidées et non délipidées **(Figure 30)**. Par contre les résultats des propriétés pharmacologiques mettent en évidence une augmentation de l'affinité de l'albumine pour le Kétoprofène® lorsque celle-ci est délipidée.

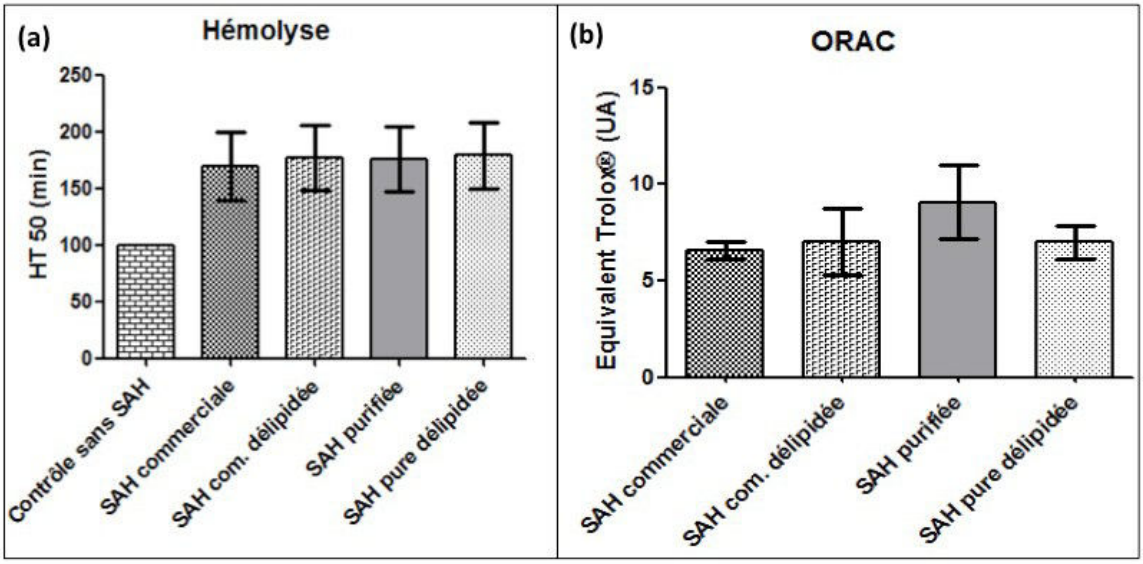


Figure 30. Evaluation de l'activité antioxydante à travers le test d'hémolyse (a) et ORAC (b) de différentes préparations d'albumines délipidées ou non.

Cette augmentation est conséquente et significative concernant l'albumine purifiée délipidée. Par contre cette délipidation ne semble pas avoir d'effet sur l'activité estérase. On observe toutefois une différence significative de cette activité entre l'albumine commerciale et purifiée **(Figure 31)**.

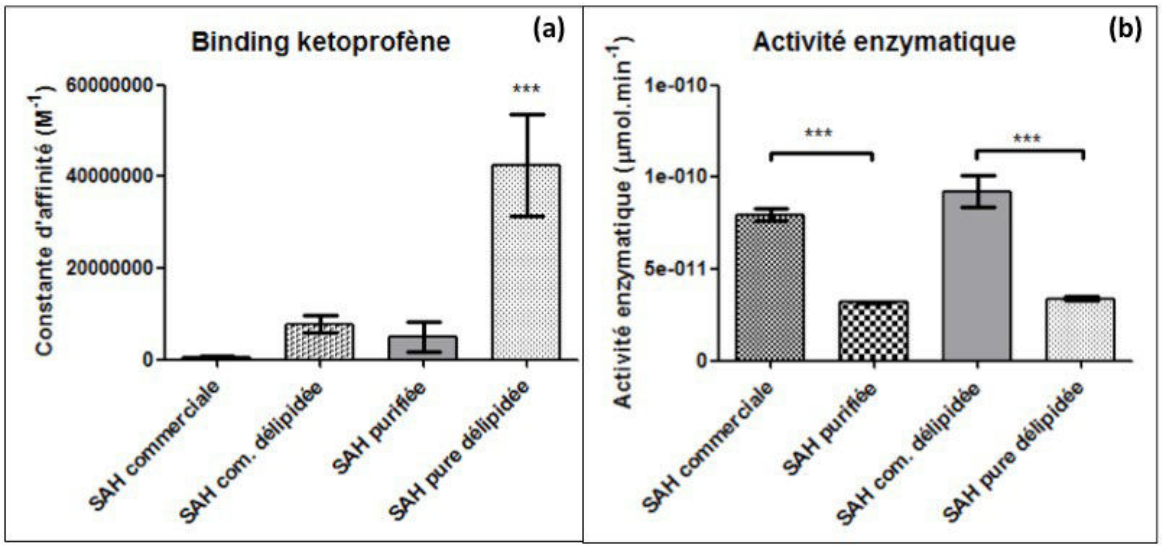


Figure 31. Evaluation des paramètres pharmacologiques de l'albumine commerciale et purifiée, délipidée ou non.

(a) Mesure de l'affinité de l'albumine pour le Kétoprofène® par la technique de « quenching » de fluorescence
(b) activité enzymatique mesurée à l'aide de la PNPA. *La significativité des résultats est évaluée par le test t de Student pour séries non appariées,* par rapport à la HSA purifiée non délipidée. *** *p<0.0001.*

Discussion

Si le processus de délipidation n'affecte pas l'intégrité de certains acides aminés (amine libres, formation de carbonyles), il semble avoir un impact sur les ponts disulfures, dans la mesure où 3 moles de SH par mole d'albumine sont mises en évidence pour l'albumine purifiée délipidée. Ces résultats laissent supposer que le processus de délipidation entraine probablement la rupture de ponts disulfures. Paradoxalement, les capacités de neutralisation des radicaux libres par les résidus cystéines, à travers les tests d'hémolyse et d'ORAC, ne semblent pas être amplifiées pour cette albumine délipidée. De même, il est clairement établi que la délipidation a un effet sur la structure tridimensionnelle, comme nous le montre les résultats des émissions de fluorescence du tryptophane et de l'ANSA.
Il est à noter que la diminution de l'émission de fluorescence du tryptophane est du même ordre de grandeur lors de la délipidation de l'albumine commerciale que pour celle mise en œuvre dans notre laboratoire. L'une des conséquences directes de ces modifications conformationnelles est l'augmentation de l'affinité de l'albumine pour le Kétoprofène®. Par contre, et en dépit de dénaturation partielle de la protéine, la délipidation ne semble pas avoir un impact sur l'activité enzymatique de type estérase de l'albumine.

Si notre protocole de délipidation provoque la rupture de ponts disulfures, l'augmentation de l'affinité de l'albumine pour le Kétoprofène® pourrait peut-être s'expliquer par la création de nouveaux sites de liaison suite à la rupture de ces ponts. Il semblerait intéressant de pouvoir approfondir cette hypothèse.

On peut en conclure que la délipidation a un impact notable sur les différents paramètres de l'albumine. A la suite de ces résultats nous avons préféré éviter une délipidation de l'albumine en suivant ce protocole pour mener nos expériences visant à mieux comprendre les effets délétères du phénomène de glycoxydation sur la structure et les fonctions pharmacologique de l'albumine glyquée *in vivo*.

Conclusion et perspectives

Ces deux études ont permis de montrer que le phénomène de glycoxydation altère l'intégrité structurale de l'albumine au niveau des résidus amines et thiols, contribuant ainsi à sa dénaturation partielle impliquant notamment les deux sites de liaisons aux médicaments, les sites I et II de Sudlow. Les conséquences directes de ces modifications sont une inhibition de l'activité enzymatique de type estérase ainsi que des propriétés de liaison de l'albumine à la Warfarine® et au Kétoprofène®. Par ailleurs, on a pu montrer que seul le processus de glycation peut-être à l'origine des dégradations des propriétés pharmacologiques de la protéine plasmatique.

Dans le cadre de la pathologie diabétique, des traitements médicamenteux comme l'insuline ou la Warfarine® s'avèrent difficiles à mettre en place. Il est possible que l'albumine joue un rôle important dans l'effet thérapeutique de ces médicaments. Il parait souhaitable de déterminer la pertinence clinique de nos résultats en évaluant l'effet thérapeutique de nos médicaments sur un modèle cellulaire, en mimant les conditions du diabète (en présence d'albumine glyquée). Cette étude pourrait être également transposée sur un modèle *in vivo* diabétique, comme par exemple un modèle animal.

En conclusion, nos différents résultats confortent l'importance d'étudier les effets biologiques que peuvent engendrer les altérations structurales et fonctionnelles dues à la glycation de l'albumine dans le cadre de la pathologie diabétique. Ces altérations nous montrent ainsi, l'importance d'étudier la pharmacocinétique des médicaments fortement liés à l'albumine chez les diabétiques.

CHAPITRE 3

ETUDE DE L'IMPACT DES METAUX SUR LA STRUCTURE ET LA FONCTION DE L'ALBUMINE GLYQUEE

Introduction

Les ions métalliques sont souvent impliqués dans le développement de pathologies neurodégénératives et métaboliques. En effet, de nombreuses études cliniques ont pu montrer un taux élevé de ces métaux (cuivre, zinc, fer …) dans le noyau et la périphérie de la plaque amyloïde sénile et également dans le tissu cortical du cerveau de patients atteints de pathologies neurodégénératives [229]. De même, de grandes quantités d'ions métalliques peuvent contribuer au développement de maladies métaboliques telles que le diabète sucré [230]. En effet, la présence d'ions peuvent induire la formation de ROS pouvant contribuer à l'apparition du diabète et d'autres maladies métaboliques [231 , 232].

Même si leurs rôles dans ces pathologies ne sont pas complètement élucidés, ils ont été décrits comme impliqués dans certaines réactions physiologiques. Les ions métalliques participent notamment aux processus d'agrégation et aux réactions d'oxydation. En effet, certains métaux comme les ions Cu^{2+} et Fe^{2+} catalysent les réactions d'oxydation de Fenton générant des radicaux libres. De plus, les ions Cu^{2+} ainsi que Zn^{2+} ont également montré un rôle promoteur dans le processus d'agrégation sous l'action d'un traitement thermique ou à froid de l'albumine bovine [233, 234].

Au sein de l'organisme, l'albumine est l'une des principales protéines pouvant lier et transporter ces métaux sous une forme non réactive. Cependant cette protéine qui est considérée comme une « éponge à oxydants » à cause de sa capacité à séquestrer des métaux, est elle-même cible principale de la glycoxydation et par conséquent très exposée au stress oxydant.

La mise en évidence d'une forte concentration de métaux, comme le cuivre et le zinc, dans la pathologie diabétique suppose que ceux-ci pourraient participer à certaines réactions dans le système circulant, comme la glycation. Cependant à l'heure actuelle, aucune donnée n'est disponible concernant l'effet potentiel de ces métaux sur la glycation de l'albumine. Le but de cette étude est donc de clarifier leurs rôles dans ce processus. Deux ions métalliques qui ont déjà montré leurs implications dans le processus d'agrégation de l'albumine ont été utilisés : le cuivre (Cu^{2+}) et le zinc (Zn^{2+}).

Etant donné le lien étroit entre le processus d'agrégation et de glycation qui a déjà été montré chez l'albumine, nous avons évalué l'effet de ces deux métaux sur différents processus que sont la glycation, l'agrégation, l'oxydation ainsi que sur l'intégrité fonctionnelle de l'albumine.

Résultats

Article 4 : « Deciphering metal-induced oxidative damages on glycated albumin structure and function »

Baraka-Vidot J., Navarra G., Leone M., Bourdon E., Militello V. and Rondeau P. Biochem Biophys Acta. general subjects (2014) 1840 1712-24.

Biochimica et Biophysica Acta 1840 (2014) 1712–1724

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagen

Deciphering metal-induced oxidative damages on glycated albumin structure and function

Jennifer Baraka-Vidot [a,1], Giovanna Navarra [b,□,1], Maurizio Leone [b,c], Emmanuel Bourdon [a], Valeria Militello [b,c], Philippe Rondeau [a,□□]

[a] Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO) EA 4516, Université de La Réunion, Faculté des Sciences, 15 avenue R. Cassin, BP 7151, 97715, Saint Denis Cedex and Plateforme CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, BP 80 005, 97491 Sainte Clotilde Cedex, Reunion Island, France
[b] Università di Palermo, Dipartimento di Fisica e Chimica, Via Archirafi 36, Palermo, Italy
[c] Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Biofisica, Via Ugo La Malfa 136, Palermo, Italy

article info

Article history:
Received 5 July 2013
Received in revised form 25 November 2013
Accepted 9 December 2013
Available online 29 December 2013

Keywords:
Glycation
Albumin
Protein aggregation
Spectroscopy
Light scattering
Metal

abstract

Background: Metal ions such as copper or zinc are involved in the development of neurodegenerative pathologies and metabolic diseases such as diabetes mellitus. Albumin structure and functions are impaired following metal- and glucose-mediated oxidative alterations. The aim of this study was to elucidate effects of Cu(II) and Zn(II) ions on glucose-induced modifications in albumin by focusing on glycation, aggregation, oxidation and functional aspects.

Methods: Aggregation and conformational changes in albumin were monitored by spectroscopy, fluorescence and microscopy techniques. Biochemical assays such as carbonyl, thiol groups, albumin-bound Cu, fructosamine and amine group measurements were used. Cellular assays were used to gain functional information concerning antioxidant activity of oxidized albumins.

Results: Both metals promoted inhibition of albumin glycation associated with an enhanced aggregation and oxidation process. Metal ions gave rise to the formation of β-amyloid type aggregates in albumin exhibiting impaired antioxidant properties and toxic activity to murine microglia cells (BV2). The differential efficiency of both metal ions to inhibit albumin glycation, to promote aggregation and to affect cellular physiology is compared.

Conclusions and general significance: Considering the key role of oxidized protein in pathology complications, glycation-mediated and metal ion-induced impairment of albumin properties might be important parameters to be followed and fought.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Protein alterations represent a growing interest in biophysical and biochemical studies, since they are strongly associated in pathologies such as neurodegenerative and metabolic diseases [1,2].

Glycation, also known as the Maillard reaction, is a slow non-enzymatic reaction that initially involves attachment of glucose or derivatives with free amine groups of protein to form reversibly a Schiff base product, leading to the formation of stable fructosamine residue (ketoamine) following Amadori rearrangement [3]. Further oxidation and rearrangement of these early stage glycation products irreversibly give rise to advanced glycated end products (AGE) [4]. The glycation process is often associated with oxidative phenomenon, called "glycoxidation", which occurs when oxidative reactions affect the early stage glycation products [5].

Protein glycation and aggregation phenomenon are closely linked since common structural and functional properties are shared by amyloid aggregate type proteins and glycated proteins. Main cellular receptors for AGEs, including RAGE, CD36, MSR-A and MSR-B, are thought to be also primary transporters of amyloid type peptides [6,7]. Besides, protein glycation process could induce the formation of several types of aggregates such as globular forms or amyloid fibrils [8–10]. Terminal glycation products are well known to be closely involved in neurodegenerative diseases by promoting amyloid deposit in brain [11]. In addition, protein aggregates can impair insulin secretion in type II diabetes mellitus and indirectly promote glycation process of main circulatory proteins [12].

In these pathologies, metal ions (mainly copper, iron and zinc) are found to be highly concentrated within the core and periphery of

Abbreviations: AFM, atomic force microscopy; AGE, advanced glycated end product; BSA, bovine serum albumin; IncBSA, bovine serum albumin incubated at 37°C; MES, 2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate buffered saline; FTIR, Fourier Transform InfraRed; ThT, Thioflavin-T

□ Correspondence to: G. Navarra, DiFC Università di Palermo, Via Archirafi 36, 90123 Palermo, Italy. Fax: +39 091 6162461.
□□ Correspondence to: P. Rondeau, GEICO, 15 Av René Cassin, France. Fax: +262 262 93 82 37.
E-mail addresses: giovanna.navarra@unipa.it (G. Navarra), rophil@univ-reunion.fr (P. Rondeau).

[1] These two authors contributed equally to this work and should be considered co-first authors.

0304-4165/$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.12.017

amyloid senile plaque and also in the cortical tissue of the brain [13,14]. Besides, high amount of metal ions can be related to diabetes mellitus and neurological disorders [15]. If the role of these ions has not been fully clarified in vivo, several evidences suggest an inhibitor or promoting action of these metal ions in the aggregation process depending on the metal/protein ratio and the metal-ion binding mode. Previous studies from our group showed a differential effect of Cu(II) and Zn(II) ions in promoting bovine serum albumin or β-lactoglobulin aggregation [16,17].

Metal ions may be present during protein glycation process and metal-catalyzed oxidation reactions have several intersections with post-translational protein modification induced by glucose. Metal ion-mediated glucose autoxidation leads to the formation of high reactive carbonyl compounds [18]. Other studies reported a promoting role of metal ions (ferric Fe^{3+} and cupric Cu^{2+}) in α-oxoaldehyde formation from early glycation products or Amadori products [19,20]. In organisms, redox-active metals are transported by proteins. Among proteins which could sequester metal in non-reactive forms, human serum albumin represents the main target protein for glycoxidation. This plasma protein could serve as a circulating depot for many drugs and also metal ions [21,22]. In parallel, albumin is sustainably and continually exposed to oxidative stresses impairing its beneficial properties [23].

Glycation of serum albumin has been widely studied in recent years and the bovine form of albumin (BSA) constitutes the most common molecular model used in glycation research field. Even if albumin is well-known to bind various cationic metals, no data are available on the effect of these metals on albumin glycation. In order to clarify the potential roles of metal on albumin glycation, we focused our study on two metal ions: copper (II) and zinc (II). The glycation process of albumin in the presence or absence of metal was monitored by using biophysical (infrared and fluorescence spectroscopy, AFM microscopy) and biochemical (colorimetric and enzymatic assays) techniques. The impact of metal ions on albumin functionality and cellular cytotoxicity was also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Non-recombinant bovine serum albumin (BSA) (cat# A9647), $CuCl_2$, $ZnCl_2$ and D-(+)-Glucose were from Sigma. AGE (BSAG samples) were prepared as previously described [24] by incubating filtered solutions of 0.4 mM BSA and 100 mM of glucose in MES (4-morpholineethanesulfonic acid) buffer (pH 7.2), under sterile conditions and nitrogen gas in capped vials at 37 °C for seven weeks. During this preparation, solution of 1 mM or 3 mM of copper ($CuCl_2$) or zinc ($ZnCl_2$) ions could be added. The proteins were dialyzed against MES buffer, pH 7.2 and stored at −20 °C. For FTIR absorption measurements, samples were washed with MES, pH 7.2, prepared in D_2O before the measurements.

2.2. Absorption and fluorescence measurements

Samples were diluted 1:60 with buffer (6.6 μM BSA). UV/Vis absorption measurements were carried out on UV-2401PC Shimadzu spectrophotometer to monitor protein concentration at 280 nm. The calculated molar absorptivity for bovine serum albumin is 46,824 $M^{-1}.cm^{-1}$ at 278 nm. Glycophore absorbance was measured at 340 nm. Spectra were corrected for scattering contribution, and normalized to metal ion absorption and to protein concentration.

Tryptophan, glycophore and Thioflavin-T fluorescence emissions were measured on our preparations (Jasco FP-6500). The tryptophan emission spectra were determined in the 280–500 nm range (270 nm excitation). AGE-related modifications were determined by measuring glycophore fluorescence at 425 nm under excitation at 345 nm. Fluorescence emission of Thioflavin-T was determined at 500 nm with an excitation at 430 nm.

2.3. FTIR absorption measurements

IR spectra were recorded by a Bruker Vertex 70 spectrometer, equipped with a MIR global light source (i.e. U-shaped silicon carbide piece). The spectral resolution was 2 cm^{-1} and the total number of scans for each spectrum was 100. All samples were placed between two CaF_2 windows, with a 0.05 mm Teflon spacer. The investigated infrared zone is the region of the Amide I. Amide I band is due to an out of phase combination of the C_O and C\N stretching modes of amide groups. D_2O solutions were used in BSA samples to avoid the spectral overlaps between Amide I band and strong absorption band of water at 1640 cm^{-1}. The main component in the Amide I region of BSA infrared absorption is located at about 1650 cm^{-1} and it is assigned to α-helices, the component at about 1680 cm^{-1} is assigned to β-turns, and the component at 1635 cm^{-1} is assigned to intra-molecular β-sheets.

2.4. Atomic force microscopy

Small aliquot (30 μl) of protein solution was loaded on freshly cleaved mica. The samples were dried overnight under nitrogen flux and imaged. The instrument used for the AFM measurements in tapping mode was a Veeco MultiMode V Scanning Probe Microscope. Etched-silicon probes with Al-coating on detector side having a pyramidal-shape tip with a nominal curvature b10 nm were used. During scanning, the 125 ±10 μm long cantilevers, with a nominal spring constant in the range of 40 N/m, oscillated at its resonance frequency (330 kHz). Height, phase and amplitude error images were collected by capturing 512 × 512 points in each scan, and the scan rate was maintained below 1 line per second. The worsening of the tips was monitored by using a test pattern before and after every measurement session.

2.5. Biochemical characterizations

Fructosamine was determined using the method developed by Johnson et al. [25] with the nitroblue tetrazolium (NBT) reagent and following a protocol described in a previous study [26]. 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 is a sensitive method for determining the primary free amino groups in proteins [27] and was described in a previous study by our group [28]. Various concentrations of L-glycine (10 to 200 nmol) were used as standards.

Thiol groups in native, modified albumin were measured by Ellman's assay using 5, 5′-dithiobis, 2-nitrobenzoic acid (DTNB) [29] as described previously [24]. A standard curve was performed for each assay and used various concentrations of L-cysteine (10 to 100 nmol) (Sigma). The content of thiol groups for each BSA sample was measured in duplicate on two different quantities of BSA by reading the absorbance at 412 nm. Results were expressed as the number of free \SH groups per mol of BSA. Aggregative modifications of glycated albumin samples in the presence or absence of metal were analyzed by native and SDS-Polyacrylamide Gels (12% of acrylamide) and stained by Coomassie blue according to Laemmli's method [30]. Level of carbonylation of proteins was determined by spectrophotometric assay based on recognition of protein-bound DNPH in carbonylated proteins with an anti-DNP antibody [31]. 200 μg of protein lysates was precipitated and suspended with 0.5 ml of DNPH solution (0.2% in 2 M HCl). Samples were incubated at room temperature for 10 min and precipitated in 10% TCA solution before centrifugation (2000 g for 2 min). Extraction of free DNPH from suspended pellets was performed with 3 successive washes with ethanol–ethyl acetate solution (50:50). Then dried protein pellets were dissolved in a 200 μl guanidine solution (6 M in 500 mM KCl pH 2.5). The absorbance

of protein samples was measured at 276 nm and 370 nm for protein and carbonyl contents, respectively. Carbonyl was expressed as mol carbonyl/mol protein and determined by the following formula:

$$\text{Carbonyl}(\text{mol})/\text{protein}(\text{mol}) = \frac{(DO_{370}) * \varepsilon_{M\,276\,protein}}{(DO_{276} - 0.43 * (DO_{370})) * \varepsilon_{M370hydrazone}}$$

In previous formula $\varepsilon_{M276\ protein}$ equals 46,824, molar absorptivity of BSA and $\varepsilon_{M370\ hydrazone}$ equals 22,000, molar absorptivity of the hydrazone [32].

2.6. Antioxidant properties of BSA samples

2.6.1. KRL or red blood hemolysis test

Each well of a 96 well-plate was filled with 100 μl (about 1.10^8 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. Hemolysis was 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 (HT_{50} in min).

2.6.2. ORAC test

The ORAC assay using fluorescein as the fluorescent probe measures the antioxidant capacity of samples to protect fluorescein from AAPH-induced oxidative damage. This method was described in detail in a previous study from our group [33]. The automated ORAC assay was carried out on an Infinite M200 pro spectrofluorometric analyzer (TECAN) at excitation and emission wavelengths of 485 nm and 530 nm, respectively. The reaction was carried out in phosphate buffer (75 mM, pH 7.4) containing each albumin sample (25 μl) in six replicates and fluorescein solution (80 nM, 150 μl). Trolox solutions at different concentrations (6–50 μM) were used as calibration standards. The fluorescence kinetics of fluorescein was followed for 1 h at 37 °C after adding automatically AAPH solution (150 mM, 25 μl) 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 determined. The antioxidant activity (ORAC value) of samples was calculated by using trolox calibration standards as follows:

$$\text{ORACvalue} = \frac{(AUC_{sample} - AUC_{blank})}{(AUC_{Trolox\,50\,\mu M} - AUC_{blank})} * ([Trolox]/[Sample])$$

Results were expressed as Trolox equivalent (μM) per μM of BSA.

2.7. Cell culture of BV2 microglia cells

Mouse BV2 microglia 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% CO_2 incubator at 37 °C. BV2 cells were cultured 24 h in a 96-well plate (10,000 cells/well) with 200 μl DMEM containing 1% FBS (for MTT and DCF-DA assays) or in a 6-well plate (300,000 cells/well) with 2 ml DMEM containing 1% FBS (for direct cells count, TNF-α ELISA and annexin V-FITC and PI staining) and treated with modified albumin samples (50 μM) or only MES buffer (control).

2.8. MTT assay on BV2 cells

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 on BV2 cell proliferation [34]. After overnight cell incubation, 20 μl of the MTT dye (5 mg/ml) was added into each well followed by 4 h of incubation. After discarding media, 150 μl of dimethylsulfoxide (DMSO) was added into each well and plates were agitated in the dark for 30 min to solubilize dark blue formazan crystals. Absorbance was read at 595 nm wavelength. A well containing medium alone (no cell and no treatment) was used for zeroing absorbance.

2.9. Viable cell count

FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson) was used for the relative counting of viable BV2 cells. Equal amounts of FITC labeled beads (CaliBRITE FITC-beads, 5 μm; BD Biosciences) were added to each cell suspension just before the FACS-analysis. An electronic gate was set to count the FITC-labeled beads. All BV2 cell and FITC-bead events were recorded, and when the number of counted FITC-labeled beads reached 2000, the counting process was stopped. A particular cell population was selected by gating and was identified by its typical location in a FSC v. SSC graph. Results were expressed as the percentage of cells with respect to the control (BV2 treated with BSA).

2.10. Intracellular ROS formation

After 24 h of treatment, cells were washed twice with PBS, and incubated with 10 μM dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA) during 30 min at 37 °C. Then, cells were washed with PBS and DCF fluorescence was measured at 492 nm (excitation) and 520 nm (emission). Fluorescence values were calculated after background subtraction (identical conditions without DCFH-DA) and normalized by cell count. Results were expressed as the percentage of DCF fluorescence with respect to the control.

2.11. Apoptosis and necrosis

After treatment BV2 cells were collected, washed with PBS and incubated with 2 μg/ml Annexin V-FITC (BioLegend) and 2 μg/ml PI (Sigma) in 100 μl binding buffer (BioLegend) for 15 min at RT and were analyzed using FACScan (BD Biosciences) and CellQuest software. Similarly to the viable cell counting, a particular cell population was selected by gating and was identified by its typical location in a FSC v. SSC graph.

2.12. IL-6 secretion

The proinflammatory cytokine IL-6 secretion in BV2 media after 6 h of treatment in the presence of modified albumin samples (20 μM) was quantified using a Human IL-6 ELISA Kit (eBioscience). Results are expressed in pg secreted IL-6 per mg cellular proteins.

2.13. Copper binding affinities of albumin

The level of copper ions bound to albumin can be measured spectrophotometrically using bathocuproinedisulfonic acid (BC, Fluka #11870) [35,36]. The protocol is well described in a previous study [26]. The affinity of albumin for copper was also determined by fluorescence. This method is based on the quenching of albumin fluorescence induced by its interaction with metal [37]. The intrinsic fluorescence of bovine albumin is mainly attributed to the tryptophan residues. Different series of assay solutions were prepared by mixing 10 μM of native or modified BSA with copper chloride at concentrations ranging from 5 to 100 μM. Each solution was incubated for 5 min at 25 °C and transferred into a quartz cell. The fluorescence spectra were recorded in the range of 250–500 nm under excitation at 283 nm. The binding parameters (i.e. the binding constant K_A and the binding site number n) for copper were obtained from the following equation [38]:

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

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

2.14. Fluorescence data process and statistical analysis

For each fluorescence spectrum, the zeroth (M_0) and the first (M_1) moments of the spectral distribution A (E) were calculated from the experimental data, after subtracting the tangent to the minima of each band, according to the following formula [39]:

$$M_0 = \int_{-\infty}^{\infty} A(E)\,dE \qquad M_1 = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} E \cdot A(E)\,dE}{M_0}$$

M_0 measures the integrated intensity and M_1 is the mean value of the emission energy and measures the position of the band.

Biochemical data were expressed as the mean ± standard deviation (SD) from a minimum of three experiments. Statistical significances were determined using one-way ANOVA (followed by the Tukey's test).

3. Results

Preparations of native (BSA) or glycated albumin (BSAG) incubated with or without X mM of Zinc (Zn) (X = 1 or 3) were labeled XZnBSA or XZnBSAG. The same nomenclature was used for cooper (Cu)-treated samples. Different glycated BSA samples incubated in the presence or absence of metal ions were analyzed in order to determine the impact of metals on albumin structure, conformation, morphology and functionality during protein glycation process.

In order to analyze metal ion impact on the protein glycation extent, absorption measurements were performed on all albumin preparations after their incubation for seven weeks at 37 °C. An increase in the absorption band at around 300–380 nm reflects protein glycation as this spectral range is attributed to the glycophore absorption [40]. On Fig. 1a, we show normalized spectra of samples in order to compare the different glycation extents. Albumins incubated with only glucose (BSAG) or combined with 3 mM $ZnCl_2$ (3ZnBSAG) gave rise to the more glycated samples, while heated albumin (IncBSA) was not characterized by any absorption contribution in this spectral range. In contrary to 1CuBSAG sample which exhibits a low absorption at about 340 nm suggesting a low small formation of AGE products, 3CuBSAG sample revealed to have not any glycophore. These data are in accordance with those obtained by fluorescence spectroscopy at 425 nm emission wavelength (Fig. 1b) and show that the efficiency of glycation process decreased in the presence of copper ions. The presence of zinc, at any concentration, caused a slight decrease in the glycation extent.

Due to their high nucleophile properties, lysine and arginine are the sole residues prone to glycative modification in the presence of glucose [5]. As featured in Fig. 1c, native albumin exhibits about 33 free amine residues. Glycation in the absence or presence of metal ions induced a similar reduction in free amine groups (about −22% vs. BSA, p b 0.01). This reduction was more marked for 3CuBSAG and 3ZnBSAG (about −36% vs. BSA, p b 0.001).

In accordance with glycophore data, fructosamine early glycation product was also reduced by the presence of metal ions (Fig. 1d). Fructosamine levels (mol/mol of BSA) were totally reduced by copper and partially by zinc ions in glycated BSA samples.

Structural modifications associated with glycoxidation, in particular the tertiary structure conformation were studied by tryptophan fluorescence measurements. The fluorescence spectra featured in Fig. 2a, show a typical band at about 340 nm (λ_{ex} = 270 nm) attributed to the tryptophan residue fluorescence contribution (Trp 134 and Trp 214 in BSA).

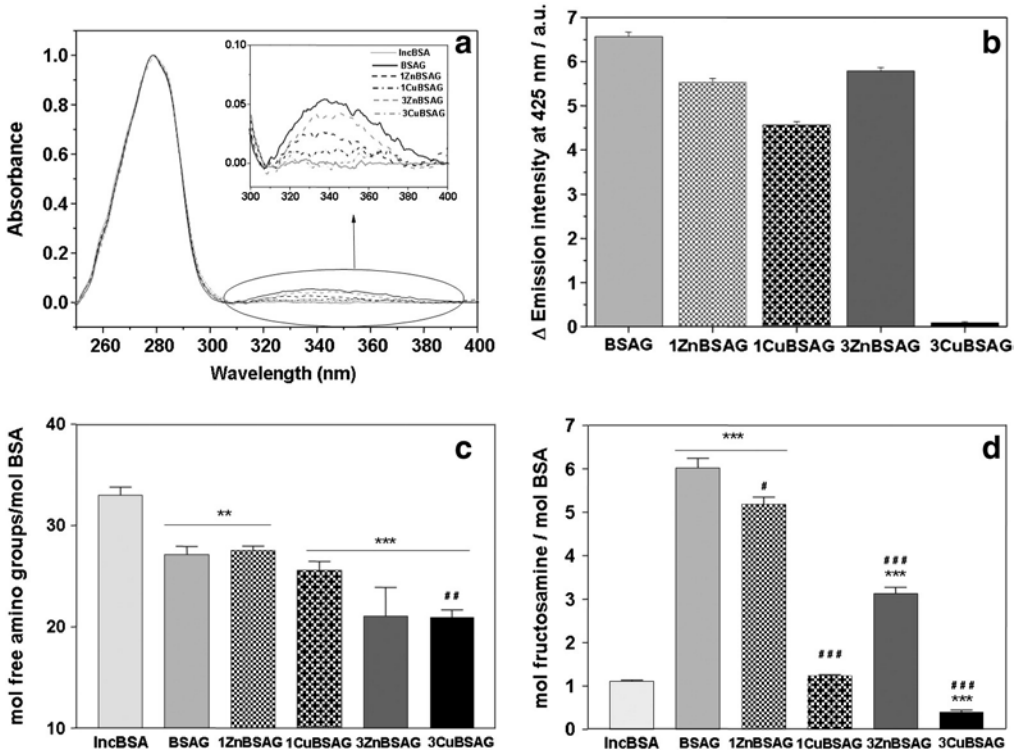


Fig. 1. Involvement of metal in glycation process. a) Normalized absorption spectra of IncBSA (gray continuous line), BSAG (black continuous line), 1ZnBSAG (black dashed line), 3ZnBSAG (gray dashed line), 1CuBSAG (black dashed and dotted line), 3CuBSAG (gray dashed and dotted line); b) Glycation extent determined by glycophore fluorescence intensity measurement (λ_{Em} at 425 nm, λ_{Ex} at 345 nm) in different glycated samples in respect to the emission intensity measured for nonglycated sample (IncBSA); c) Unmodified primary amino group content in proteins by TNBS assay; d) Fructosamine levels obtained with the NBT assay; Histogram data are expressed as means ± SD of three independent experiments. □ Effect of copper or zinc in BSA glycation (vs. BSAG): □□□p b 0.001, □□p b 0.01, □p b 0.05.

In comparison with fluorescence spectra of native (not reported) and of incubated albumin (IncBSA), all modified albumins underwent a differential quenching of tryptophan fluorescence as a consequence of protein incubation with glucose. The decrease in fluorescence suggested different tertiary structure modifications associated with an increase in tryptophan exposure to the solvent amplified in the presence of metals. These results indicated also that conformational changes could be attributed to the simultaneous presence of glucose and metal. The decrease in the intensity may be attributed to BSA glycoxidation, protein partial unfolding and aggregation process, as well. Moreover, the normalized fluorescence spectra featured in Fig. 2b revealed that fluorescence quenching was associated with modification in the position of the maximum band. Indeed, as indicated by the black arrow, a relative blue-shift of tryptophan glycophore (until 10 nm) was observed for 1CuBSAG, 3ZnBSAG and 3CuBSAG. A blue-shift is typically due to a less polar environment for both tryptophans and, when associated to a reduction of the band width, it has also been attributed to the formation of more tightly packed structures. Even if both metals have the same chemical valence, they differently affected the tertiary structure. In the presence of 1 mM of zinc (II) no shift was revealed, while copper (II) at the same concentration induced a blue-shift for the fluorescence. Analysis of momentum 1 (M1) relative to the tryptophan emission for different albumin samples is reported in Fig. 2c. Quite similar blue-shifts were observed for IncBSA, BSAG and 1ZnBSAG. Progressively higher M1 values observed for 1CuBSAG, 3ZnBSAG and 3CuBSAG suggested a less polar environment for tryptophan as a consequence of the important conformational changes of protein in the presence of copper(II) or zinc(II) potentially associated with aggregation process [41].

The impact of glucose and metal on the secondary structure of BSA was investigated by FTIR spectroscopy and corresponding spectra in the region of the Amide I band are reported in Fig. 2d. The comparison between native (BSA, circle symbol) with incubated albumins (IncBSA and BSAG, continuous lines) indicated that the sole incubation at 37 °C induced an increase of intramolecular β-sheet and β-turn structures. The similar Amide I profile observed for incubated BSA and BSAG indicated that glycation process in the absence of metal ions did not induce any protein secondary structure modification. This result is in full agreement with previous observations from our group [28]. The presence of metal ions during albumin incubation and glycation mitigated the modifications of the secondary structure caused by heating. Indeed, 1ZnBSAG, 1CuBSAG, 3ZnBSAG (not reported) and native BSA (BSA in Fig. 2d) spectra resulted overlapped. A meaningful difference was noticed for 3Cu-BSAG sample. The respective Amide I band featured a marked shoulder at about 1619 cm^{-1} due to intermolecular β-sheet structure contribution [41]. This result indicates that, in the presence of glucose and 3 mM of copper (II), the aggregation process of BSA prevailed on its glycation, as attested by the absence of absorption at 340 nm and glycophore emission at 345 nm.

The aggregative state of the samples was monitored by measuring the Rayleigh scattering peak at 270 nm excitation wavelength. The saturation of scattered intensities relative to 3ZnBSAG and 3CuBSAG samples observed in Fig. 3a reflected the formation of large aggregates. At lower metal concentrations (1 mM), glycated albumin samples gave similar values of scattered light markedly higher than those obtained for BSAG and BSA. The native and SDS-PAGE electrophoresis profiles of BSA samples corroborated these results (Fig. 3b). The retardation of protein bands was observed in SDS-PAGE profiles for glycated albumin. The increase of apparent molecular masses probably resulted from bound glucose unit and/or aggregative process. The native PAGE profiles showed the disappearance of band relative to the dimeric form of glycated BSA in the presence of copper probably in favor of very high molecular weight oligomers (not visible in the gel).

These results revealed the involvement of both metal ions in the promotion of supramolecular aggregates during albumin incubation. This

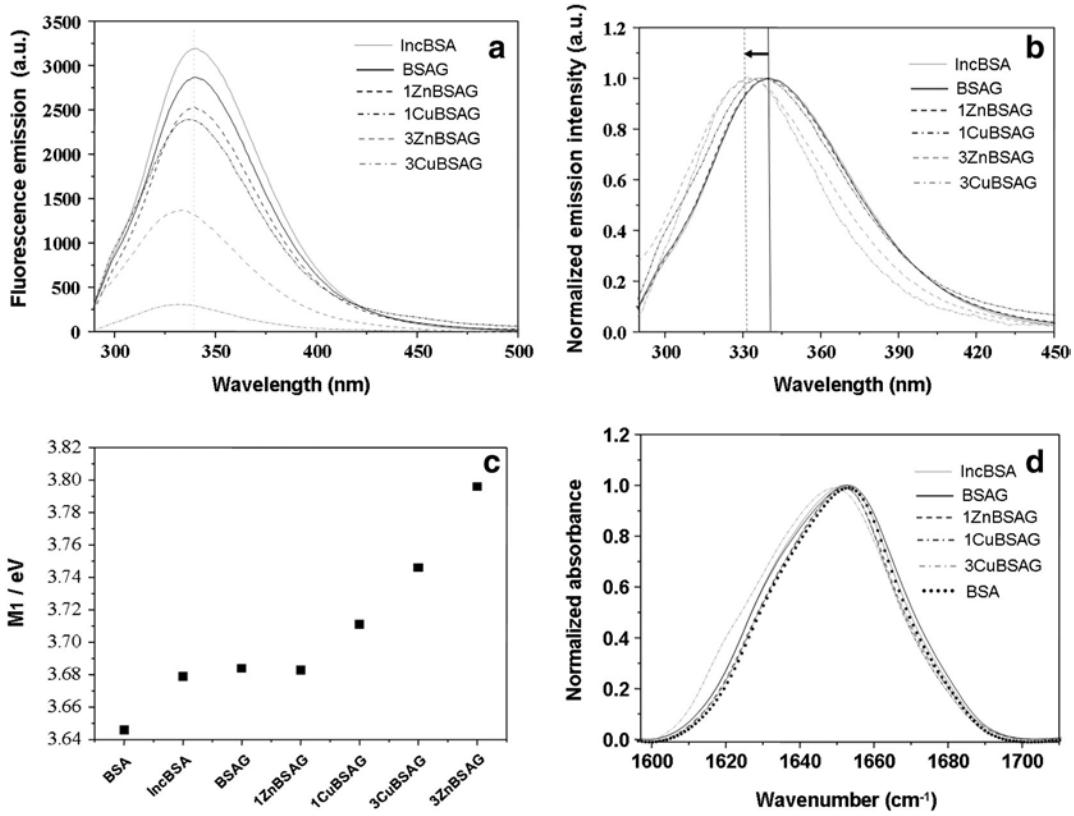


Fig. 2. Contribution of metal in BSA unfolding. a) Fluorescence spectra of tryptophan (λ_{Ex} = 270 nm) of IncBSA (gray continuous line), BSAG (black continuous line), 1ZnBSAG (black dashed line), 3ZnBSAG (gray dashed line), 1CuBSAG (black dashed and dotted line), 3CuBSAG (gray dashed and dotted line); b) Normalized fluorescence spectra of tryptophan with excitation wavelength at 270 nm of BSA samples above listed; c) momentum 1 (M1) for the tryptophan band in the different BSA samples; d) Normalized FTIR absorption spectra of BSA samples above listed and native BSA (circle symbol). All measurements were made at room temperature after heat treatment of the protein solutions at pH 7.2.

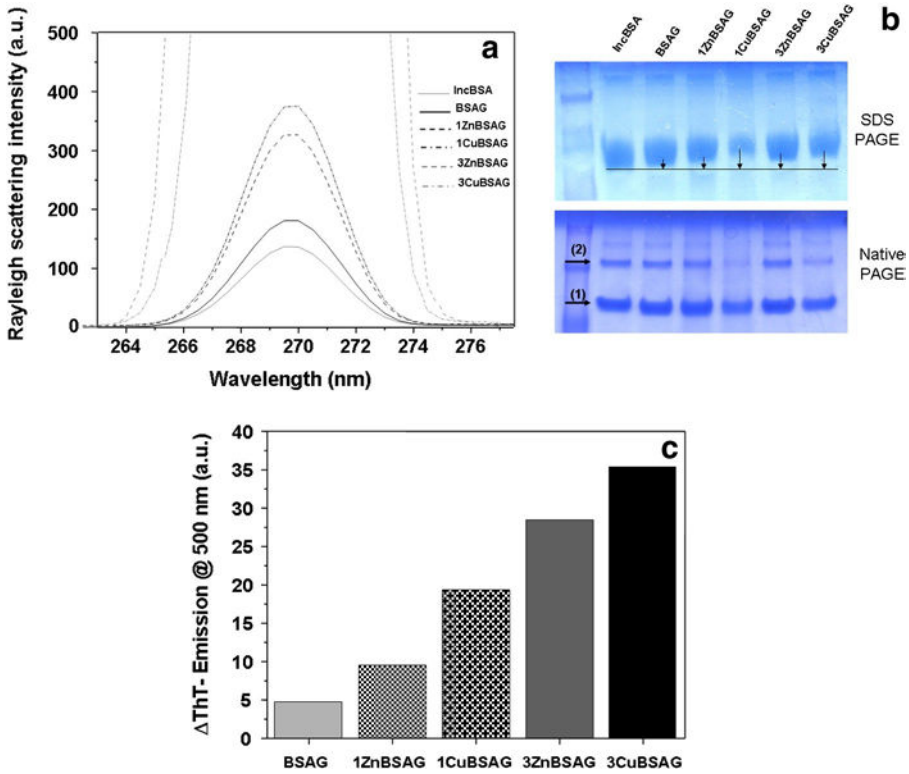


Fig. 3. Differential contribution of metal in aggregation process. a) Rayleigh scattering peak made at room temperature and pH 7.2 for IncBSA (gray continuous line), BSAG (black continuous line), 1ZnBSAG (black dashed line), 3ZnBSAG (gray dashed line), 1CuBSAG (black dashed and dotted line), 3CuBSAG (gray dashed and dotted line); c) Coomassie staining of BSA samples separated by SDS-PAGE and native-PAGE electrophoresis (12%). Arrows (1) and (2) indicate the localization of monomeric and dimeric forms of BSA, respectively; c) ThT emission (λ_{Em} at 500 nm, λ_{Ex} at 430 nm) in different glycated samples in respect of the emission intensity measured for not glycated sample (BSA).

experimental evidence is in perfect agreement with previous observations which revealed a higher promoting effect of zinc, compared to copper, in BSA aggregation [16,17].

Measurements of Thioflavin-T (ThT) fluorescence in BSA samples were performed in order to gain further insights into the presence of fibrillar structures (Fig. 3c). The increasing interest on this molecule is revealed by several recent studies dealing on ThT–fibril interaction [42–45]. Emission fluorescence of ThT at 500 nm progressively increased in the presence of growing concentration of metal ions during albumin incubation with glucose. These results attest that fibrillar

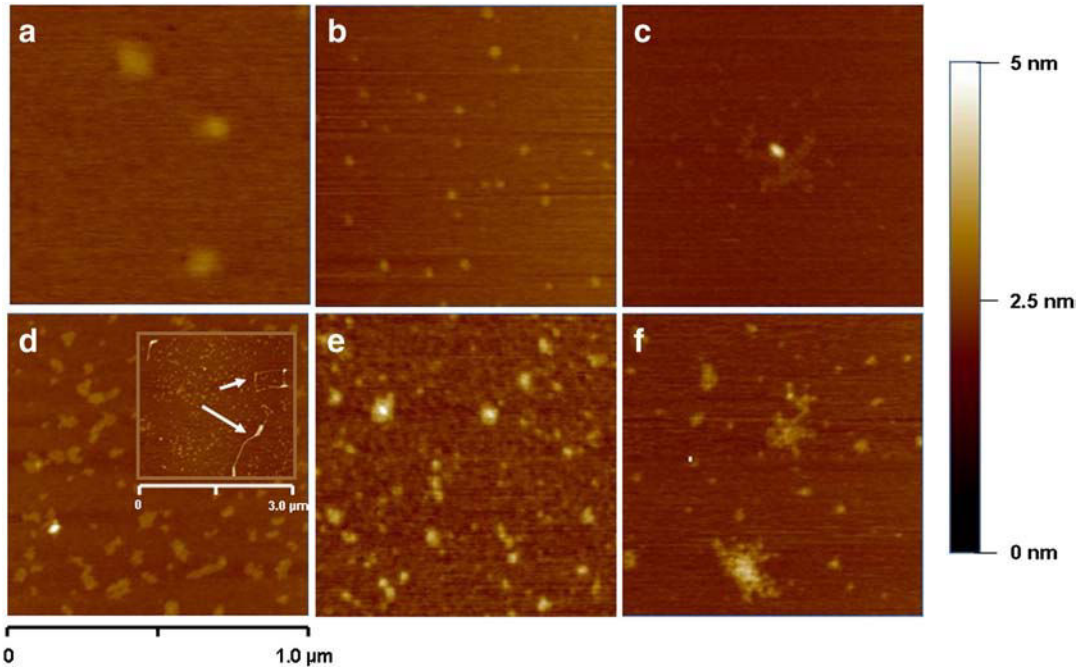


Fig. 4. Observation of BSA samples by atomic force microscopy. AFM images (height data) of a) IncBSA; b) BSAG; c) 1ZnBSAG; d) 3ZnBSAG; e) 1CuBSAG and f) 3CuBSAG. The scale bar equals 1 µm. Color scale represents height up to 5 nm.

structure growth was promoted by metal ions in solution, with a higher efficiency for copper.

Atomic force microscopy (AFM) was used to observe modification in morphology and particle size of glycated protein in the presence and absence of free metal ions during incubation process. As can be seen in Fig. 4a, BSA aggregates exhibited globular morphologies with average 80–100 nm diameter. BSAG sample exhibited lower size (20–40 nm) oligomers probably due to glucose bound to protein molecules preventing the aggregation process (Fig. 4b). This is in agreement with our previous results reporting the effects of glycation on albumin propensity to form aggregates [22]. A shown in Fig. 4c and d, the presence of zinc led to larger aggregate formation. These aggregates, which increased in number and size with metal concentrations, appeared to be globular and amorphous types with the presence of some fibrils long up to few microns (inset of Fig. 4d). This last observation is in accordance with the increase of ThT fluorescence previously shown. Compared to zinc, copper led to the formation of BSA aggregates exhibiting linear and supramolecular morphology (Fig. 4e and f). In agreement with the Rayleigh scattering peak results, BSA aggregates formed during protein glycation in the presence of copper were bigger but less numerous than those formed with zinc.

Glycation process is commonly associated with the phenomenon of oxidation affecting the early stage glycation products. The presence of metal, particularly copper, could amplify protein oxidation. Redox state in BSA samples was investigated by assessing free thiol group content and carbonyl level (Fig. 5a and b). As expected, a significant decrease in free thiol groups was measured following the sole incubation at 37 °C of IncBSA (−10% vs. native BSA, p b 0.01) or the combined incubation and glycation processes for BSAG (−34% vs. native BSA, p b 0.001). Copper induced a more drastic decrease than zinc probably contributing to an oxidation process to the detriment of glycation. Accordingly to thiol results, levels of protein carbonyls for all albumin samples evidenced a higher oxidation for glycated BSA strongly increased in the presence of copper or 3 mM of zinc.

After determining that glycated albumin could be highly oxidized or aggregated in the presence or absence of metal ions, we investigated the functional integrity and cytotoxicity of these samples. Albumin is a well-known antioxidant [23]. The intrinsic capacity of albumin to protect erythrocytes from free radical-induced hemolysis was evidenced by a higher hemolysis half-time (HT_{50}) for IncBSA (+47.3% vs. MES, p b 0.05) (Fig. 6a). This protective effect of albumin is a bit strengthened with glycation and in the presence of copper or zinc ions. This increase in BSA antiradical properties could not be ascribed to the sole scavenging properties of Cys 34 which appeared to be highly oxidized in glycated samples. If the strengthened antiradical properties of CuBSAG samples are also noticed in the ORAC test (+47.8%, vs. BSA, p b 0.01), these properties were rather impaired in the presence of zinc (−60.5%, vs. BSA, p b 0.001) (Fig. 6b). These conflicting results show that several tests are necessary to assess the overall antioxidant capacity of the protein.

The involvement of microglia in neurodegenerative process of diseases was evidenced in many studies using BV2 microglia cell line [46,47]. The effect of BSA samples on BV2 cell viability was evaluated by using MTT assays and FACS. As shown in Fig. 7a, the MTT values decreased significantly after 24 h incubation with 1CuBSAG (−25.4% vs. BSAG, p b 0.05) and with 3CuBSAG (−53.6% vs. BSAG, p b 0.001). Zn (II) ions gave rise to the formation of highly toxic aggregates in microglia cells only for 3ZnBSAG (−62.7% vs. BSAG, p b 0.001). Similarly to MTT results, the direct cell count showed a significant decrease in the number of viable BV2 cells when incubated in the presence of 3ZnBSAG (−93.6% vs. BSAG, p b 0.01) or 3CuBSAG (−88.9% vs. BSAG, p b 0.01).

Analysis of apoptosis and necrosis in BV2 cell using Annexin-V and PI staining showed no increase in apoptotic nor necrotic cells above background levels for BV2 treated with BSA or BSAG (Fig. 8). The presence of copper in BSAG samples resulted in elevated necrosis level in BV2 cells (+14.3% for 1CuBSAG) while early apoptosis (+35.7%), late apoptosis (+29.2%) and necrosis (+25%) were observed for microglia cells treated with 3CuBSAG. In the presence of 3ZnBSAG, BV2 cells were rather apoptotic (71.3%) with a majority of early apoptotic cells (49.5%) in comparison with the control (BSA). The oxidative state of BSAG samples could play a role in the inhibition in microglia cell proliferation. Intracellular ROS generation was assayed by using DCF-DA fluorescent probe (Fig. 9a). As expected, a significant intracellular ROS increase was observed in microglia treated with CuBSAG (+97% vs. BSAG, p b 0.01) or with 3ZnBSAG (+151% vs. BSAG, p b 0.001). If oxidative stress could contribute to affect cellular viability, we can also hypothesize a pro-inflammatory action of our BSA preparations. However, as shown in Fig. 9b, only 1ZnBSAG induced a significant increase in IL-6 secretion by microglia cells.

Our results suggest that copper ions exert inhibitory action on glycation, fibrillar aggregation and oxidation processes. In order to get further insights into copper action, we investigated whether the presence of glucose could impact the affinity of albumin for this metal. Affinity was measured by using a spectroscopic method based on tryptophan fluorescence quenching of albumin. The maximum fluorescence intensity of native albumin at 337 nm, decreased with increasing concentrations of $CuCl_2$ (Fig. S1 see supplementary data) and this is probably because copper ion acts as fluorescent quencher via interactions with the protein. Conversely, zinc ion did not induce any change in quenching of tryptophan fluorescence (data not shown). Hence, this spectroscopic method is not suitable for investigating albumin affinity for zinc. The log plots $((F_0 - F_C) / F_C)$ of BSA_{G0}, BSA_{G25} and BSA_{G100} versus concentrations (log(C)) of copper are shown in Fig. 10a. These plots exhibit a good linearity with the correlation coefficients (r) above 0.957 (Table 1). The numbers of binding site n and the binding constants K_A, listed in Table 1 were calculated using these lines. The binding site n

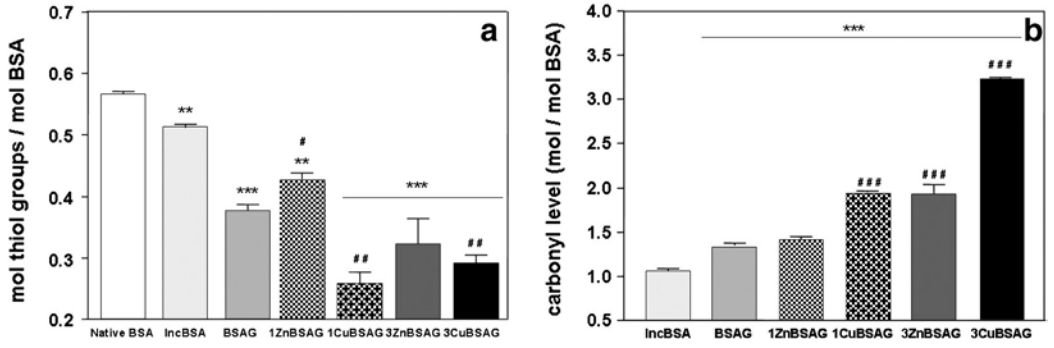


Fig. 5. Effect of metal on BSA oxidation. a) Free thiol group content as assessed by the Ellman's method; Native BSA is albumin not subjected to incubation at 37 °C for 7 weeks. b) Carbonyl level in BSA samples expressed as mol of carbonyl/mol of BSA and assessed by Levine's method. Histogram data are expressed as means ± SD of three independent experiments. □ Effect of incubation and/or glycation (vs. native BSA): □□□p b 0.001, □□p b 0.01. # Effect of copper or zinc in BSA glycation (vs. BSAG): ###p b 0.001, ##p b 0.01, #p b 0.05.

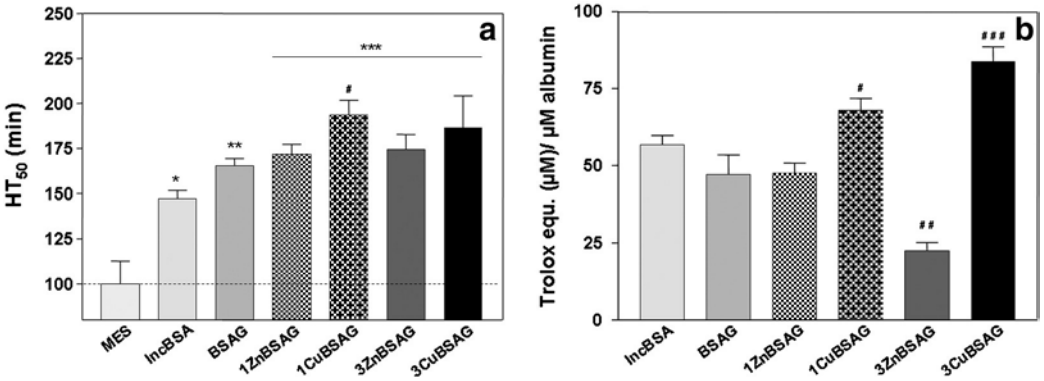


Fig. 6. Differential effect of glycated albumin in two in vitro free radical-scavenging activity tests: a) antioxidant activities were assessed by the free radical-mediated blood hemolysis test. Histograms represent half-time hemolysis (HT_{50} in min) expressed as means ± SD of four independent experiments. The dotted line allows comparison with control (MES). b) Antioxidant properties of BSA samples were assessed using the ORAC test. Histograms represent Trolox equivalent (μM) per albumin (μM) expressed as means ± sd (n = 5). □ Effect of albumin samples in erythrocytes (vs. MES): □□□p b 0.001, □□p b 0.01, □p b 0.05. # Effect of copper or zinc in glycated BSA samples (vs. BSAG): ###p b 0.001, ##p b 0.01, #p b 0.05.

and log K_A correspond to the slope and to the intercept, respectively. BSA affinity for copper increased following protein glycation extent. This suggests a structural modification for albumin incubated with glucose allowing a better binding of metal to the protein. This higher affinity could be explained by the increase in the number of binding sites (from 1.1 to 1.7). Accordingly to this data, the levels of copper bound to BSA samples (mol/mol of BSA), given in Fig. 10b, showed an increase following glycation. Levels of copper bound to the protein incubated for 7 weeks in the presence or absence of glucose were assayed by the same colorimetric method. As shown in Fig. 10c, copper ions were more likely to bind BSA when incubated with glucose.

4. Discussions

Serum albumin plays important roles in the transport of many metabolites including trace metals. If specific concentrations of these metals are required for normal physiological functions, abnormal quantity could impact health conditions. For instance, Zn(II) and Cu(II) metabolism and concentrations could have a deleterious impact in diabetes development [15,48]. Cu(II), concentrations in blood serum were reported to be significantly higher in NID diabetes mellitus [49]. In addition, treatment with a copper chelating agent could consequently reduce insulin resistance and improve glucose intolerance. In addition, plasma concentration of Zn(II) appears to be lower in diabetic patients than in healthy subject and a treatment with Zn(II) exhibited beneficial effects in this disease [50]. Besides, numerous studies evidenced an alteration in zinc metabolism in diabetes [48,51]. For instance, an in vitro study showed that zinc depletion increases insulin vulnerability to free radical-induced oxidation [52]. Circulating albumin glycation and resulting AGE formation represent typical features of diabetes pathology in which high affinity metal ions such as copper or zinc could be involved. These metal ions could potentially affect glycation and AGE formation by taking part in complex formation with amino acids [53]. Thus, the study of Zn(II) and Cu(II) impacts on the glycation process of circulating proteins is of utmost importance.

The aim of this study was to assess the role of Zn(II) and Cu(II) in the structural modification of BSA by focusing on the glycation, aggregation and oxidation aspects. The main results indicated that both metals exert an inhibiting action in glucose-induced BSA glycation in a concentration dependent manner. Also, copper ions appear to act as a more efficient inhibitor in glycation process than zinc. Indeed, Cu(II) ions are able to reduce glycation (Amadori products) by a maximum of 94% while reduction reaches 48% with Zn (II) ions. There is no available evidence about the role of metals in albumin glycation in vivo, but a study reported the inhibitory effect of zinc in glycation of other proteins such as hemoglobin [50]. Increase in albumin glycation is commonly associated with a reduction of free amino groups such as lysine or arginine, which represent the main available glycation sites [5]. The results presented here reveal that attenuation of glycation induced by metals is not automatically associated with an increase in free primary amino groups in protein. Modification of these primary amino groups could be attributed to a parallel process including aggregation or oxidation initiated by the presence of both metal and glucose. Indeed, the presence of metal ions differently induces albumin aggregation during glycation. Both Cu(II) and Zn(II) promoted the aggregation process during glycation and induced aggregate formation exhibiting different morphologies depending on the nature and concentration of the metal. The important BSA unfolding in the presence of copper/glucose

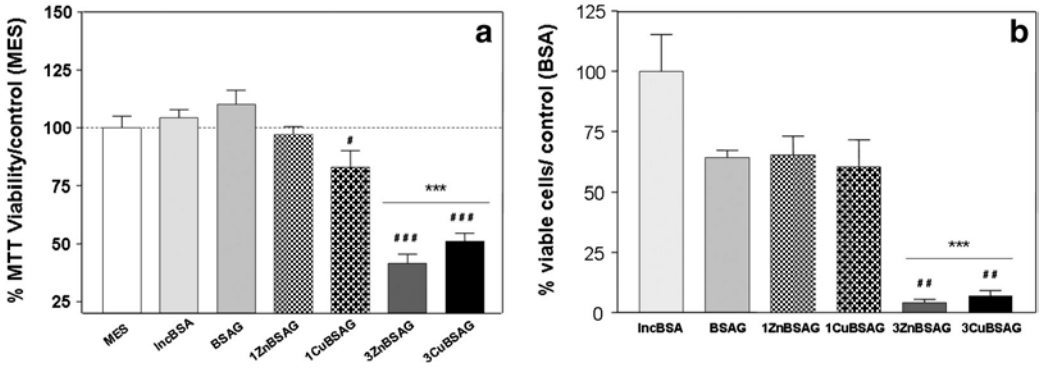


Fig. 7. Cellular toxicity of metal BSAG samples. a) BV2 cellular cytotoxicity measured by MTT assay and expressed as a percentage of viability compared with control (MES). b) Viability of BV2 cells treated with BSA samples, expressed as the percentage of cells compared with BSA control and determined by a relative counting using a FACSscan flow cytometer. □ Effect of glycation in BV2 cell viability (vs. BSA): □□□p b 0.001. # Effect of copper or zinc in glycated BSA sample toxicity (vs. BSAG): ###p b 0.001, ##p b 0.01, #p b 0.05.

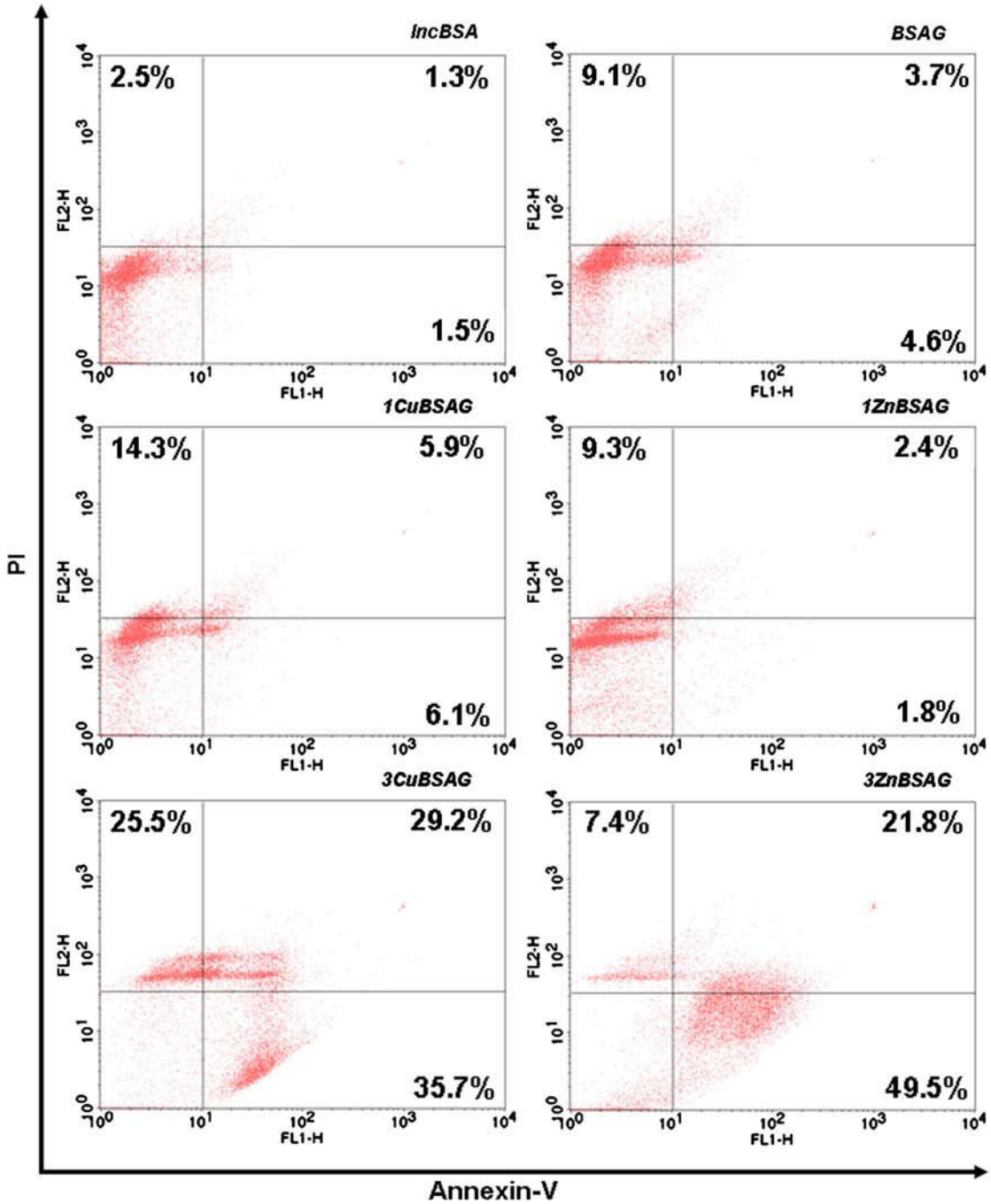


Fig. 8. Metal BSAG samples induced apoptosis and necrosis of microglia cells. FACS analysis of BV2 cells stained with Annexin-V (FL1) and PI (FL2) treated overnight with BSA samples showed four different cell populations marked as: double negative (unstained) cells showing live cell population (lower left), Annexin V positive and PI negative stained cells showing early apoptosis (lower right), PI positive and Annexin V negative stained cells showing dead cells (upper left) and finally Annexin V/PI double-stained cells showing late apoptosis (upper right).

mixture is associated with a secondary structure evolution into intermolecular β-sheet structure in agreement with the fibrillar morphology and bigger size of aggregates observed in AFM microscopy. The presence of β-amyloid like fibril in CuBSAG or 3ZnBSAG structures could explain their relative cytotoxicity for microglia cells. Several previous studies have already highlighted this β-amyloid cytotoxicity of glycated albumin [8,10]. We can also notice that the partial conversion of secondary structure from α-helix into intramolecular β-sheets is rather promoted by the sole incubation at 37 °C than the glycation process. While the presence of 3 mM copper accentuates this conversion also in favor of intermolecular β-sheet structures, other metal conditions tend to mitigate the effect caused by heating. The tryptophan fluorescence is the main intrinsic probe used here to monitor the denaturation and folding of proteins. However, the quenching of fluorescence could result either from partial unfolding or from protein oxidation promoted by metal ions. As expected, both metals contribute to an enhanced protein oxidation together with greater glycation and/or aggregation processes in the presence of copper. Similarly to glycation and aggregation phenomena, copper ions exhibit potent impact on oxidation process. The enhanced oxidative state was evaluated following the redox status of Cys 34 and the carbonyl levels in albumin. Among amino acids known to form carbonyl derivatives upon metal-catalyzed oxidation, four of them (proline, arginine, lysine and threonine) are particularly prone to oxidation [54]. The particular susceptibility of arginine

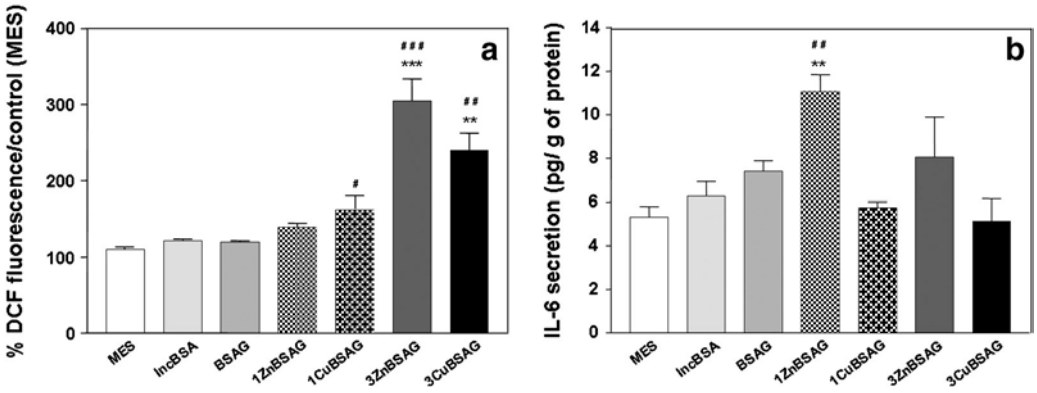


Fig. 9. Metal glycated albumin enhanced intracellular oxidative stress and inflammation. a) Intracellular ROS production in microglia cells was determined by DCF fluorescence assay. The relative increase (%) in DCF fluorescence (vs. MES) was determined for cells incubated with BSA samples (20 μM) during 24 h. Data are expressed as mean ± sd (n = 3). b) IL6 secretion was measured in BV2 cell medium after 6 h of incubation with BSA samples (20 μM). Data is presented as % control (MES) and are expressed as mean ± sd (n = 3). □ Effect of glycation in BV2 cells (vs. IncBSA): □□□p b 0.001, □□p b 0.01. # Effect of copper or zinc in glycated BSA samples (vs. BSAG): ###p b 0.001, ##p b 0.01.

and lysine residues to oxidative modification could explain that the decrease in primary amino group level of glycated BSA is not be ascribable to the sole glycation process which is partially or totally inhibited in the presence of Cu(II) ions. Furthermore, the impact of the sole Cu(II) ions on primary amino groups was observed (see Fig. S2, supplementary data). The oxidation of these glycation sites by Cu(II) or Zn(II) ions could explain the "antiglycative" potential of these metals. However, our findings on the promoting role of Zn on BSA aggregation and oxidation are in partial disagreement with another report stating a reduced β-aggregation and thiol protection in the Zn-containing glycated BSA samples [55]. Indeed, on the one hand, in the presence of Zinc(II) less inter and intramolecular β-structures than IncBSA and BSAG were formed (Fig. 2d). On the other hand, larger supramolecular structures were revealed.

If metal ions have a determining role on albumin structure, they do not drastically affect their antioxidant properties. Both in the red blood cell hemolysis and in ORAC assays, the presence of copper in BSA samples seems to reinforce the free radical trapping capacities of albumin. However, the strengthening in the antiradical capacity of glycated albumin following copper induced-oxidation appears to be in

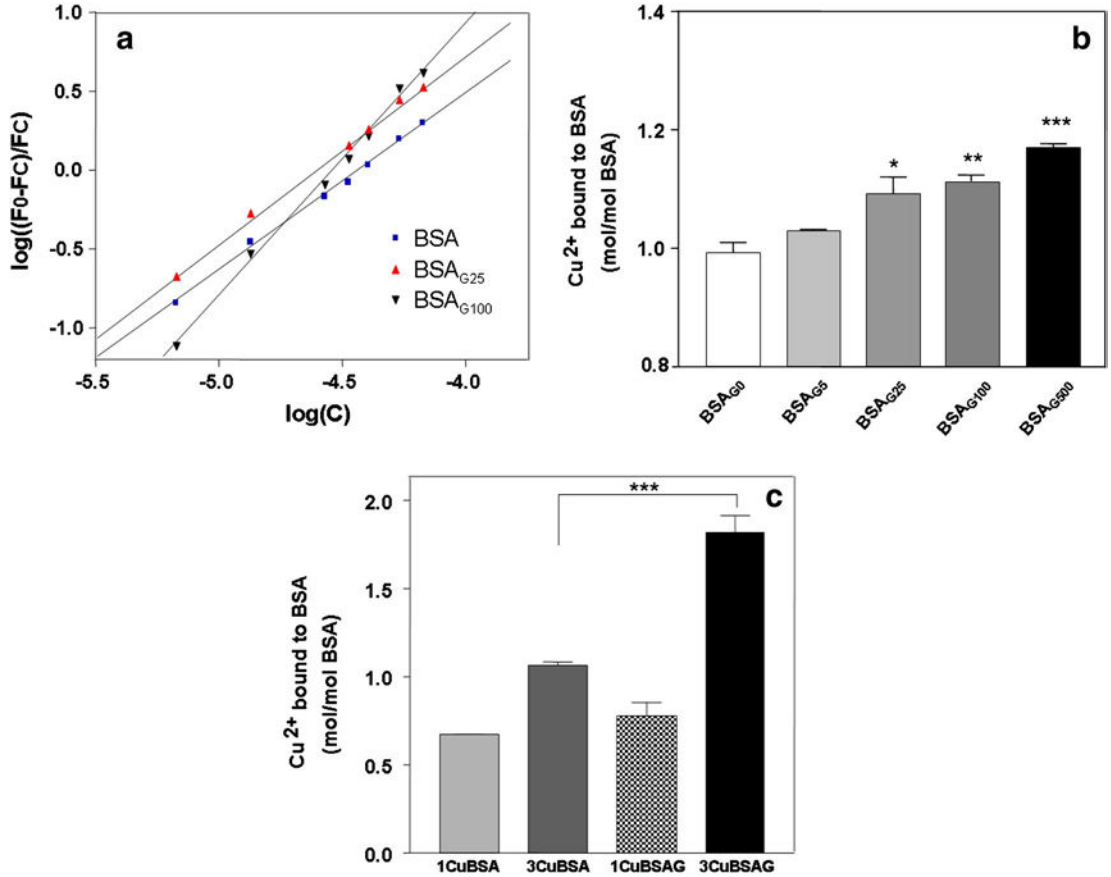


Fig. 10. Bovine serum albumin affinity for copper. a) The log plots (($F_0 - F_C$) / F_C) vs. log [C] for copper chloride binding with native and diabetic albumin. F_0 and F_C are the tryptophan fluorescence intensities of native albumin, BSA_{G0} (■) and modified albumin, BSA_{G25} (▲) and BSA_{G100} (▼) in the absence and presence of copper chloride at different concentrations [C]; b) Level of copper bound to glycated BSA samples as assessed by the BC method (mol/mol of BSA). c) Level of copper bound to albumin (mol/mol of BSA) in BSA samples incubated 7 weeks in the presence or absence of glucose (100 mM) and with copper (1 mM or 3 mM). Histogram data are expressed as means ± SD of three independent experiments. □ Effect of BSA glycation in copper binding (vs. BSA): □□□p b 0.001, □□p b 0.01, □p b 0.05.

Table 1
Binding parameters of copper in native and modified albumin preparations obtained by fluorescence spectroscopy. The binding studies of copper were investigated with 10 μM albumin samples at 30 °C. The binding parameters: binding site number (n) and binding constant K_A were calculated as described in the Materials and methods section.

	Binding constant K_A (l/mol) at 30 °C	Binding sites (n)	Correlation coefficient (r)
Copper			
BSA_{G0}	9.29×10^4	1.119 ± 0.028	0.996
BSA_{G25}	3.10×10^5	1.194 ± 0.113	0.957
BSA_{G100}	6.74×10^7	1.724 ± 0.049	0.995

total opposition with previous findings [56]. Even if antioxidant property of albumin seems not to be impaired, there is evidence that the protective role of the protein on cellular system is dramatically altered in the presence of metals, as attested by MTT and FACS results. The cytotoxicity between both metal-modified albumins is found to be quite different with a preferential necrotic pathway observed for murine microglia cells treated with CuBSAG while an apoptotic pathway seems to be rather induced by 3ZnBSAG. Moreover, at low metal concentration (1 mM), only CuBSAG leads to cellular toxicity associated with necrosis, oxidative stress and inflammatory response.

This study gives new evidence that glycation and aggregation should not be in general considered as two competitive processes. For instance, Zn(II) ions promote the heat-induced aggregation of the protein without completely preventing the glycation process. Conversely, in the presence of Cu(II) ions, aggregation and glycation appear to be rather competitive processes. If previous studies have demonstrated that aggregation was a process normally associated with glycation [8–10], we have also established that glycated albumin loses its capacity to self-assembly into aggregates following thermal process [28].

In order to understand the several and differential effects of the two investigated metal ions on the glycation, aggregation, oxidation processes and the associated conformational changes, it was necessary to focus on the specific and non-specific affinities of bovine albumin for these metals. We propose schematic models (Fig. 11.) of glycation and metal-induced changes in the structure and the properties of albumin. The presence of metals induces protein oxidation and misfolding contributing to the formation of highly cytotoxic aggregates responsible of microglia activation and death. The differential effect of both metals in glycation and aggregation could also result in the nature of the link between metal and protein which was already reported as different between copper and zinc [16,17,57]. Most mammalian albumins, such as HSA or BSA, have four metal binding sites, including N-terminal site, Cys34 residue and site A known to be identical to the Multi-Metal Binding site (MBS) located at the interface of domains I and II [58]. Another metal binding site, called B, whose location remains unknown was characterized for some metals including Zn(II) [59]. In the metal-binding site A, the imidazole nitrogens of His-67 in domain I and His-247 in domain II could be identified as main ligands for Zn(II) [60]. If site A is the preferential site for Zn(II), it is also a secondary binding site for Cu(II) [61,62].

Zinc is believed to be chelated by imidazole at histidine residues, but some non-specific binding could also involve cysteine residues [63,64]. Regarding copper ions, serum albumin has one strong binding site in the N-terminal tripeptide (Asp-Ala-His) for Cu(II), but histidine residues are also suggested as a major ligand, similarly to cysteine [35]. Moreover a previous study showed that both metals could be bound to albumin via histidine-imidazole ring in the MBS/site A [17,60], or in N-terminal site for copper [65]. Indeed, both nitrogen atoms of the 17 histidine residues present in bovine albumin are potential donors for transition metal ions. However, the mode of coordination of both these metals to imidazole is different and does not involve the same nitrogen atom. According to Navarra et al., the first mode of metal binding which involves Zn(II) ions, can promote intermolecular cross-link, leading to the formation of large aggregates, whereas Cu(II) ions are more prone to induce intramolecular chelation. This different type of metal coordination could explain why Zn(II) ions are more likely to promote the aggregation of BSA than Cu(II) ions in a heat-induced albumin treatment [17]. By contrast to this previous study, the presence of glucose gives rise to

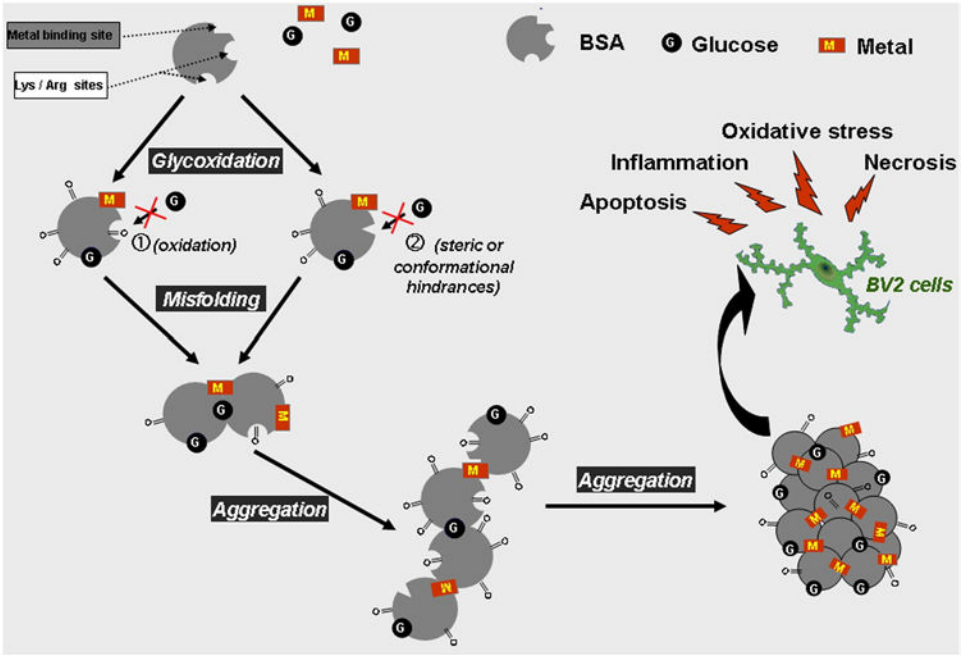


Fig. 11. Proposed schematic models for the glycation- and oxidation-induced changes in the structure and the properties of BSA molecule. Glycoxidation of albumin in the presence of metal and glucose induces protein misfolding and formation of high cytotoxic β-amyloid-like aggregates triggering microglia cell apoptosis and necrosis associated with oxidative stress. The inhibitory roles played by Zn(II) and especially Cu(II) ions in glycation process could be attributed to potential oxidation at lysine and arginine residues (see ①). We can hypothesize other contributing factors for "antiglycative" properties of Cu(II) and Zn(II): (i) the main lysine and arginine residues prone to glycation, are not involved in specific metal binding, but some of these amino acids could be prevented from glycation because of metal coordination with adjacent or nearby histidine residues. Indeed, most histidine residues appear to be located at close proximity of lysine or arginine which could induce a steric hindrance (see ②). (ii) Alteration in the tertiary and secondary structures of BSA induced by binding with metals ions could blunt the capacity of specific glycation sites to react with glucose residues (see ①).

some significant differences in aggregation pathway for BSA. Our findings show that glucose could enhance albumin affinity for copper. Indeed, a higher copper level bound to BSA was observed when glycated or incubated with glucose. This increase in copper affinity could be attributed to a favorable conformational change (i.e. tertiary structure) of albumin induced by glucose.

We previously indicated that the inhibitory roles played by Zn(II) and especially Cu(II) ions in glycation process could be attributed to potential oxidation at lysine and arginine residues (see ① in Fig. 11). We can hypothesize other contributing factors for "antiglycative" properties of Cu(II) and Zn(II): (i) the main lysine and arginine residues prone to glycation, are not involved in specific metal binding, but some of these amino acids could be prevented from glycation because of metal coordination with adjacent or nearby histidine residues. Indeed, most histidine residues appear to be located at close vicinity of lysine or arginine which could induce a steric hindrance (see ② in Fig. 11). (ii) Alteration in the tertiary and secondary structures in BSA induced by binding with metal ions could blunt the capacity of specific glycation sites to react with glucose residues (see ① in Fig. 11). The different behavior of zinc and copper and in particular, the inhibiting role played by copper in BSA glycation show that metal ions are non-completely chelated by the protein through the main binding site and highlights the role of non-specific binding sites in glycation, aggregation and oxidation phenomena.

The main limitation of our study concerns the use of non defatted albumin. The zinc (II) secondary site is functionally linked to the fatty acid binding site and defatted BSA may exhibit a different behavior in both reactivity and spectral features upon glycoxidation. Studies on glycoxidation effects on defatted albumin properties are under progress in our laboratory.

In conclusion, we detailed the involvement of metal ions in the glycation process causing structural modifications in glycated proteins. In particular, we evidenced a marked inhibition of BSA glycation in the presence of copper. We also ascertained that this metal could not be considered as a protective agent regarding its deleterious role in protein oxidation and aggregation by giving rise to cytotoxic aggregates. By contrast, zinc had moderate action on glycation and oxidation processes even if it affected the extent of the aggregation similarly to copper. A distinct polypeptide folding, redox states and metal binding mode of both metal-glycated BSA systems could explain these differences. These findings support the idea that the complexity in the interaction between protein and metal requires further investigation by using in vivo model in order to reach a better understanding of the physiological implication of Zn and Cu in albumin properties.

Author contributions

J.B.V. researched data, contributed discussion, reviewed manuscript.

G.N. researched data, wrote, contributed discussion, reviewed manuscript.

M.L. researched data, reviewed manuscript.

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

V.M. 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, the Université de La Réunion and l'Europe. JBV is supported by a fellowship from the Conseil Régional de La Réunion and l'Europe.

We are grateful to all members of the MBSM group (http://www.fisica.unipa.it/biophysmol/) for continuous stimulating discussions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.12.017.

References

[1] S.B. Prusiner, S.J. DeArmond, Prion diseases and neurodegeneration, Annu. Rev. Neurosci. 17 (1994) 311–339.
[2] M. Brownlee, Advanced protein glycosylation in diabetes and aging, Annu. Rev. Med. 46 (1995) 223–234.
[3] M.P. Cohen, Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin, Arch. Biochem. Biophys. 419 (2003) 25–30.
[4] 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.
[5] P. Rondeau, E. Bourdon, The glycation of albumin: structural and functional impacts, Biochimie 93 (2011) 645–658.
[6] I.S. Coraci, J. Husemann, J.W. Berman, C. Hulette, J.H. Dufour, G.K. Campanella, A.D. Luster, S.C. Silverstein, J.B. El-Khoury, CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils, Am. J. Pathol. 160 (2002) 101–112.
[7] J.E. Donahue, S.L. Flaherty, C.E. Johanson, J.A. Duncan III, G.D. Silverberg, M.C. Miller, R. Tavares, W. Yang, Q. Wu, E. Sabo, V. Hovanesian, E.G. Stopa, RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease, Acta Neuropathol. 112 (2006) 405–415.
[8] B. Bouma, L.M. Kroon-Batenburg, Y.P. Wu, B. Brunjes, G. Posthuma, O. Kranenburg, P.G. de Groot, E.E. Voest, M.F. Gebbink, Glycation induces formation of amyloid cross-beta structure in albumin, J. Biol. Chem. 278 (2003) 41810–41819.
[9] 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) 933–942.
[10] Y. Wei, L. Chen, J. Chen, L. Ge, R. He, Rapid glycation with D-ribose induces globular amyloid-like aggregations of BSA with high cytotoxicity to SH-SY5Y cells, BMC Cell Biol. 10 (2009) 10.
[11] M.P. Vitek, K. Bhattacharya, J.M. Glendening, E. Stopa, H. Vlassara, R. Bucala, K. Manogue, A. Cerami, Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91 (1994) 4766–4770.
[12] V. Bellotti, P. Mangione, G. Merlini, Review: immunoglobulin light chain amyloidosis —the archetype of structural and pathogenic variability, J. Struct. Biol. 130 (2000) 280–289.
[13] M.A. Lovell, J.D. Robertson, W.J. Teesdale, J.L. Campbell, W.R. Markesbery, Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques, J. Neurol. Sci. 158 (1998) 47–52.
[14] D. Religa, D. Strozyk, R.A. Cherny, I. Volitakis, V. Haroutunian, B. Winblad, J. Naslund, A.I. Bush, Elevated cortical zinc in Alzheimer disease, Neurology 67 (2006) 69–75.
[15] M.P. Cohen, F.N. Ziyadeh, S. Chen, Amadori-modified glycated serum proteins and accelerated atherosclerosis in diabetes: pathogenic and therapeutic implications, J. Lab. Clin. Med. 147 (2006) 211–219.
[16] G. Navarra, M. Leone, V. Militello, Thermal aggregation of beta-lactoglobulin in presence of metal ions, Biophys. Chem. 131 (2007) 52–61.
[17] G. Navarra, A. Tinti, M. Leone, V. Militello, A. Torreggiani, Influence of metal ions on thermal aggregation of bovine serum albumin: aggregation kinetics and structural changes, J. Inorg. Biochem. 103 (2009) 1729–1738.
[18] S.P. Wolff, R.T. Dean, Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes, Biochem. J. 245 (1987) 243–250.
[19] S. Kawakishi, J. Tsunehiro, K. Uchida, Autoxidative degradation of Amadori compounds in the presence of copper ion, Carbohydr. Res. 211 (1991) 167–171.
[20] P.J. Thornalley, A. Langborg, H.S. Minhas, Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose, Biochem. J. 344 (Pt 1) (1999) 109–116.
[21] U. Kragh-Hansen, Structure and ligand binding properties of human serum albumin, Dan. Med. Bull. 37 (1990) 57–84.
[22] T.J. Peters, All About Albumin — Biochemistry, Genetics, and Medical Applications, Academic Press, San Diego, 1996.
[23] M. Roche, P. Rondeau, N.R. Singh, E. Tarnus, E. Bourdon, The antioxidant properties of serum albumin, FEBS Lett. 582 (2008) 1783–1787.
[24] 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.
[25] 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.
[26] A. Guerin-Dubourg, A. Catan, E. Bourdon, P. Rondeau, Structural modifications of human albumin in diabetic context, Diabetes Metab. 38 (2012) 171–178.
[27] 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.
[28] P. Rondeau, G. Navarra, F. Cacciabaudo, M. Leone, E. Bourdon, V. Militello, Thermal aggregation of glycated bovine serum albumin, Biochim. Biophys. Acta Protein Proteomics 1804 (2010) 789–798.
[29] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, Arch. Biochem. Biophys. 82 (1959) 70–77.

[30] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 (1970) 680–685.
[31] R.L. Levine, J.A. Williams, E.R. Stadtman, E. Shacter, Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, Methods Enzymol. 233 (1994) 346–357.
[32] R.L. Levine, N. Wehr, J.A. Williams, E.R. Stadtman, E. Shacter, Determination of carbonyl groups in oxidized proteins, Methods Mol. Biol. 99 (2000) 15–24.
[33] 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, Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 1830 (2013) 3532–3541.
[34] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65 (1983) 55–63.
[35] M.D. Argirova, B.J. Ortwerth, Activation of protein-bound copper ions during early glycation: study on two proteins, Arch. Biochem. Biophys. 420 (2003) 176–184.
[36] E. Bourdon, N. Loreau, L. Lagrost, D. Blache, Differential effects of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin, Free Radic. Res. 39 (2005) 15–20.
[37] 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 (2010) 410–414.
[38] 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).
[39] M. Leone, S. Agnello, R. Boscaino, M. Cannas, F.M. Gelardi, Conformational disorder in vitreous systems probed by photoluminescence activity in SiO2, Anglais 60 (1999) 11475–11481.
[40] M. Stefek, I. Drozdikova, K. Vajdova, The pyridoindole antioxidant stobadine inhibited glycation-induced absorbance and fluorescence changes in albumin, Acta Diabetol. 33 (1996) 35–40.
[41] P.M. Viallet, T. Vo-Dinh, A.C. Ribou, J. Vigo, J.M. Salmon, Native fluorescence and mag-indo-1-protein interaction as tools for probing unfolding and refolding sequences of the bovine serum albumin subdomain in the presence of guanidine hydrochloride, J. Protein Chem. 19 (2000) 431–439.
[42] M. Groenning, M. Norrman, J.M. Flink, M. van de Weert, J.T. Bukrinsky, G. Schluckebier, S. Frokjaer, Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils, J. Struct. Biol. 159 (2007) 483–497.
[43] M. Groenning, L. Olsen, M. van de Weert, J.M. Flink, S. Frokjaer, F.S. Jorgensen, Study on the binding of Thioflavin T to beta-sheet-rich and non-beta-sheet cavities, J. Struct. Biol. 158 (2007) 358–369.
[44] M.R. Krebs, E.H. Bromley, A.M. Donald, The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications, J. Struct. Biol. 149 (2005) 30–37.
[45] R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S.A. Carter, V. Krishna, R.K. Grover, R. Roy, S. Singh, Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils, J. Struct. Biol. 151 (2005) 229–238.
[46] A. Henn, S. Lund, M. Hedtjarn, A. Schrattenholz, P. Porzgen, M. Leist, The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation, ALTEX 26 (2009) 83–94.
[47] B. Liu, J.S. Hong, Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention, J. Pharmacol. Exp. Ther. 304 (2003) 1–7.
[48] C. Seneviratne, G.W. Dombi, W. Liu, J.A. Dain, The in vitro glycation of human serum albumin in the presence of Zn(II), J. Inorg. Biochem. 105 (2011) 1548–1554.
[49] A. Tanaka, H. Kaneto, T. Miyatsuka, K. Yamamoto, K. Yoshiuchi, Y. Yamasaki, I. Shimomura, T.-a. Matsuoka, M. Matsuhisa, Role of copper ion in the pathogenesis of type 2 diabetes, Endocr. J. 56 (2009) 699–706.
[50] R.A. Al-Maroof, S.S. Al-Sharbatti, Serum zinc levels in diabetic patients and effect of zinc supplementation on glycemic control of type 2 diabetics, Saudi Med. J. 27 (2006) 344–350.
[51] M.D. Chen, Y.M. Song, P.Y. Lin, Zinc effects on hyperglycemia and hypoleptinemia in streptozotocin-induced diabetic mice, Horm. Metab. Res. 32 (2000) 107–109.
[52] P. Faure, J.L. Lafond, C. Coudray, E. Rossini, S. Halimi, A. Favier, D. Blache, Zinc prevents the structural and functional properties of free radical treated-insulin, Biochim. Biophys. Acta 1209 (1994) 260–264.
[53] D.T. Ramonaityte, M. Kersiene, B. Mockaitiene, The interaction of heavy metals (Cu, Fe, and Zn) with Maillard reaction products in the lactose–glycine system, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1043 (2005) 889.
[54] E.R. Stadtman, Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions, Annu. Rev. Biochem. 62 (1993) 797–821.
[55] R.S. Tupe, V.V. Agte, Role of zinc along with ascorbic acid and folic acid during long-term in vitro albumin glycation, Br. J. Nutr. 103 (2010) 370–377.
[56] E. Bourdon, N. Loreau, D. Blache, Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin, FASEB J. 13 (1999) 233–244.
[57] G. Navarra, D. Giacomazza, M. Leone, F. Librizzi, V. Militello, P.L. San Biagio, Thermal aggregation and ion-induced cold-gelation of bovine serum albumin, Eur. Biophys. J. 38 (2009) 437–446.
[58] W. Bal, M. Sokolowska, E. Kurowska, P. Faller, Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates, Biochim. Biophys. Acta 1830 (2013) 5444–5455.
[59] G. Fanali, Y. Cao, P. Ascenzi, M. Fasano, Mn(II) binding to human serum albumin: a (1)H-NMR relaxometric study, J. Inorg. Biochem. 117 (2012) 198–203.
[60] A.J. Stewart, C.A. Blindauer, S. Berezenko, D. Sleep, P.J. Sadler, Interdomain zinc site on human albumin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (2003) 3701–3706.
[61] W. Bal, J. Christodoulou, P.J. Sadler, A. Tucker, Multi-metal binding site of serum albumin, J. Inorg. Biochem. 70 (1998) 33–39.
[62] P.J. Sadler, J.H. Viles, 1H and 113)Cd NMR investigations of Cd(2+) and Zn(2+) binding sites on serum albumin: competition with Ca(2+), Ni(2+), Cu(2+), and Zn(2+), Inorg. Chem. 35 (1996) 4490–4496.
[63] B. Deng, Y. Wang, P. Zhu, X. Xu, X. Ning, Study of the binding equilibrium between Zn(II) and HSA by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma optical emission spectrometry, Anal. Chim. Acta. 683 (2010) 58–62.
[64] E.L. Giroux, R.I. Henkin, Competition for zinc among serum albumin and amino acids, Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 273 (1972) 64–72.
[65] C. Hureau, H. Eury, R. Guillot, C. Bijani, S. Sayen, P.L. Solari, E. Guillon, P. Faller, P. Dorlet, X-ray and solution structures of Cu(II) GHK and Cu(II) DAHK complexes: influence on their redox properties, Chemistry 17 (2011) 10151–10160.

SUPPLEMENTARY DATA

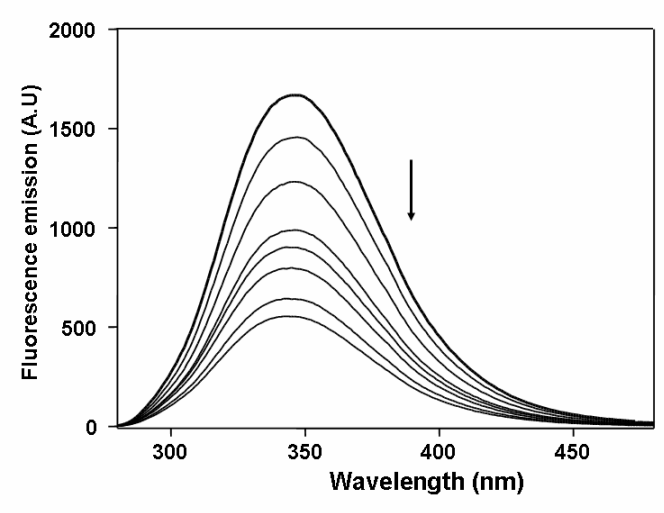


Figure S1: Effects of copper ions on the fluorescence emission spectrum of native BSA. Native albumin at 10 µM was incubated without (thick curve) and with different concentrations of $CuCl_2$ between 5 and 100 µM at 37 °C for 5 min.

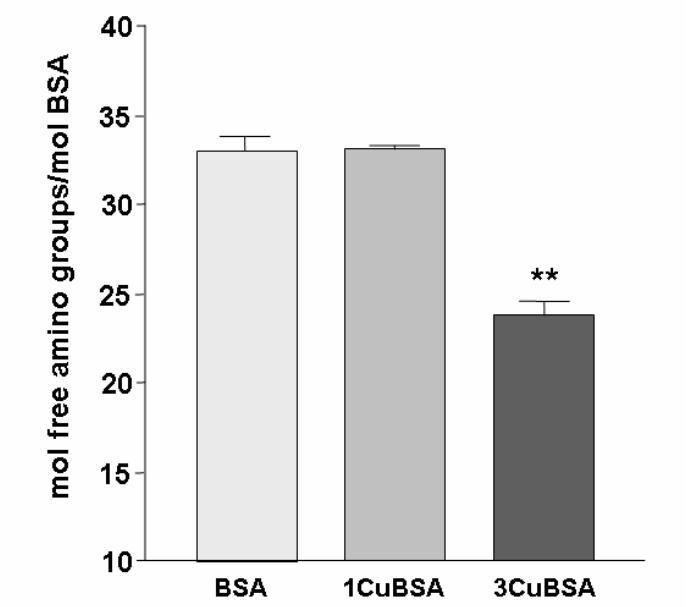


Figure S2: Effects of copper ions on modification of primary amino groups native BSA. Unmodified primary amino groups content in proteins by TNBS assay; Histogram data are expressed as means ± SD of three independent experiments. * Effect of copper (*vs.* BSA): ** $p<0.01$.

Discussion

Notre étude a montré que les métaux (le cuivre (Cu^{2+}) et le zinc (Zn^{2+}) peuvent affecter le processus de glycation et par conséquent la formation des AGE. Cette action inhibitrice sur la glycation dépend non seulement de la nature du métal mais aussi de sa concentration. En effet, les ions cuivre semblent être de meilleurs inhibiteurs du processus de glycation que le zinc. Cette inhibition différentielle est sûrement due à une plus grande affinité du cuivre pour l'albumine [235]. Par contre, cette atténuation de la glycation, induite par les métaux, est accompagnée par d'autres processus délétères pour l'intégrité de la protéine : la dénaturation, l'agrégation et l'oxydation.

En effet, les métaux induisent l'agrégation par la formation d'agrégats de morphologies différentes, selon la nature et de la concentration du métal. Certaines de ces structures sont de type β amyloïde et ont montré leurs cytotoxicités sur un modèle murin de microglie. Ce processus d'agrégation est favorisé par une dénaturation partielle de l'albumine glyquée qui est amplifiée présence de métaux.

Les résultats de l'état redox de la protéine nous indiquent une augmentation de l'oxydation de l'albumine, favorisée par la présence des ions métalliques qui permettrait d'expliquer cette dénaturation partielle. De plus, cette oxydation affectant notamment les résidus arginine et lysine, principales cibles du glucose, permet d'interpréter la diminution du processus de glycation en présence de métaux.

Les métaux ont un impact délétère sur l'intégrité structurale de l'albumine glyquée en termes d'oxydation, de dénaturation et d'agrégation, pourtant ils ne semblent pas affecter ses propriétés antioxydantes. En effet, comme le montrent les deux tests anti-radicalaires, la capacité de piégeage des radicaux libres de la BSA est globalement conservée en présence de zinc, voir renforcée en présence de cuivre. La conservation des capacités antioxydantes de la protéine glyquée en présence de ces métaux apparaît paradoxale au vue des caractères cytotoxiques de la protéine modifiée, mise en évidence sur les cellules microgliales. Comme nous l'avons relevé dans la première partie de ma thèse, ce paradoxe montre l'importance de l'étude suivant différentes approches pour évaluer les capacités protectrices de l'albumine.

Les tests antioxydants ne suffisent pas toujours pour pouvoir conclure sur les capacités protectrices de l'albumine, dans un contexte diabétique.

Pour expliquer ce paradoxe, plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- les protéines de types amyloïdes possèdent des propriétés structurales et fonctionnelles partagées avec les protéines glyquées. Certains récepteurs d'AGE servent ainsi de transporteurs primaires aux protéines de type amyloïde. Nous pouvons donc supposer une interaction possible entre albumine glyquée de type amyloïde avec les récepteurs RAGE induisant la réponse apoptotique ou nécrotique constatée dans cette étude.
- Nous pouvons aussi supposer que la présence des métaux piégés dans l'albumine glyquée suite à l'incubation avec le Cu^{2+} et Zn^{2+}, peut induire cette toxicité. La toxicité des métaux est connue lorsque la concentration dépasse un certain seuil [236].

Nous avons évoqué le phénomène d'oxydation pour expliquer la diminution du taux de glycation sur nos échantillons d'albumine glyquée en présence de métaux, mais d'autres facteurs peuvent y contribuer. En effet, une liaison entre certains résidus histidine et les métaux bivalents est possible et pourrait générer un phénomène d'encombrement stérique. En effet, si certains résidus lysine et arginine sujets à la glycation, ne sont peut-être pas impliqués dans des liaisons métaux spécifiques, leur glycation serait empêchée par l'interaction des métaux avec des résidus histidine adjacents ou proches. En effet, la plupart des résidus d'histidine semblent être situés à proximité immédiate de la lysine ou de l'arginine, pouvant provoquer cet encombrement stérique.

Conclusion

Dans cette étude, des modifications structurales des albumines glyquées causées par la présence d'ions métalliques ont été mises en évidence. Ces modifications structurales sont accompagnées d'une inhibition marquée de la glycation de la BSA en présence de cuivre, laissant place à des phénomènes de dénaturation, d'agrégation et d'oxydation de la protéine. Cependant les métaux ne peuvent pas être considérés comme des agents protecteurs à cause de leurs rôles délétères, en donnant naissance à des agrégats cytotoxiques. Par contre cette étude utilise des concentrations en glucose ou en métal qui ne reflètent pas les réalités physiologique et pathologique, mais elle a été réalisée avec pour principal objectif une meilleure compréhension structurale des modifications de l'albumine induite conjointement

par le duo glucose-métal. Pour une meilleure relevance clinique, des études similaires pourraient être réalisées en utilisant si possible des concentrations adaptées et des modèles de glycation *in vivo* afin de parvenir à mieux comprendre l'implication des métaux sur les propriétés physiologiques de l'albumine.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les différents travaux de ce manuscrit permettent de confronter le modèle de glycation *in vitro,* habituellement utilisé, à un nouveau modèle de glycation *in vivo* purifié à partir du plasma de patients diabétiques. Les résultats obtenus apportent quelques éléments de réponse sur les niveaux d'altérations structurales et fonctionnelles de l'albumine *in vivo* lors d'une hyperglycémie chronique. Les nombreux paramètres observés dans ces travaux donnent un éclairage nouveau sur le statut structural, redox, conformationnel et fonctionnel de l'albumine glyquée *in vivo* et *in vitro* dans des conditions pathologiques **(Figure 32)**.

En effet, concernant les nombreux marqueurs biochimiques utilisés dans le cadre de ces études, les effets délétères du phénomène de glycation ne sont pas complètement similaires pour les modèles *in vitro* (25 mM) et *in vivo.* Ces modifications montrent que le phénomène de glycation s'accompagne de changements de type oxydatif plus marqué pour le modèle *in vitro* mimant le plus le diabète ***(Figure 32 voir (1))***. Aussi, pour ce modèle la conformation autour du tryptophane se trouve être plus affecté. Le modèle de glycation *in vivo* permet donc de mieux décrire l'intégrité structurale de l'albumine glyquée modifiée par le processus de glycation dans les conditions rencontrées lors du diabète, car il prend en compte toutes les conditions physiologiques pouvant intervenir dans cette pathologie.

Ces modifications structurales de la glycation se traduisent par des modifications biochimiques ayant pour conséquence des modifications conformationnelles qui affectent les fonctions antioxydantes, ainsi que les propriétés de liaisons aux médicaments et enzymatiques de l'albumine ***(Figure 32 voir (2))*** :

- Activité antioxydante : Même si les résultats ne sont pas similaires pour le modèle de glycation *in vivo* et *in vitro*, il apparaît que le processus de glycation ou de glycoxydation n'altèrent pas les capacités antioxydantes de la protéine, mais semble même l'amplifier. Malgré la constatation de ces dommages au niveau de l'albumine glyquée, ces AGE d'albumines conservent donc leurs propriétés « d'éponge » à oxydant. De même nous pouvons remarquer que l'activité antioxydant n'est pas affectée par la glycation alors que l'acide aminé cyst-34 responsable de cette fonction est modifiée.
- Propriétés de liaison : Nous avons pu mettre en évidence que le phénomène de glycoxydation ainsi que de glycation modifiait les propriétés de liaison de l'albumine glyquée *in vivo* et *in vitro*, et que cette altération faisait surgir de nouveaux sites de liaisons ayant moins d'affinité pour ces médicaments. Le transport des médicaments à travers ces AGE d'albumine pourrait donc être impacter.

- Enfin, l'activité enzymatique de type estérase des deux modèles de glycation se trouve être aussi endommagés par le processus de glycation menaçant la conversion des prodrogues en médicaments actifs chez les patients diabétiques.

Pour les propriétés de liaison aux médicaments ainsi que pour l'activité estérase, nous avons pu mettre en évidence une relation entre le degré de glycation avec l'altération structurale de la protéine, induite par la glycation. Même si des similitudes sont parfois observées, les différences obtenues concernant l'altération de la structure et des fonctions de l'albumine glyquée *in vivo* et *in vitro* montrent clairement que le modèle de glycation *in vitro* imitant les conditions d'une hyperglycémie n'apparait pas comme le plus approprié dans le cadre des études sur la physiopathologie du diabète.

L'effet de ces modèles de glycation sur la physiologie cellulaire a mis en évidence l'activation de processus pro-oxydants et pro-inflammatoires au niveau des modèles de cellules adipocytaire et macrophagique (***Figure 32 voir (3)***). Cette activation se traduit par une sur-activation du récepteur RAGE accompagnée d'une surproduction de ROS, d'une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire IL-6 ainsi que du facteur de transcription NF-κB. Le paradoxe dans ces résultats réside dans l'amplification des propriétés antioxydant intrinsèque de l'albumine glyquée, qui dans le même temps induit la production de ROS intracellulaire. Toutefois, il est à noter que le processus de glycation *in vivo* modifie de manière différente la structure et les fonctions de l'albumine en générant des AGE d'albumines activant différentiellement les processus inflammatoires et oxydant sur des cellules, à travers l'activation des récepteurs aux AGE.

Ces différences observées entre le modèle *in vivo* et *in vitro* peuvent avoir un impact sur les recherches visant à mieux comprendre l'implication de l'albumine dans les complications métaboliques associées au diabète comme les maladies cardiovasculaires. Ces résultats démontrent ainsi l'importance du choix du modèle de glycation, devant mimer au mieux la situation pathologique d'un patient diabétique.

Enfin, la dernière étude a mis en évidence que la présence de métaux tels que le cuivre et le zinc, accentue la dénaturation et l'oxydation de la protéine glyquée et s'accompagne d'un processus d'agrégation rendant la protéine plus cytotoxique. Cependant, ces modifications

mettent également en avant le rôle inhibiteur de ces métaux dans le phénomène de glycation ***(Figure 32 voir (4))***.

Les perspectives de mon travail de thèse m'apparaissent nombreuses et variées :

- L'albumine étant la protéine la plus abondante dans le sang, elle constitue la première cible de la glycoxydation dans la circulation sanguine et par conséquent source majoritaire d'AGE dans ce compartiment. Le plasma du patient diabétique serait-il plus sujet à des altérations d'ordre oxydatif et inflammatoires à l'origine des complications liées au diabète ? Il serait judicieux de voir quel rôle joue l'activation de ces AGE dans l'activation de facteurs d'ordre oxydatif ou inflammatoire sur l'apparition de maladies associées au diabète comme les maladies cardiovasculaires.

- Dans un aspect très fondamental, la compréhension et les détails de l'interaction albumine-sucres dans le cadre de la glycation ainsi que les modifications qui en découlent en fonction de la concentration en sucre, pourraient être éclairées par la technique du « docking », qui permet de modéliser et prévoir l'orientation préféré d'une molécule. Cette technique pourrait être utilisée afin de mieux comprendre les caractéristiques de la liaison albumine-médicament dans le cadre d'une hyperglycémie augmentée dans le temps.

- À l'heure actuelle, à ma connaissance, aucune étude n'a évalué la structure de l'albumine glyquée provenant de patients diabétiques par cristallographie aux rayons X. Cette mise en œuvre permettrait d'éclairer certaines questions concernant l'impact du sucre dans les conditions d'hyperglycémie chronique, sur les acides aminés, les sites hydrophobes ainsi que les ponts disulfures.

D'autres perspectives concernent les modifications d'ordre fonctionnel observées dans ce manuscrit, afin d'évaluer leurs réels impacts sur la physiologie de l'animal et dans l'idéal sur celle de l'Homme :

- Le rôle de l'albumine dans la pharmacocinétique et pharmacodynamique du médicament donne une implication importante à l'albumine dans les traitements

médicamenteux chez le diabétique. En effet comme nous avons pu le voir, l'albumine glyquée se retrouve avec une affinité moins grande pour la Warfarine®, médicament couramment utilisé chez les diabétiques. Aussi, dans l'insulinothérapie, les analogues de l'insuline comme le Détemir® se lient à l'albumine. Est-ce que les différences observées entre l'albumine native et l'albumine issue de patients diabétiques concernant l'affinité au médicament auraient une relevance clinique ? Certains médicaments fortement liés à l'albumine auraient-ils un effet moindre ou amplifié chez le diabétique? Pour répondre à cette question un modèle animal, comme les souris transgéniques db/db, pourrait être développé afin d'observer si l'effet d'un médicament est altéré chez ce modèle animal de diabète. L'effet thérapeutique du médicament pourra alors être analysé, mais aussi sa toxicité et son élimination dans l'organisme et seront comparés au groupe témoin.

- En ce qui concerne l'activité estérase, on peut se demander si l'altération de cette fonction dans le cadre de la pathologie diabétique pourrait avoir une réelle conséquence sur le phénomène de conversion des prodrogues. L'hypothèse d'une altération de cette fonction de conversion, par les AGE issues de l'albumine, supposerait une activation moindre du médicament en quantité et/ou dans le temps, et par conséquent modifierait son effet thérapeutique chez les patients diabétiques.

- Au cours de l'une de mes études, nous avons pu mettre en évidence une corrélation entre le degré de glycation et les altérations structurales et fonctionnelles de l'albumine glyquée. Si l'albumine glyquée est un témoin du degré de la glycation, c'est à dire du taux d'hyperglycémie lors du diabète, ne serait-elle pas un meilleur marqueur du suivi de la régulation de la glycémie à court terme, plus précis que l'HBA1c ?

Au-delà des études complémentaires mentionnées précédemment, l'ensemble des résultats présenté dans ce manuscrit suscite de nouvelles voies d'investigation mettant en avant les autres rôles de l'albumine. Il faut rappeler que l'albumine est une protéine multifonctionnelle qui possède d'autres rôles dans l'organisme que ceux étudiés ici. En effet, l'albumine sert à réguler la pression oncotique, protège l'organisme contre des molécules toxiques à l'état libre, transporte des métabolites, mais aussi les acides gras, etc.… Étudier l'impact de la glycation

sur ces propriétés de l'albumine pourrait élucider l'origine de certaines maladies associées au diabète. On pourrait se poser la question : est-ce que la pathologie diabétique causant l'altération structurale de l'albumine pour en faire des AGE serait un engrenage dans l'apparition des maladies associées au diabète, comme les maladies cardiovasculaires ?

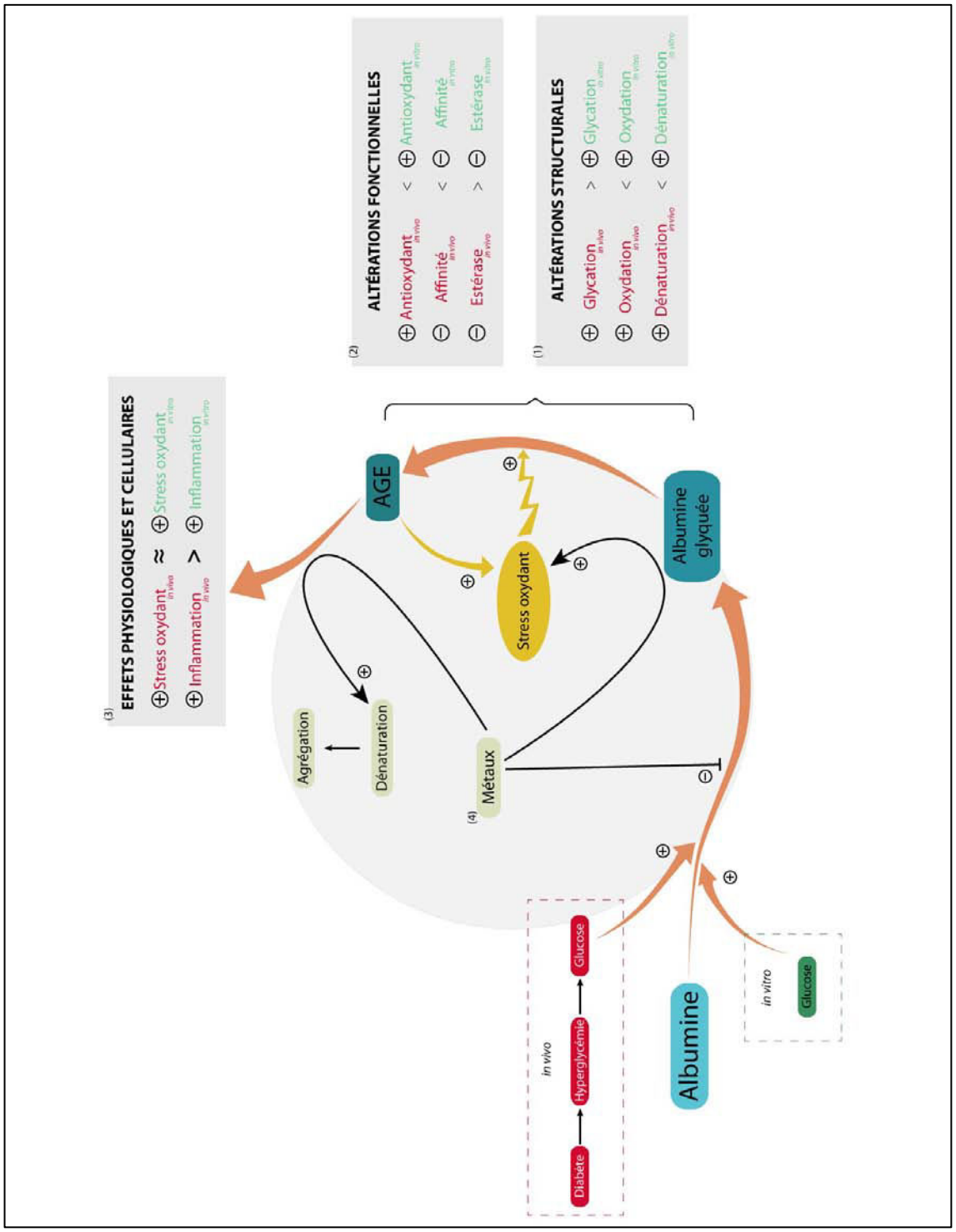


Figure 32. Schéma bilan sur les altérations structurales et fonctionnelles de l'albumine modifiée.

Légende : ⊕ Pour « activation » et ⊖ pour « inhibition ou altération ». Les paramètres concernant la glycation (amine libres, fructosamines), l'oxydation (thiols et carbonyles), la dénaturation (fluorescence du tryptophane) sont ainsi comparés. De même que les paramètres physiologiques du stress oxydant (ROS et RAGE) et de l'inflammation (NF-┤B et Il-6).

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES ISSUES DE CETTE THESE

Articles scientifiques :

Baraka-Vidot, J., Guerin-Dubourg, A., Bourdon, E. and Rondeau, P. *« Impaired drug-binding capacities of in vitro and in vivo glycated albumin »*. Biochimie. **(2012).** 94:1960-7

Baraka-Vidot, J., Guerin-Dubourg, A., Payet, B., Dubois, F., Bourdon, E. and Rondeau, P. « *New insights into deleterious impacts of in vivo glycation on albumin antioxidant activities* » Biochem Biophys Acta - general subjects **(2013)** 1830, 3532-41

Baraka-Vidot J., Navarra G., Leone M., Bourdon E., Militello V. and Rondeau P. « *Deciphering metal-induced oxidative damages on glycated albumin structure and function »* Biochem Biophys Acta. general subjects (**2014)** 1840 1712-24.

Baraka-Vidot J., Cynthia Planesse, Indira dennemont, Olivier Meilhac, Valeria Militello, Jean Van den Elsen, Emmanuel Bourdon, Philippe Rondeau. «*Glycation alters ligand-binding, enzymatic and pharmacological properties of human albumin* ». Soumis à JBC (Journal of Biological Chemistry)

Présentations Orales :

Forum des jeunes chercheurs 2014 – Université de la Réunion- « Conformation spatiale d'une protéine modifiée par le diabète »

Présentation Orale FedEBS (Fédération Environnement, Biodiversité et Santé) - Université de la Réunion « Caractérisation des propriétés de liaison de l'albumine glyquée » - 2011

Présentations affichés :

Congrès FEBS 2013 en Russie, Saint-Petersbourg : « Glycation impairs albumin drug binding properties in diabetic patients » Jennifer Baraka-Vidot, Alexis Guerin-Dubourg, Emmanuel Bourdon and Philippe Rondeau - Obtention de bourses FEBS, SFBBM et EDSTS

Doctoriales 2014 : « Le diabète: Altération d'une protéine à fonctions multiples: l'albumine » Jennifer Baraka-Vidot, Philippe Rondeau, Emmanuel Bourdon - Saint Gilles les bains.
Lauréate du « Prix du grand public »

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S: Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol* 2005, 353(1):38-52.**
2. **Wells JC: The evolution of human fatness and susceptibility to obesity: an ethological approach. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2006, 81(2):183-205.**
3. **ORS: Le Diabète à la Réunion. In: *Tableau de bord de l'ORS de la Réunion.* 2012.**
4. **OMS - Organisation Mondiale de la Santé.: Rapport sur la santé dans le monde 2010. In.; 2010.**
5. **Santé ORdl: de de la population de La Reunion – Indicateurs la politique de S Publique In.; Rapport 2008.**
6. **Favier F, Jaussent I, Moullec NL, Debussche X, Boyer MC, Schwager JC, Papoz L: Prevalence of Type 2 diabetes and central adiposity in La Reunion Island, the REDIA Study. *Diabetes Res Clin Pract* 2005, 67(3):234-242.**
7. **World Health Organization.: Global health risks : mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009.**
8. **Mathers CD, Loncar D: Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006, 3(11):e442.**
9. **World Health Organization.: Global status report on noncommunicable diseases 2010. In. Geneva: World Health Organization; 2011.**
10. **Almdal T, Scharling H, Jensen JS, Vestergaard H: The independent effect of type 2 diabetes mellitus on ischemic heart disease, stroke, and death: a population-based study of 13,000 men and women with 20 years of follow-up. *Arch Intern Med* 2004, 164(13):1422-1426.**
11. **Marieb EN: Biologie humaine; 2008.**
12. **Cameron I: An operatic version of the Banting story. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*.**
13. **Staub A, Sinn L, Behrens OK: Purification and crystallization of glucagon. *J Biol Chem* 1955, 214(2):619-632.**
14. **Mosca A, Lapolla A, Gillery P: Glycemic control in the clinical management of diabetic patients. *Clin Chem Lab Med* 2013, 51(4):753-766.**
15. **Alberti KG, Zimmet PZ: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998, 15(7):539-553.**
16. **Akerblom HK, Vaarala O, Hyoty H, Ilonen J, Knip M: Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am J Med Genet* 2002, 115(1):18-29.**
17. **Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, Wajcberg E, Mandarino LJ, DeFronzo RA: Abdominal fat distribution and peripheral and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002, 283(6):E1135-1143.**
18. **Kajimoto Y, Kaneto H: Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1011:168-176.**
19. **Durlach V, Gillery P, Grulet H, Gross A, Moysset P, Leutenegger M: [Relationship between lipoprotein(a) and non-insulin-dependent diabetes in 602 patients]. *Rev Med Interne* 1993, 14(10):994.**

20. Rocchini AP: Childhood obesity and a diabetes epidemic. *N Engl J Med* 2002, 346(11):854-855.
21. Balkau B, Deanfield JE, Despres JP, Bassand JP, Fox KA, Smith SC, Jr., Barter P, Tan CE, Van Gaal L, Wittchen HU *et al*: International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries. *Circulation* 2007, 116(17):1942-1951.
22. Charles MA, Eschwege E, Basdevant A: Monitoring the obesity epidemic in France: the Obepi surveys 1997-2006. *Obesity (Silver Spring)* 2008, 16(9):2182-2186.
23. Baynes JW, Thorpe SR: Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999, 48(1):1-9.
24. Giacco F, Brownlee M: Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010, 107(9):1058-1070.
25. Grossin N, Wautier MP, Meas T, Guillausseau PJ, Massin P, Wautier JL: Severity of diabetic microvascular complications is associated with a low soluble RAGE level. *Diabetes Metab* 2008, 34(4 Pt 1):392-395.
26. Bernard M, Bordas-Fonfrede M, Grimaldi A, Guillemin C, Stahl A, Leutenegger M, Gillery P: [Respective value of glycated hemoglobin and fructosamine assays in the care of diabetes mellitus]. *Ann Biol Clin (Paris)* 1995, 53(6):321-327.
27. Gillery P, Bordas-Fonfrede M, Chapelle JP, Drouin P, Hue G, Levy-Marchal C, Perier C, Selam JL, Slama G, Thivolet C *et al*: HBA1c: clinical and biological agreement for standardization of assay methods. Report by the experts of ALFEDIAM (Association de Langue Francaise pour lEtude du Diabete et des Maladies Metabolique) and SFBC (Societe Francaise de Biologie Clinique). *Diabetes Metab* 1999, 25(3):283-287.
28. WAUTIER J-L: Le sens de la médecine ou la révolution culturelle dans le système de santé; 2013.
29. Rondeau P: Stress oxydant et glycation : relation structure et activité biologique de l'albumine in vivo et in vitro dans le cadre de la pathologie diabétique. Saint-Denis; 2009.
30. Boulanger E, Dequiedt P, Wautier JL: [Advanced glycosylation end products (AGE): new toxins?]. *Nephrologie* 2002, 23(7):351-359.
31. Gillery P: [Oxidative stress and protein glycation in diabetes mellitus]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2006, 64(4):309-314.
32. Maillard L: Action des acides aminés sur les sucres In: *formation des mélanoïdes par voie méthodique.* Edited by Sci. CRA, vol. 154. Paris; 1912: 66–68.
33. Day JF, Thorpe SR, Baynes JW: Nonenzymatically glucosylated albumin. In vitro preparation and isolation from normal human serum. *J Biol Chem* 1979, 254(3):595-597.
34. Cohen MP: Diabetes and Protein Glycation. New York: Springer-Verlag Inc.; 1986.
35. Cohen MP: Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. *Arch Biochem Biophys* 2003, 419(1):25-30.
36. Cohen MP, Shea E, Chen S, Shearman CW: 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* 2003, 141(4):242-249.
37. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A: Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med* 1984, 101(4):527-537.

38. Gillery P, Dumont G, Vassault A: Evaluation of GHb assays in France by national quality control surveys. *Diabetes Care* 1998, 21(2):265-270.
39. Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW: Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1998, 44(7):1139-1145.
40. Niwa T: 3-Deoxyglucosone: metabolism, analysis, biological activity, and clinical implication. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999, 731(1):23-36.
41. Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM: Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res* 2003, 93(12):1159-1169.
42. Cloos PA, Christgau S: Post-translational modifications of proteins: implications for aging, antigen recognition, and autoimmunity. *Biogerontology* 2004, 5(3):139-158.
43. Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K: Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* 2003, 10(23):2495-2505.
44. Fridovich I: The biology of oxygen radicals. *Science* 1978, 201(4359):875-880.
45. Sies H, Cadenas E: Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985, 311(1152):617-631.
46. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO: Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 1954, 119(3097):623-626.
47. Gilbert DL: Fifty years of radical ideas. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 899:1-14.
48. Morena M, Martin-Mateo M, Cristol JP, Canaud B: [Oxidative stress, hemo-incompatibility and complications of long-term dialysis]. *Nephrologie* 2002, 23(5):201-208.
49. Halliwell B: Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994, 52(8 Pt 1):253-265.
50. Halliwell B, Gutteridge JM: Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986, 246(2):501-514.
51. Halliwell B, Gutteridge JM: Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 1992, 307(1):108-112.
52. Gutteridge JM: Iron and oxygen: a biologically damaging mixture. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1989, 361:78-85.
53. Duthie GG, Bellizzi MC: Effects of antioxidants on vascular health. *Br Med Bull* 1999, 55(3):568-577.
54. Chappey O, Dosquet C, Wautier MP, Wautier JL: Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest* 1997, 27(2):97-108.
55. Martinez-Cayuela M: Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 1995, 77(3):147-161.
56. Crow JP, Spruell C, Chen J, Gunn C, Ischiropoulos H, Tsai M, Smith CD, Radi R, Koppenol WH, Beckman JS: On the pH-dependent yield of hydroxyl radical products from peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 1994, 16(3):331-338.
57. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV: Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 1991, 10(5):339-352.
58. Orient A, Donko A, Szabo A, Leto TL, Geiszt M: Novel sources of reactive oxygen species in the human body. *Nephrol Dial Transplant* 2007, 22(5):1281-1288.

59. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL: Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, 280(5):E685-694.
60. 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(6):799-812.
61. Kohen R, Nyska A: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002, 30(6):620-650.
62. Blache D, Bouthillier D, Davignon J: Acute influence of smoking on platelet behaviour, endothelium and plasma lipids and normalization by aspirin. *Atherosclerosis* 1992, 93(3):179-188.
63. Serrano E, Diaz J, Acosta F, Palenciano CG, Parrilla P, Carbonell LF: Oxidative stress during ischemia-reperfusion in liver transplantation. *Transplant Proc* 2000, 32(8):2651.
64. Halliwell B, Gutteridge JM: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990, 186:1-85.
65. Soriani M, Pietraforte D, Minetti M: Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Arch Biochem Biophys* 1994, 312(1):180-188.
66. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90(17):7915-7922.
67. Loft S, Hogh Danielsen P, Mikkelsen L, Risom L, Forchhammer L, Moller P: Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochem Soc Trans* 2008, 36(Pt 5):1071-1076.
68. Kiener PA, Rankin BM, Davis PM, Yocum SA, Warr GA, Grove RI: Immune complexes of LDL induce atherogenic responses in human monocytic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, 15(7):990-999.
69. Ataman Iu O: [Intensity of lipid peroxydation and antioxidant enzyme activity in walls of the arteries and veins in monoiodacetate intoxication]. *Fiziol Zh* 2007, 53(4):49-53.
70. Dean RT, Hunt JV, Grant AJ, Yamamoto Y, Niki E: Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins. *Free Radic Biol Med* 1991, 11(2):161-168.
71. Brot N, Weissbach H: Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins. *Arch Biochem Biophys* 1983, 223(1):271-281.
72. Hoshi T, Heinemann S: Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol* 2001, 531(Pt 1):1-11.
73. Moskovitz J, Flescher E, Berlett BS, Azare J, Poston JM, Stadtman ER: Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in Saccharomyces cerevisiae and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(24):14071-14075.
74. Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman ER: Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev* 1999, 107(3):323-332.
75. Giulivi C, Traaseth NJ, Davies KJ: Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance. *Amino Acids* 2003, 25(3-4):227-232.
76. Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L, Taboga C: Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* 2001, 44(7):834-838.

77. Stadtman ER: Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 1993, 62:797-821.
78. Hashimoto M, Hsu LJ, Xia Y, Takeda A, Sisk A, Sundsmo M, Masliah E: Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/alpha-synuclein in vitro. *Neuroreport* 1999, 10(4):717-721.
79. Stadtman ER, Berlett BS: Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 1998, 30(2):225-243.
80. Pennathur S, Heinecke JW: Mechanisms for oxidative stress in diabetic cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal* 2007, 9(7):955-969.
81. Halliwell B: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994, 344(8924):721-724.
82. Darley-Usmar V, Halliwell B: Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharm Res* 1996, 13(5):649-662.
83. Harris ED: Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992, 6(9):2675-2683.
84. Harris ED, Percival SS: A role for ascorbic acid in copper transport. *Am J Clin Nutr* 1991, 54(6 Suppl):1193S-1197S.
85. Yamauchi R: Addition products of alpha-tocopherol with lipid-derived free radicals. *Vitam Horm* 2007, 76:309-327.
86. Halliwell B: Albumin--an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol* 1988, 37(4):569-571.
87. Moskovitz J, Berlett BS, Poston JM, Stadtman ER: The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(18):9585-9589.
88. Biteau B, Labarre J, Toledano MB: ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by S. cerevisiae sulphiredoxin. *Nature* 2003, 425(6961):980-984.
89. Freedman RB: Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell* 1989, 57(7):1069-1072.
90. de Oliveira BF, Costa DC, Nogueira-Machado JA, Chaves MM: beta-Carotene, alpha-tocopherol and ascorbic acid: differential profile of antioxidant, inflammatory status and regulation of gene expression in human mononuclear cells of diabetic donors. *Diabetes Metab Res Rev* 2013, 29(8):636-645.
91. Stoclet JC, Schini-Kerth V: [Dietary flavonoids and human health]. *Ann Pharm Fr* 2011, 69(2):78-90.
92. Pacifici RE, Davies KJ: Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology* 1991, 37(1-3):166-180.
93. Poppek D, Grune T: Proteasomal defense of oxidative protein modifications. *Antioxid Redox Signal* 2006, 8(1-2):173-184.
94. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P *et al*: RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999, 97(7):889-901.
95. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L: Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001, 44(2):129-146.
96. Gillery P: [Advanced glycation end products (AGEs), free radicals and diabetes]. *J Soc Biol* 2001, 195(4):387-390.
97. Lyons TJ: Glycation and oxidation: a role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1993, 71(6):26B-31B.

98. Janjic D, Maechler P, Sekine N, Bartley C, Annen AS, Wolheim CB: Free radical modulation of insulin release in INS-1 cells exposed to alloxan. *Biochem Pharmacol* 1999, 57(6):639-648.
99. Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR, Giugliano D: Advancing age and insulin resistance: new facts about an ancient history. *Eur J Clin Invest* 1999, 29(9):758-769.
100. Kopelman PG: Obesity as a medical problem. *Nature* 2000, 404(6778):635-643.
101. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A: Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol* 2014, 2:411-429.
102. Teillet L, Verbeke P, Gouraud S, Bakala H, Borot-Laloi C, Heudes D, Bruneval P, Corman B: Food restriction prevents advanced glycation end product accumulation and retards kidney aging in lean rats. *J Am Soc Nephrol* 2000, 11(8):1488-1497.
103. Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R *et al*: Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(25):13915-13920.
104. Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, Peppa M, Rayfield EJ: Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(24):15596-15601.
105. Wautier JL: [Advanced glycosylation end products or glycotoxins: under-evaluated components of diet?]. *Rev Prat* 2001, 51(13):1397-1399.
106. Gaens KH, Stehouwer CD, Schalkwijk CG: Advanced glycation endproducts and its receptor for advanced glycation endproducts in obesity. *Curr Opin Lipidol* 2013, 24(1):4-11.
107. Miyata T, Inagi R, Iida Y, Sato M, Yamada N, Oda O, Maeda K, Seo H: Involvement of beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis. Induction of human monocyte chemotaxis and macrophage secretion of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J Clin Invest* 1994, 93(2):521-528.
108. Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CA, Thornalley PJ: Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem J* 2002, 364(Pt 1):1-14.
109. Hammes HP, Hoerauf H, Alt A, Schleicher E, Clausen JT, Bretzel RG, Laqua H: N(epsilon)(carboxymethyl)lysin and the AGE receptor RAGE colocalize in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40(8):1855-1859.
110. Wells-Knecht KJ, Brinkmann E, Wells-Knecht MC, Litchfield JE, Ahmed MU, Reddy S, Zyzak DV, Thorpe SR, Baynes JW: New biomarkers of Maillard reaction damage to proteins. *Nephrol Dial Transplant* 1996, 11 Suppl 5:41-47.
111. Sell DR, Monnier VM: Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem* 1989, 264(36):21597-21602.
112. Hayase F, Nagaraj RH, Miyata S, Njoroge FG, Monnier VM: Aging of proteins: immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during maillard reaction in vivo. *J Biol Chem* 1989, 264(7):3758-3764.

113. **Yu PH, Zuo DM: Aminoguanidine inhibits semicarbazide-sensitive amine oxidase activity: implications for advanced glycation and diabetic complications. *Diabetologia* 1997, 40(11):1243-1250.**
114. **Miyata T, Kurokawa K, Van Ypersele De Strihou C: Advanced glycation and lipoxidation end products: role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *J Am Soc Nephrol* 2000, 11(9):1744-1752.**
115. **Wautier JL, Guillausseau PJ: Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metab* 2001, 27(5 Pt 1):535-542.**
116. **Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW: Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 1986, 261(11):4889-4894.**
117. **Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Bucala R: Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J Biol Chem* 1992, 267(8):5133-5138.**
118. **Zeng J, Davies MJ: Evidence for the formation of adducts and S-(carboxymethyl)cysteine on reaction of alpha-dicarbonyl compounds with thiol groups on amino acids, peptides, and proteins. *Chem Res Toxicol* 2005, 18(8):1232-1241.**
119. **Rondeau P, Bourdon E: The glycation of albumin: structural and functional impacts. *Biochimie* 2011, 93(4):645-658.**
120. **Miyazaki A, Nakayama H, Horiuchi S: Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products. *Trends Cardiovasc Med* 2002, 12(6):258-262.**
121. **Horiuchi S, Sakamoto Y, Sakai M: Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino Acids* 2003, 25(3-4):283-292.**
122. **Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H: CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products. *Ann N Y Acad Sci* 2001, 947:350-355.**
123. **Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Clauss M *et al*: Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 1992, 267(21):14987-14997.**
124. **Boulanger E, Wautier MP, Wautier JL, Boval B, Panis Y, Wernert N, Danze PM, Dequiedt P: AGEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression. *Kidney Int* 2002, 61(1):148-156.**
125. **Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D: Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999, 84(5):489-497.**
126. **Wautier JL, Grossin N: sRAGE and esRAGE. *Diabetes Metab* 2008, 34(6 Pt 1):631.**
127. **Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D: Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb* 1994, 14(10):1521-1528.**
128. **Poirier O, Nicaud V, Vionnet N, Raoux S, Tarnow L, Vlassara H, Parving HH, Cambien F: Polymorphism screening of four genes encoding advanced glycation end-product putative receptors. Association study with nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 2001, 50(5):1214-1218.**
129. **Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, Hori O, Stern D, Schmidt AM: Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in**

diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* 1996, 97(1):238-243.

130. Wautier JL, Schmidt AM: Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res* 2004, 95(3):233-238.

131. Wautier JL: [Hyperglycemia and atherosclerosis]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu* 2000:107-112.

132. Nakamura Y, Horii Y, Nishino T, Shiiki H, Sakaguchi Y, Kagoshima T, Dohi K, Makita Z, Vlassara H, Bucala R: Immunohistochemical localization of advanced glycosylation end products in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus. *Am J Pathol* 1993, 143(6):1649-1656.

133. Capron L, Blaes N, Wautier JL, Chapman J, Cambien F: [Up-date on atherosclerosis]. *J Mal Vasc* 1990, 15(4):380-389.

134. Tian XL, Li Y: Endothelial Cell Senescence and Age-Related Vascular Diseases. *J Genet Genomics* 2014, 41(9):485-495.

135. Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM: Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem* 1997, 272(28):17810-17814.

136. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D: Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 1994, 269(13):9889-9897.

137. Hartog JW, Voors AA, Bakker SJ, Smit AJ, van Veldhuisen DJ: Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. *Eur J Heart Fail* 2007, 9(12):1146-1155.

138. M.-P. Wautier FJT, J.-L. Wautier,: Advanced glycation end products: A risk factor for human health. *Ann Pharm Fr* 2014.

139. Szwergold BS: Fructosamine-6-phosphates are deglycated by phosphorylation to fructosamine-3,6-bisphosphates catalyzed by fructosamine-3-kinase (FN3K) and/or fructosamine-3-kinase-related-protein (FN3KRP). *Med Hypotheses* 2007, 68(1):37-45.

140. Szwergold BS, Beisswenger PJ: Enzymatic deglycation--a new paradigm or an epiphenomenon? *Biochem Soc Trans* 2003, 31(Pt 6):1428-1432.

141. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A: Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 1986, 232(4758):1629-1632.

142. Ruggiero-Lopez D, Lecomte M, Moinet G, Patereau G, Lagarde M, Wiernsperger N: Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem Pharmacol* 1999, 58(11):1765-1773.

143. Nakamura K, Yamagishi S, Adachi H, Kurita-Nakamura Y, Matsui T, Yoshida T, Sato A, Imaizumi T: Elevation of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in diabetic subjects with coronary artery disease. *Diabetes Metab Res Rev* 2007, 23(5):368-371.

144. Yamagishi S: [Role of advanced glycation end products (AGE) and soluble receptor for AGE (sRAGE) in vascular complications in diabetes]. *Nihon Rinsho* 2012, 70 Suppl 5:243-247.

145. Cohen MP, Sharma K, Jin Y, Hud E, Wu VY, Tomaszewski J, Ziyadeh FN: Prevention of diabetic nephropathy in db/db mice with glycated albumin antagonists. A novel treatment strategy. *J Clin Invest* 1995, 95(5):2338-2345.

146. Clements RS, Jr., Robison WG, Jr., Cohen MP: Anti-glycated albumin therapy ameliorates early retinal microvascular pathology in db/db mice. *J Diabetes Complications* 1998, 12(1):28-33.
147. Bourdon E, Blache D: The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal* 2001, 3(2):293-311.
148. Peters TJ: All about albumin - Biiochemistry, Genetics, and Medical Applications. San Diego: Academic Press; 1996.
149. Denis PS: mémoire sur le sang, ed. . *Be FilsParis* 1859.
150. Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS: Serum albumin. *Hepatology* 1988, 8(2):385-401.
151. Carter DC, Ho JX: Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem* 1994, 45:153-203.
152. Foster JF: Albumin Structure, Function and Uses. Oxford: Pergamon; 1977.
153. Wetzel R, Becker M, Behlke J, Billwitz H, Bohm S, Ebert B, Hamann H, Krumbiegel J, Lassmann G: Temperature behaviour of human serum albumin. *Eur J Biochem* 1980, 104(2):469-478.
154. Garlick RL, Mazer JS: The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo. *J Biol Chem* 1983, 258(10):6142-6146.
155. Lapolla A, Fedele D, Reitano R, Arico NC, Seraglia R, Traldi P, Marotta E, Tonani R: Enzymatic digestion and mass spectrometry in the study of advanced glycation end products/peptides. *J Am Soc Mass Spectrom* 2004, 15(4):496-509.
156. Marashi SA, Safarian S, Moosavi-Movahedi AA: Why major nonenzymatic glycation sites of human serum albumin are preferred to other residues? *Med Hypotheses* 2005, 64(4):881.
157. Iberg N, Fluckiger R: Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites. *J Biol Chem* 1986, 261(29):13542-13545.
158. 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(4):458-464.
159. Figge J, Rossing TH, Fencl V: The role of serum proteins in acid-base equilibria. *J Lab Clin Med* 1991, 117(6):453-467.
160. Waterlow JC: Kwashiorkor revisited: the pathogenesis of oedema in kwashiorkor and its significance. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984, 78(4):436-441.
161. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E: The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett* 2008, 582(13):1783-1787.
162. Sedlak TW, Saleh M, Higginson DS, Paul BD, Juluri KR, Snyder SH: Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106(13):5171-5176.
163. Carballal S, Alvarez B, Turell L, Botti H, Freeman BA, Radi R: Sulfenic acid in human serum albumin. *Amino Acids* 2007, 32(4):543-551.
164. 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(2):119-127.
165. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007, 87(1):315-424.
166. Carballal S, Radi R, Kirk MC, Barnes S, Freeman BA, Alvarez B: Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry* 2003, 42(33):9906-9914.

167. Turell L, Botti H, Carballal S, Ferrer-Sueta G, Souza JM, Duran R, Freeman BA, Radi R, Alvarez B: Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin. *Biochemistry* 2008, 47(1):358-367.
168. Oettl K, Stauber RE: Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol* 2007, 151(5):580-590.
169. Masuoka J, Hegenauer J, Van Dyke BR, Saltman P: Intrinsic stoichiometric equilibrium constants for the binding of zinc(II) and copper(II) to the high affinity site of serum albumin. *J Biol Chem* 1993, 268(29):21533-21537.
170. 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(12):2832-2838.
171. Appleton DW, Sarkar B: The absence of specific copper (II)-binding site in dog albumin. A comparative study of human and dog albumins. *J Biol Chem* 1971, 246(16):5040-5046.
172. Jacobsen C: Lysine residue 240 of human serum albumin is involved in high-affinity binding of bilirubin. *Biochem J* 1978, 171(2):453-459.
173. Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW: Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* 2005, 41(6):1211-1219.
174. Papatheodorou L, Weiss N: Vascular oxidant stress and inflammation in hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal* 2007, 9(11):1941-1958.
175. Kragh-Hansen U, Chuang VT, Otagiri M: Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull* 2002, 25(6):695-704.
176. Watanabe H, Tanase S, Nakajou K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M: Role of arg-410 and tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity. *Biochem J* 2000, 349 Pt 3:813-819.
177. Kragh-Hansen U: Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan Med Bull* 1990, 37(1):57-84.
178. Waldmann TA: Albumin structure, function and uses. New York: Pergamon Press; 1977.
179. Olsen H, Andersen A, Nordbo A, Kongsgaard UE, Bormer OP: Pharmaceutical-grade albumin: impaired drug-binding capacity in vitro. *BMC Clin Pharmacol* 2004, 4:4.
180. Yang F, Bian C, Zhu L, Zhao G, Huang Z, Huang M: Effect of human serum albumin on drug metabolism: structural evidence of esterase activity of human serum albumin. *J Struct Biol* 2007, 157(2):348-355.
181. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN: Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol* 1976, 12(6):1052-1061.
182. Joseph KS, Hage DS: The effects of glycation on the binding of human serum albumin to warfarin and L-tryptophan. *J Pharm Biomed Anal* 2010, 53(3):811-818.
183. Kratz F: Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release* 2008, 132(3):171-183.
184. McMenamy R, Oncley J: The Specific Binding of l-Tryptophan to Serum Albumin. *J Biol Chem* 1958, 233:1436-1447.
185. Anraku M, Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M: Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharm Res* 2001, 18(5):632-639.

186. Schulz M, Schmoldt A: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. *Pharmazie* 2003, 58(7):447-474.
187. Harper P, Harper J, Hill C: An audit of anticoagulant management to assess anticoagulant control using decision support software. *BMJ Open* 2014, 4(9):e005864.
188. Bi S, Yan L, Sun Y, Zhang H: Investigation of ketoprofen binding to human serum albumin by spectral methods. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2011, 78(1):410-414.
189. Lagrange F, Penhourcq F, Matoga M, Bannwarth B: Binding of ketoprofen enantiomers in various human albumin preparations. *J Pharm Biomed Anal* 2000, 23(5):793-802.
190. Manoharan I, Boopathy R: Diisopropylfluorophosphate-sensitive aryl acylamidase activity of fatty acid free human serum albumin. *Arch Biochem Biophys* 2006, 452(2):186-188.
191. Masson P, Froment MT, Darvesh S, Schopfer LM, Lockridge O: Aryl acylamidase activity of human serum albumin with o-nitrotrifluoroacetanilide as the substrate. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2007, 22(4):463-469.
192. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P: Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med* 2012, 33(3):209-290.
193. Takahashi H, Maeda M, Sawa H, Hasegawa H, Moriyama M, Sata T, Hall WW, Kurata T: Dicer and positive charge of proteins decrease the stability of RNA containing the AU-rich element of GM-CSF. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 340(3):807-814.
194. Gerasimova YV, Knorre DD, Shakirov MM, Godovikova TS: Human serum albumin as a catalyst of RNA cleavage: N-homocysteinylation and N-phosphorylation by oligonucleotide affinity reagent alter the reactivity of the protein. *Bioorg Med Chem Lett* 2008, 18(20):5396-5398.
195. Cha MK, Kim IH: Disulfide between Cys392 and Cys438 of human serum albumin is redox-active, which is responsible for the thioredoxin-supported lipid peroxidase activity. *Arch Biochem Biophys* 2006, 445(1):19-25.
196. Means GE, Bender ML: Acetylation of human serum albumin by p-nitrophenyl acetate. *Biochemistry* 1975, 14(22):4989-4994.
197. Quon CY, Mai K, Patil G, Stampfli HF: Species differences in the stereoselective hydrolysis of esmolol by blood esterases. *Drug Metab Dispos* 1988, 16(3):425-428.
198. Burch JW, Blazer-Yost B: Acetylation of albumin by low doses of aspirin. *Thromb Res* 1981, 23(4-5):447-452.
199. Ikeda K, Kurono Y: [Enzymatic activity and drug binding activity of human serum albumin]. *Yakugaku Zasshi* 1986, 106(10):841-855.
200. Rainsford KD, Ford NL, Brooks PM, Watson HM: Plasma aspirin esterases in normal individuals, patients with alcoholic liver disease and rheumatoid arthritis: characterization and the importance of the enzymic components. *Eur J Clin Invest* 1980, 10(5):413-420.
201. He XM, Carter DC: Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 1992, 358(6383):209-215.
202. Walker JE: Lysine residue 199 of human serum albumin is modified by acetylsalicyclic acid. *FEBS Lett* 1976, 66(2):173-175.
203. Kurono Y, Maki T, Yotsuyanagi T, Ikeda K: Esterase-like activity of human serum albumin: structure-activity relationships for the reactions with phenyl acetates and p-nitrophenyl esters. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1979, 27(11):2781-2786.

204. Ohta N, Kurono Y, Ikeda K: Esterase-like activity of human serum albumin II: reaction with N-trans-cinnamoylimidazoles. *J Pharm Sci* 1983, 72(4):385-388.
205. Schmitt A, Schmitt J, Munch G, Gasic-Milencovic J: Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. *Anal Biochem* 2005, 338(2):201-215.
206. 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, 10:1467-1477.
207. Rondeau P, Navarra G, Cacciabaudo F, Leone M, Bourdon E, Militello V: Thermal aggregation of glycated bovine serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 2010.
208. Guerin-Dubourg A, Catan A, Bourdon E, Rondeau P: Structural modifications of human albumin in diabetes. *Diabetes Metab* 2012, 38(2):171-178.
209. Sattarahmady N, Moosavi-Movahedi AA, Habibi-Rezaei M, Ahmadian S, Saboury AA, Heli H, Sheibani N: Detergency effects of nanofibrillar amyloid formation on glycation of human serum albumin. *Carbohydr Res* 2008, 343(13):2229-2234.
210. Brownlee M: The pathological implications of protein glycation. *Clin Invest Med* 1995, 18(4):275-281.
211. Roohk HV, Zaidi AR: A review of glycated albumin as an intermediate glycation index for controlling diabetes. *J Diabetes Sci Technol* 2008, 2(6):1114-1121.
212. Ichikawa H, Nagake Y, Takahashi M, Nakazono H, Kawabata K, Shikata K, Makino H: What is the best index of glycemic control in patients with diabetes mellitus on hemodialysis? *Nihon Jinzo Gakkai Shi* 1996, 38(7):305-308.
213. Panzer S, Kronik G, Lechner K, Bettelheim P, Neumann E, Dudczak R: Glycosylated hemoglobins (GHb): an index of red cell survival. *Blood* 1982, 59(6):1348-1350.
214. Chen S, Cohen MP, Ziyadeh FN: Amadori-glycated albumin in diabetic nephropathy: pathophysiologic connections. *Kidney Int Suppl* 2000, 77:S40-44.
215. Bourdon E, Loreau N, Blache D: Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *Faseb J* 1999, 13(2):233-244.
216. Kimzey MJ, Yassine HN, Riepel BM, Tsaprailis G, Monks TJ, Lau SS: New site(s) of methylglyoxal-modified human serum albumin, identified by multiple reaction monitoring, alter warfarin binding and prostaglandin metabolism. *Chem Biol Interact* 2011, 192(1-2):122-128.
217. Takatsy A, Boddi K, Nagy L, Nagy G, Szabo S, Marko L, Wittmann I, Ohmacht R, Ringer T, Bonn GK *et al*: Enrichment of Amadori products derived from the nonenzymatic glycation of proteins using microscale boronate affinity chromatography. *Anal Biochem* 2009, 393(1):8-22.
218. Zhang WJ, Frei B: Albumin selectively inhibits TNF alpha-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2002, 55(4):820-829.
219. Nohe B, Dieterich HJ: A different view on human albumin. *Cardiovasc Res* 2003, 58(3):721-722; author reply 723-724.
220. Faure P, Troncy L, Lecomte M, Wiernsperger N, Lagarde M, Ruggiero D, Halimi S: Albumin antioxidant capacity is modified by methylglyoxal. *Diabetes Metab* 2005, 31(2):169-177.

221. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985, 150(1):76-85.

222. Ellman GL: Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959, 82(1):70-77.

223. Snyder SL, Sobocinski PZ: An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Anal Biochem* 1975, 64(1):284-288.

224. Mooradian AD, Lung CC, Pinnas JL: Glycosylation enhances malondialdehyde binding to proteins. *Free Radic Biol Med* 1996, 21(5):699-701.

225. 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* 2013, 1830(6):3532-3541.

226. Spector AA: Fatty acid binding to plasma albumin. *J Lipid Res* 1975, 16(3):165-179.

227. Belgacem O, Stubiger G, Allmaier G, Buchacher A, Pock K: Isolation of esterified fatty acids bound to serum albumin purified from human plasma and characterised by MALDI mass spectrometry. *Biologicals* 2007, 35(1):43-49.

228. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL: 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* 2002, 50(16):4437-4444.

229. Prusiner SB, DeArmond SJ: Prion diseases and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 1994, 17:311-339.

230. Brownlee M: Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 1995, 46:223-234.

231. Zheng Y, Li XK, Wang Y, Cai L: The role of zinc, copper and iron in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications: therapeutic effects by chelators. *Hemoglobin* 2008, 32(1-2):135-145.

232. Wolff SP: Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull* 1993, 49(3):642-652.

233. Navarra G, Giacomazza D, Leone M, Librizzi F, Militello V, San Biagio PL: Thermal aggregation and ion-induced cold-gelation of bovine serum albumin. *Eur Biophys J* 2009.

234. Navarra G, Tinti A, Leone M, Militello V, Torreggiani A: Influence of metal ions on thermal aggregation of bovine serum albumin: aggregation kinetics and structural changes. *J Inorg Biochem* 2009, 103(12):1729-1738.

235. Masuoka J, Saltman P: Zinc(II) and copper(II) binding to serum albumin. A comparative study of dog, bovine, and human albumin. *J Biol Chem* 1994, 269(41):25557-25561.

236. Valko M, Morris H, Cronin MT: Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005, 12(10):1161-1208.

Stress oxydant et pathologie diabétique à l'île de La Réunion – Identification et caractérisation des propriétés structurales et fonctionnelles de l'albumine glyquée.

Résumé

La glycoxydation est un processus délétère directement impliqué dans la pathologie diabétique. Ce phénomène touche principalement les protéines circulantes. Une des cibles majoritaires de ce phénomène est l'albumine, protéine plasmatique la plus abondante. Cette protéine se trouve être un puissant protecteur contre le stress oxydant. L'albumine est aussi directement impliquée dans les processus pharmacologiques de par ses importantes propriétés de transport, notamment de médicaments.

L'objectif de ce travail de thèse vise une meilleure compréhension du phénomène de glycoxydation dans le diabète. Pour cela, les conséquences fonctionnelles et physiologiques liées aux altérations structurales et biochimiques de l'albumine glyquée ont été étudiées, à travers la comparaison d'un modèle d'albumine glyquée *in vivo* purifiée de patients diabétiques avec celui correspondant à la protéine glyquée par un processus *in vitro*.

Notre étude montre des modifications de type structural et oxydatif attestées par des mesures de fluorescence (accessibilité du tryptophane) et de groupements spécifiques comme les fructosamines, les amines primaires, résidus thiols et carbonyles. D'un point de vue fonctionnel, l'albumine glyquée purifiée de patients diabétiques exerce, sur des cultures cellulaire, un effet proinflammatoire et prooxydant, encore plus marqué que ne le fait l'albumine glyquée in vitro. Egalement, les capacités de liaison de l'albumine avec les médicaments ainsi que l'activité estérase diminuent avec le phénomène de glycation. Nous avons précisé aussi le rôle des métaux dans le processus de glycation de l'albumine et montré un effet potentialisateur de ces derniers dans les phénomènes de dénaturation, d'agrégation et d'oxydation de la protéine. Les résultats de cette étude apportent de nouveaux éléments de compréhension sur le phénomène de glycation de l'albumine tel qui pourrait apparaitre dans la pathologie diabétique et ouvre de nouvelles pistes d'études sur l'impact réel que pourraient exercer les AGEs issus de l'albumine dans des désordres physiologiques inhérents à cette pathologie.

Mots clés : glycation, glycoxydation, albumine, stress oxydant, diabète, médicaments, métaux

Oxidant stress and diabetes – Deciphering structural and functional impacts of glycoxidation on human albumin.

Abstract

Albumin constitutes the major circulating protein in blood and represents a very beneficial biological actor through its multifunctional properties such as antioxidant activities and drug binding capacities. But, in hyperglycemic conditions, such as those encountered in diabetes, albumin can undergo glycoxidative modifications which may impact the protein quality.

Objectives of my thesis were to clarify the impact of glycoxidative 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 structural and oxidative modifications were found to be enhanced in in vitro glycoxidized HSA and albumin purified from diabetics, after determination of their free thiol group content, relative electrophoretic migration, carbonyl content, fructosamines and antioxidant activities. In addition, glycoxidized albumins exhibited impaired pharmaceutic molecule binding capacities and reduced esterase activities. Also, cells treated with glycoxidized albumin purified from diabetics, exhibited a proinflammatory state even more exacerbated than those incubated with in vitro glycated albumins. We evidenced the triggering action of metals (copper and iron) on glycoxidative-induced modifications in albumin.

This work needs further studies and opens doors to many perspectives aiming to reach a better understanding of glycoxidative modification of albumin in diabetic patients.

Key words: glycation, glycoxydation, albumin, oxidative stress, diabetes, therapeutic drugs, metals