



**HAL**  
open science

# Etude des effets de la glycation sur les interactions protéine-ligand dans le cadre du diabète et de l'athérosclérose : la liaison entre l'albumine et le liraglutide et entre l'apolipoprotéine A1 et ses partenaires de liaison

Marie Angélique Gajahi Soudahome

## ► To cite this version:

Marie Angélique Gajahi Soudahome. Etude des effets de la glycation sur les interactions protéine-ligand dans le cadre du diabète et de l'athérosclérose : la liaison entre l'albumine et le liraglutide et entre l'apolipoprotéine A1 et ses partenaires de liaison. Santé. Université de la Réunion, 2018. Français. NNT : 2018LARE0009 . tel-01880956

**HAL Id: tel-01880956**

**<https://theses.hal.science/tel-01880956>**

Submitted on 25 Sep 2018

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

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

## **Université de la Réunion**

### **THESE**

Pour l'obtention du titre de Docteur en Sciences de l'Université de la Réunion

**Spécialité : BIOCHIMIE**

**Présentée par : Angélique GAJAH SOUDAHOME**

**Etude des effets de la glycation sur les interactions protéine-ligand dans le cadre du diabète et de l'athérosclérose : la liaison entre l'albumine et le liraglutide et entre l'apolipoprotéine A1 et ses partenaires de liaison.**

**Soutenue publiquement le 27 Juin 2018**

#### **Composition du Jury :**

Pr Philippe GILLERY	Professeur et Praticien Hospitalier, CHU Reims	Rapporteur
Dr Muriel DELEPIERRE	Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris	Rapporteur
Pr Frédéric TESSIER	Professeur Faculté de Médecine Lille 2	Examinateur
Pr Estelle NOBECOURT	Professeur et Praticien Hospitalier, CHU Réunion	Examinatrice
Dr Florence PINET	Directeur de Recherche, INSERM U1167, Lille	Examinatrice
Dr Philippe RONDEAU	Ingénieur de Recherche, Université de la Réunion	Directeur de thèse
Dr Joël COUPRIE	Maitre de conférences, Université de La Réunion	Encadrant



## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES .....	3
Remerciements .....	13
Liste des abréviations .....	17
Liste des figures .....	21
Liste des tableaux .....	25
Introduction .....	27
Contexte bibliographique .....	31
I. Le diabète et l'athérosclérose : deux pathologies étroitement liées .....	33
A. Le diabète .....	33
1. Le diabète hier et aujourd'hui .....	33
a) Définition et diagnostic du diabète .....	33
b) La répartition du diabète en France et dans le monde .....	34
2. Caractéristiques et causes du diabète .....	35
a) Les diabètes sucrés de type 1 et de type 2 .....	35
b) Les facteurs de risque du diabète .....	36
3. Physiologie de la glycorégulation et physiopathologie diabétique .....	38
a) Les mécanismes de régulation de la glycémie .....	38
b) Le diabète et ses conséquences métaboliques .....	41
4. La glycation : une conséquence de l'hyperglycémie .....	43
a) Définition de la glycation .....	43
b) La glycation chez le patient diabétique .....	44
c) L'hémoglobine glyquée .....	45
5. Les traitements du diabète de type 2 et ses complications .....	47
a) Les traitements classiques du diabète .....	47
b) Le liraglutide et les analogues du GLP-1 .....	49

c)	L'atteinte vasculaire, principale cause des complications du diabète .....	51
B.	L'athérosclérose .....	53
1.	Les caractéristiques de l'athérosclérose .....	53
a)	L'athérosclérose, une maladie artérielle.....	53
b)	L'athérosclérose, une maladie évolutive.....	54
c)	L'athérosclérose et le « mauvais cholestérol ».....	54
2.	Le métabolisme des lipoprotéines .....	55
a)	Les lipoprotéines .....	55
b)	Les trois voies principales du métabolisme des lipoprotéines .....	58
3.	La pathogénèse de l'athérosclérose .....	60
a)	La lésion de l'endothélium artériel.....	61
b)	La réaction inflammatoire .....	61
c)	La fibrose et la sclérose de la plaque.....	62
d)	L'angiogenèse et l'hémorragie intraplaque.....	62
e)	La rupture de la plaque et la formation du thrombus .....	62
4.	Les facteurs de risque, les traitements et la prévention de l'athérosclérose.....	63
a)	L'hypertension et l'hypercholestérolémie : principaux facteurs proathérogènes .....	63
b)	Les traitements de l'athérosclérose .....	64
5.	Le lien entre le diabète et l'athérosclérose .....	67
a)	Le diabète : un facteur de risque indépendant de l'athérosclérose.....	67
b)	Rôle des AGE dans la pathogénèse de l'athérosclérose.....	67
c)	La glycation et l'oxydation des LDL .....	69
d)	L'hyperglycémie : un facteur aggravant de l'athérosclérose .....	69
II.	L'albumine et l'apolipoprotéine A1 : deux protéines exposées à l'hyperglycémie.....	71
A.	L'albumine .....	71
1.	Introduction .....	71

2.	Les propriétés de l'albumine.....	71
a)	Structure générale de l'albumine.....	71
b)	La synthèse de l'albumine.....	72
c)	L'albumine et les maladies.....	72
3.	Les rôles de l'albumine.....	73
a)	Le maintien de la pression oncotique.....	73
b)	Structure de l'albumine : une protéine adaptée à la liaison de ligands diversifiés .....	73
c)	Le rôle protecteur de l'albumine.....	74
d)	La fonction de transport.....	76
4.	La glycation de l'albumine.....	77
a)	Les modifications structurales de l'albumine glyquée.....	78
b)	Les conséquences physiologiques de la glycation de l'albumine.....	79
c)	L'effet de la glycation de l'albumine sur son interaction avec ses ligands.....	79
B.	L'Apolipoprotéine A1.....	80
1.	Introduction.....	80
2.	Les propriétés de l'ApoA1.....	81
a)	Structure de l'apoA1 native.....	81
b)	Les différentes formes de l'ApoA1.....	83
c)	L'importance de l'ApoA1 dans la composition des HDL.....	83
3.	Le rôle de l'ApoA1 dans la formation et la fonction des HDL.....	84
a)	La formation des HDL à partir de l'ApoA1 libre.....	84
b)	Les propriétés des HDL et l'implication de l'ApoA1.....	85
c)	Les propriétés des HDL attribuées aux constituants autres que l'ApoA1.....	86
d)	Les ligands de l'ApoA1.....	88
4.	La glycation de l'ApoA1.....	89
a)	Les modifications structurales de l'ApoA1 glyquée.....	89

b)	Les conséquences de la glycation sur la fonctionnalité de l'ApoA1 et des HDL	90
c)	L'ApoA1, les HDL et le développement du diabète et de l'athérosclérose	91
III.	Les interactions protéine-ligand et les méthodes d'étude	93
A.	Les mécanismes d'une interaction protéine-ligand	93
1.	Les propriétés de liaisons des protéines	93
2.	Cinétique et thermodynamique des interactions	95
a)	La cinétique d'une liaison protéine-ligand	95
b)	L'aspect thermodynamique d'une interaction protéine-ligand	96
3.	Les modèles d'interactions protéine-ligand	97
a)	Les trois modèles de la reconnaissance moléculaire	97
b)	Les modèles théoriques de liaison	98
4.	Les facteurs pouvant moduler une interaction	102
B.	Les méthodes d'étude d'interaction protéine-ligand	103
1.	Les méthodes courantes pour l'étude des interactions	103
a)	La dialyse à l'équilibre	103
b)	La fluorescence	104
c)	La résonance plasmonique de surface (biacore)	106
2.	La résonance magnétique nucléaire : une méthode biophysique	107
a)	Le principe de base de la RMN	108
b)	La RMN comme méthode d'étude des interactions protéine-ligand	112
3.	La microcalorimétrie : une méthode thermodynamique	118
a)	Le principe de l'ITC (isothermal titration microcalorimetry)	118
b)	Détermination des paramètres thermodynamiques et de liaison par ITC	119
	Objectifs	121
	Résultats des travaux de recherche	125

I. Etude des effets de la glycation de l'albumine sur son interaction avec le liraglutide, un médicament de plus en plus utilisé dans le traitement du diabète.....	127
<i>Introduction</i> .....	127
<i>Résultats principaux</i> .....	128
Article.....	129
<i>Expérimentations associées à l'étude de la liaison albumine-liraglutide</i> .....	145
1. Etude préliminaire sur l'insuline détémir et le liraglutide.....	145
a) Le quenching de fluorescence.....	145
b) Le marquage du détémir et du liraglutide au <sup>19</sup> F.....	146
2. Recherche d'un témoin négatif n'interagissant pas avec les ligands d'étude .....	148
a) Le lysozyme et l'avidine induisent la précipitation du liraglutide.....	149
b) La $\beta$ -lactoglobuline A n'interagit pas avec le détémir mais avec le liraglutide	149
3. Autres approches expérimentales utilisées pour l'étude d'interaction.....	150
a) La dialyse à l'équilibre.....	150
b) Autres méthodes basées sur la RMN pour l'étude de l'interaction.....	156
c) La titration microcalorimétrique isotherme.....	161
<i>Discussion</i> .....	163
II. Production de l'Apolipoprotéine A1 recombinante pour l'étude de l'effet de la glycation l'interaction de sa forme libre ou de sa forme HDL avec des partenaires de liaisons. ....	166
<i>Introduction</i> .....	166
<i>Objectifs</i> .....	166
<i>Résultats de la partie II</i> :.....	167
1. Etude et limitations des méthodes de recombinaison classique et du système GATEWAY pour la synthèse de l'ApoA1 recombinante.....	167
a) La méthode classique par recombinaison de plasmides.....	169
b) La technologie de clonage GATEWAY.....	170
c) Expression de l'ApoA1r chez <i>Clearcoli</i> à partir des plasmides recombinaison par la méthode GATEWAY.....	176

d) Production de l'ApoA1r marquée et non marquée avec étiquette His, à partir d'un plasmide recombinant à codons optimisés .....	182
2. Analyse de l'ApoA1 marquée <sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C par RMN et reconstitution de HDL .....	186
a) Caractérisation structurale de l'ApoA1r marquée par RMN et reconstitution de HDL.....	189
b) Evaluation de la fonctionnalité de l'ApoA1r et des HDLr.....	195
3. Etude des effets de la glycation des HDL sur l'interaction avec les partenaires de liaison .....	196
a) La glycation de l'ApoA1 et des HDL .....	197
b) Les conditions requises pour l'expérimentation en ITC .....	200
c) L'alpha-1-antitrypsine .....	200
d) La sphingosine-1-phosphate.....	201
e) Les microARN .....	202
<i>Discussion</i> .....	203
<i>Conclusion générale</i> .....	207
<i>Perspectives</i> .....	210
Bibliographie.....	213





*A ma mère Luciane,*



## Remerciements

*Je remercie le Docteur Olivier Meilhac, directeur de l'UMR DéTROU (INSERM U1188), ainsi qu'au Docteur Christian Lefebvre d'Hellencourt, directeur du laboratoire GEICO (ex-DéTROU) de m'avoir accueillie au sein de l'Unité et de m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse.*

*J'adresse ma plus profonde reconnaissance à mon directeur de thèse, Dr Philippe Rondeau. Je ne saurais comment te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi, tout le temps et l'énergie que tu as investis, c'est grâce à toi si j'ai pu arriver au bout de ce travail de thèse.*

*Je remercie également mon encadrant, Dr Joël Couprie. Je tiens à t'exprimer ma sincère reconnaissance pour la confiance que tu m'as accordée pour le master puis pour la thèse et pour m'avoir aidée et encouragée en particulier pendant la période de rédaction. Merci pour ta patience, ta bonne humeur, ton sourire et ta gentillesse.*

*J'adresse mes sincères et respectueux remerciements aux personnalités scientifiques qui ont accepté d'évaluer et juger ce travail de thèse : Monsieur Philippe Gillery, Madame Muriel Delepierre, Monsieur Frédéric Tessier, Madame Estelle Nobécourt et Madame Florence Pinet.*

*Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail de thèse. Je remercie en particulier Catherine Simenel et Muriel Delepierre qui nous ont permis de réaliser des expériences de RMN du fluor-19 à un stade préliminaire de ce projet. Je remercie également Monsieur Xavier Debussche pour avoir partagé ses observations cliniques sur le traitement de patients diabétiques.*

*Je remercie de tout mon cœur Aurélie Catan, ma super voisine de bureau mais pas seulement. J'ai beaucoup appris grâce à toi, tu es une fille incroyable, pleine de talents, et toujours prête à aider les autres. Merci infiniment pour ton amitié, ton soutien, tes conseils, ta patience, ta gentillesse...*

*Je remercie également Pierre Giraud. Je te suis reconnaissante, pour tout ce que tu m'as appris. J'ai eu grand plaisir à travailler avec toi. Merci pour ta patience, ta disponibilité et ta bonne humeur.*

*Je remercie tous les membres de mon comité de suivi de thèse, en particulier le Dr Fabrice Gardebien, qui a été mon professeur depuis la licence. Merci pour vos encouragements et vos conseils bienveillants.*

*A mes chers stagiaires de master 1, Maxime Desvergues, Nina Chauvière, Franck Gnankou et Sarah Rosanally. Merci pour votre amitié et tous ces moments enrichissants que nous avons partagés.*

*Je remercie le Dr Emmanuel Bourdon pour son éternelle bienveillance envers tous et en particulier les doctorants et pour ses corrections sur mon premier article. Merci pour tout Manu.*

*Je remercie également le Dr Wildriss Viranaïckèn. Merci pour tout ce que tu m'as appris en stage de master 1. Merci pour ta disponibilité, ton écoute, tes conseils, ton humour et tes encouragements qui m'ont particulièrement aidée dans les périodes de doute.*

*Un grand merci également à ceux qui me soutiennent au quotidien et qui ont ainsi grandement participé à l'aboutissement de mon travail de thèse :*

*Je remercie particulièrement mon amie Latufa. Ton amitié est pour moi une pure bénédiction, la lumière qui m'a éclairée tout au long de cette laborieuse aventure, tu as été l'ange gardien de ma thèse depuis mon premier jour de manipe... j'en suis remplie de gratitude...*

*A tous mes amis et amies doctorants, merci pour nos moments partagés, nos confidences, notre amitié.*

*A toutes les personnes que j'ai côtoyées sur la plateforme CYROI, merci pour votre amitié, votre soutien et votre sourire.*

*Un grand merci à mon amie Alexandrine, ma petite coach motivation...*

*Merci à ma collègue du lycée Bellepierre, Lydia Emmanuelle qui m'a soutenue en cette fin de thèse.*

*Mes plus profonds remerciements s'adressent à ma mère. Maman, mon Soleil d'Amour Divin, te voir sourire est ma plus grande joie, te rendre fière est ma plus profonde satisfaction, c'est à toi que je dédie ma thèse de doctorat.*

*A ma sœur Mélissa. Ma merveilleuse petite sœur, mon plus beau cadeau, merci infiniment d'exister et d'être là, toujours, pour me soutenir, me guider, me redonner confiance en moi, peu importe la distance, tu es là à chaque fois pour me tenir la main dans les moments importants et pour tout partager... mes peurs, mes doutes, mes espoirs, mes efforts, ma persévérance, et ma réussite... je t'aime plus que tout...*

*A ma sœur Delphine. Ma grande sœur chérie, tu m'as appris à lire avec "Buldo" tu m'as donné le goût d'apprendre et la soif de savoir, sans toi je n'aurai pas eu la foi de continuer jusqu'au doctorat, merci Nénène d'avoir toujours cru en moi. Merci à Solal, mon neveu adoré, tu as mis du soleil dans la fin de thèse de tatie Angie.*

*A mon père. Merci Papa de toujours veiller sur moi et me soutenir de là où tu es.*

*A Djamel. Mon mari, mon meilleur ami, tu sais combien ta présence illumine mon quotidien, en particulier dans les moments difficiles où tu as toujours les mots qu'il faut pour me redonner confiance.*

*A ma Marraine Sabrina, ma bonne fée, merci pour ton soutien et ta présence dans tous les aspects de ma vie, et en particulier pour ma thèse. Merci pour tout Marraine.*

*A mon Parrain Bertrand, merci pour ta présence dans ma vie et tes bénédictions qui m'accompagnent toujours et à chaque étape.*

*A ma cousine Audrey, merci de toujours croire en moi, merci pour ta gentillesse, ton soutien et tes encouragements.*

*Merci à toute ma famille et amis de la famille et à mon adorable belle-famille qui m'ont toujours soutenue sur les longs chemins de la réussite.*



## Liste des abréviations

ABCA1 : ATP-binding cassette 1

AGE : produits avancés de glycation (Advanced Glycation-End products)

Apo : apolipoprotéine protéine

ApoA1M : ApoA1 Milano

AVC : accidents vasculaires cérébraux

DEPC : diethyl-pyrocarbonate

DPP-4 : dipeptidylpeptidase-4

GIP : Gastric Inhibiting Peptide

GLP-1: Glucagon-like peptide-1

GLUT4 : transporteur de glucose 4

GSH : glutathion réduit

GSSG : glutathion oxydé

HbA1c : hémoglobine glyquée

HDL : high Density lipoprotein (lipoprotéine de haute densité)

HSA : albumine de sérum humain (Human Serum Albumin)

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence

ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1

IDL : intermediate density lipoprotein

IL : interleukine

IMC : indice de masse corporelle

ITC : Titration Calorimétrique Isotherme

$K_a$  : constante d'association

$K_d$  : constante de dissociation

LCAT : lecithin cholesterol acyl transferase

LDL : Lipoprotéine de basse densité (Low density lipoprotein)

LPL : lipoprotéine lipase

MCP-1 : Monocyte chemotactic protein-1

MG-H1 : hydroimidazolone

MGO : méthylglyoxal

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide H

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate H

NF- $\kappa$ B : facteur nucléaire  $\kappa$ B

NO : oxyde nitrique

NusA : N utilisation substance protein A

OGTT : test oral de tolérance au glucose (oral glucose tolerance test)

PBS : Phosphate buffered saline

PKC : kinase C

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine

ppm : partie par millions

RAGE : Récepteurs aux AGE

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)

S1P: sphingosine-1-phosphate

SDS-PAGE : Sodium dodécylsulfate - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

S-ETFA : S-éthyltrifluorothioacétate

TFA : trifluoroacétate

TNF-  $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor alpha)

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1

VLDL : very low density lipoprotein

$\alpha$ 1AT : alpha-1 antitrypsine



## Liste des figures

Figure 1: Répartition du diabète dans le monde.....	34
Figure 2 : Métabolisme du glucose .....	39
Figure 3: Structure de la proinsuline.....	40
Figure 4 : Déplétion en NADPH,H <sup>+</sup> et la voie des polyols .....	43
Figure 5: La formation des AGE.....	44
Figure 6 : Structure du glyoxal, du méthylglyoxal et de la 3-désoxyglucosone .....	45
Figure 7 : Structure tridimensionnelle de l'hémoglobine native.....	46
Figure 8: Structure primaire de l'insuline humaine (A) et de l'insuline détémir (B).....	48
Figure 9: Les analogues du GLP-1 .....	49
Figure 10: Schéma de la structure d'une artère saine et de l'athérosclérose.....	54
Figure 11: La composition des différents types de lipoprotéines.....	56
Figure 12: Les différents types de HDL.....	57
Figure 13 : Le métabolisme des lipoprotéines. ....	58
Figure 14 : La formation de la plaque d'athérome.....	60
Figure 15: Les microARN connus pour leur implication dans l'athérogénèse.....	66
Figure 16: La contribution AGE dans l'athérosclérose via l'interaction avec RAGE.....	68
Figure 17: Pathogénèse des maladies cardiovasculaires dans un contexte diabétique. ....	70
Figure 18 : Structure cristallographique de l'albumine humaine.....	72
Figure 19: Structure de l'albumine humaine cristallisée (HSA) et les sites de Sudlow .....	74
Figure 20 : Les principaux sites de l'albumine .....	76
Figure 21: Principales structures d'AGE reportés pour l'albumine humaine glyquée. ....	78
Figure 22: Structure cristallisée de l'ApoA1 humaine délipidée.....	81
Figure 23 : Structure de l'ApoA1 humaine au sein d'une lipoprotéine de haute densité. ....	82
Figure 24 : Structure cristallisée de la forme tronquée de l'ApoA1 humaine.....	82
Figure 25 : La maturation des HDL. ....	85
Figure 26 : Les activités biologiques majeures des HDL.....	87
Figure 27 : Le réseau d'interaction protéique autour de l'ApoA1. ....	89
Figure 28 : La glycation accélère la dégradation des HDL.....	91
Figure 29 : Les principaux facteurs communs à la résistance à l'insuline et l'athérosclérose....	92
Figure 30 : Les quatre niveaux structuraux des protéines.....	93
Figure 31 : Les interactions stabilisant la structure d'une protéine.....	94

Figure 32 : Schéma illustrant les trois principaux modèles d'interaction protéine-ligand.....	98
Figure 33 : Représentation de Scatchard d'une liaison à un site.....	99
Figure 34 : Représentation de Scatchard d'une liaison à plusieurs site ayant la même affinité. 99	
Figure 35 : Représentation graphique de l'équilibre d'une liaison coopérative.....	101
Figure 36 : Principe de la dialyse à l'équilibre.....	104
Figure 37 : Quenching de fluorescence de l'albumine.....	105
Figure 38 : Graphique d'analyse des données de quenching de fluorescence. ....	106
Figure 39 : Schéma du principe de la résonance plasmonique de surface .....	107
Figure 40 : Analogie entre le spin d'un noyau et la rotation d'une charge. ....	108
Figure 41 : Niveaux d'énergie des états de spin en fonction de $B_0$ . ....	109
Figure 42 : Représentation de la relaxation.....	110
Figure 43 : Spectre RMN de l'éthanol. ....	112
Figure 44 : Profil de titration par RMN typique d'une interaction protéine-ligand.....	113
Figure 45 : Principe de base de la titration par RMN d'un ligand fluoré par une protéine.....	114
Figure 46 : Schéma de l'expérience RMN de différence de transfert de saturation. ....	115
Figure 47 : DOSY (Diffusion Ordered SpectroscopY).....	116
Figure 48 : Principe de la méthode FAXS. ....	117
Figure 49 : Analyse d'un titrage protéine-ligand par la mesure de $T_2$ .....	118
Figure 50 : Principe de l'appareil ITC et traitement des données.....	120
Figure 51 : Structure moléculaire du liraglutide. ....	127
Figure 52 : Etude de l'albumine glyquée in vitro.....	128
Figure 53 : Etude de l'albumine extraite de plasma de témoins et de patients diabétiques. ....	129
Figure 54 : Spectres d'émission de fluorescence de l'albumine humaine. ....	146
Figure 55 : Spectres RMN du $^{19}\text{F}$ du liraglutide et du détémir. ....	147
Figure 56 : Analyse RMN de l'interaction du liraglutide avec l'avidine et le lysozyme.....	149
Figure 57 : Analyse de l'interaction du liraglutide et du détémir avec la $\beta$ -lactoglobuline A. ....	149
Figure 58 : Dialyse à l'équilibre pour le liraglutide. ....	152
Figure 59 : Analyse des résultats de la chromatographie d'exclusion pour le liraglutide. ....	153
Figure 60 : Spectre DLS du liraglutide. ....	155
Figure 61 : Titration du liraglutide marquée au $^{19}\text{F}$ avec l'albumine humaine G0 délipidée....	157
Figure 62 : Analyse de l'interaction albumine-liraglutide par titration en RMN.....	157
Figure 63 : Application de la méthode FAXS à l'étude de la liaison albumine-liraglutide. ....	159
Figure 64 : Analyse de l'interaction albumine-liraglutide par compétition (FAXS). ....	159

Figure 65 : Paramètres du signal RMN <sup>19</sup> F du liraglutide en présence d'albumine.....	161
Figure 66 : Résultat d'ITC brut pour une titration albumine-liraglutide.....	162
Figure 67 : Principe de la technique classique de clonage utilisée pour l'ApoA1.....	169
Figure 68 : Analyse des produits de ligation pGEX-ApoA1. ....	170
Figure 69 : Principe du système de clonage GATEWAY appliqué à l'ApoA1.....	171
Figure 70 : Analyse des produits de la PCR 1 (Gateway).....	173
Figure 71 : Analyse des produits de PCR 1 et PCR2 (Gateway). ....	174
Figure 72 : Analyse des produits de digestion du clone d'entrée.....	175
Figure 73 : Analyse des produits de PCR des 7 pDEST-ApoA1. ....	175
Figure 74 : Analyse des produits de digestion des pDEST-ApoA1.....	176
Figure 75 : Suivi de l'induction de la synthèse de l'ApoA1. ....	178
Figure 76 : Profil d'élution de la protéine NusA-ApoA1 (colonne HisTrap HP 5 ml).....	179
Figure 77 : Suivi de la synthèse et de la purification de la protéine NusA-ApoA1. ....	180
Figure 78 : Analyse du clivage de la NusA-ApoA1 par la TEV recombinante. ....	180
Figure 79 : Suivi du clivage de TRX- et NusA-ApoA1 par les TEV commerciale et recombinante. .....	181
Figure 80 : Plasmide recombinant pET28a-ApoA1.....	182
Figure 81 : Séquence protéique de l'ApoA1r codée par le pET28a-ApoA.....	182
Figure 82 : Suivi de l'induction de la surexpression de la protéine His-ApoA1.....	183
Figure 83 : Suivi de la purification de la protéine His-ApoA1. ....	184
Figure 84 : Suivi de la surexpression de la protéine His-ApoA1 marquée <sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C.....	185
Figure 85 : Analyse du clivage du tag His de l'ApoA1r par la thrombine.....	185
Figure 86 : Principe de l'ELISA sandwich. ....	188
Figure 87 : Comparaison des spectres de fluorescence de l'ApoA1r et l'ApoA1p.. ....	189
Figure 88 : Spectres RMN <sup>1</sup> H 1D de l'ApoA1r marquée à 100 μM.....	190
Figure 89 : Spectre RMN 2D HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N de l'ApoA1r marquée à 265 μM.....	191
Figure 90 : Comparaison des spectres RMN <sup>1</sup> H de l'ApoA1r et l'ApoA1p. ....	192
Figure 91 : Analyse de la taille des HDLr avec l'ApoA1r par DLS. ....	193
Figure 92 : Analyse de la taille des HDLr avec l'ApoA1p par DLS. ....	193
Figure 93 : Spectres RMN 2D HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N de l'ApoA1r marquée, libre ou sous forme HDLr. .....	194
Figure 94 : Evaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'ApoA1r sur cellules endothéliales. ....	195
Figure 95 : Cinétique de la glycation de la protéine His-ApoA1 par le MGO.....	198

Figure 96 : Cinétique de la glycation de l'ApoA1p par le MGO.....	198
Figure 97 : Décalage de la $\lambda_{\max}$ de fluorescence de la His-ApoA1 au cours de la glycation....	199
Figure 98 : Cinétique de la glycation des HDLr commerciaux.....	199
Figure 99 : Signal de dilution du liraglutide en ITC. ....	200
Figure 100 : Analyse d'un résultat ITC pour l'interaction de l' $\alpha$ 1AT avec les CSL-111 glyqués. .....	201
Figure 101 : Titration contrôle de l'ARN 1 mM en eau DEPC (seringue) dans l'eau DEPC (cellule).....	203
Figure 102 : Bilan des techniques utilisées pour la surexpression de l'ApoA1 recombinante en Clearcoli et résultats obtenus pour les clivages avec les enzymes TEV et thrombine.....	205

## Liste des tableaux

Tableau 1: Indices de masse corporelle et interprétation .....	37
Tableau 2 : Les différents classes de lipoprotéines, leurs caractéristiques et leur principale fonction.....	57
Tableau 3 : Composition moyenne des HDL .....	84
Tableau 4 : Résultats de la dialyse à l'équilibre pour différents composés. ....	151
Tableau 5 : Analyse des résultats de la chromatographie d'exclusion du liraglutide. ....	154
Tableau 6 : Résultats d'ITC de l'analyse de l'interaction du liraglutide marqué ou non avec l'albumine (n=3).....	162
Tableau 7 : Bilan des techniques utilisées pour l'étude de l'interaction albumine-liraglutide. ....	163



## Introduction

Les interactions intermoléculaires au sein du vivant sont au cœur des processus régissant l'équilibre nécessaire à la vie et à son fonctionnement. Des plus petits organites intracellulaires à l'organisme dans son entier, les interactions biochimiques sont des phénomènes complexes et finement régulés. Les liaisons protéine-ligand sont impliquées par exemple dans les processus biologiques tels que les réactions enzymatiques permettant la respiration, dans les voies de régulation de l'expression des gènes ou des différentes voies métaboliques, dans la reconnaissance des agents pathogènes par le système immunitaire, dans l'activation des voies de signalisation par la liaison des hormones aux récepteurs membranaires, ou encore dans le transport des molécules au sein de la circulation sanguine.

Une interaction peut être altérée par une modification de la protéine ou du ligand, par une compétition avec un autre ligand ou par un environnement perturbé (température, pH, teneur en sel, polarité). Cela entraîne un déséquilibre qui est en général résorbé grâce à la grande capacité d'adaptation des organismes vivants. En effet, les différents systèmes vitaux (nerveux, respiratoire, endocrinien, circulatoire etc.) travaillent en interconnexion afin de maintenir l'homéostasie. Cette homéostasie permet notamment une préservation des paramètres du sang et donc une protection des cellules contre les variations du milieu extérieur.

Parmi les nombreux paramètres nécessitant une régulation constante, la concentration sanguine en glucose (glycémie) doit être maintenue entre 0,8 et 1,2 g/L pour assurer un fonctionnement normal du corps humain. Le glucose constitue le principal substrat énergétique de l'organisme. Les systèmes de régulation doivent tenir compte à la fois des dépenses et des apports en énergie. En effet, l'alimentation est un facteur majeur de modification des paramètres sanguins. Si le passage dans le sang du sucre issu de la digestion n'est pas correctement compensé par une absorption de glucose au niveau cellulaire, la glycémie peut rester élevée et ainsi induire un état pathologique appelé diabète.

Un paramètre sanguin mal régulé va entraîner des conséquences diverses sur le fonctionnement des différents systèmes vitaux. Notamment, une hyperglycémie peut modifier la structure des protéines sanguines sur lesquelles le sucre pourra se fixer. Ce phénomène de réaction de sucres réducteurs sur les fonctions amines des protéines est connu sous le terme de glycation.

Cette glycation peut alors modifier les propriétés structurales et fonctionnelles des molécules concernées. En particulier, l'hémoglobine contenue dans les hématies et l'albumine du plasma

sont les plus affectées. La glycation touche également de nombreuses autres protéines du sang (globulines, complément C3...). Ainsi, la glycation de l'apolipoprotéine A1, constituant majoritaire des lipoprotéines de haute densité est de plus en plus étudiée. Le processus de glycation des protéines constitue une source de stress oxydant accrue chez les patients atteints de diabète. En effet, après réarrangements moléculaires, la glycation donne lieu à la formation de produits avancés de glycation (AGE) à fort pouvoir oxydant. Ce phénomène de glycation a des conséquences multiples et provoque en particulier l'altération des propriétés physiologiques des protéines. La glycation peut notamment affecter les interactions moléculaires impliquant ces protéines. En particulier, l'albumine qui constitue 80% de la fructosamine, a un rôle de transport de molécules endogènes et exogènes, telles que des médicaments. Parmi ces derniers, le liraglutide, un analogue du glucagon-like peptide-1 (GLP-1) est un médicament antidiabétique d'action longue de plus en plus utilisé. Son action prolongée est dépendante de sa liaison et son transport par l'albumine *via* un acide gras greffé à GLP-1. Ainsi, le premier objectif de ce travail est d'étudier les effets de la glycation de l'albumine sur sa capacité de liaison au liraglutide.

Le stress oxydant entraîne également de nombreuses complications liées au diabète, affectant les reins (néphropathie), les yeux (rétinopathie), le système nerveux et le système cardiovasculaire (hypertension, artériosclérose). Le diabète représente également un facteur de risque majeur du développement de l'athérosclérose, qui se caractérise par un dépôt graisseux au niveau des artères et entraîne un risque important de survenue d'accidents vasculaires cérébraux (AVC). Les HDL ont un rôle clé dans le métabolisme des lipides et notamment dans le transport réverse du cholestérol assurant ainsi l'homéostasie lipidique nécessaire au bon fonctionnement des artères. Dans le cadre de cette étude, il était particulièrement intéressant d'étudier l'apolipoprotéine A1, principale protéine constituant les HDL et les effets de sa glycation sur ses propriétés de liaison à des partenaires variés de nature protéique, lipidique ou nucléique.

Avant d'exposer les résultats de ce travail, nous allons dans un premier temps présenter les deux pathologies sur lesquelles reposent les bases de notre réflexion, à savoir le diabète et l'athérosclérose. Ceci permettra dans un deuxième temps, de mieux comprendre la position de l'albumine et de l'apolipoprotéine A1 comme protéines d'intérêt pour l'étude de la modification de leurs propriétés de liaison dans un contexte diabétique. Enfin, dans un troisième temps, nous parlerons des caractéristiques des interactions moléculaires et des facteurs pouvant les moduler. Nous présenterons aussi les méthodes permettant l'étude des liaisons protéine-ligand, en

particulier celles qui ont été utilisées dans la présente étude, à savoir la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et la titration calorimétrique isotherme (ITC).



## **Contexte bibliographique**



## **I. Le diabète et l'athérosclérose : deux pathologies étroitement liées**

### **A. Le diabète**

De manière générale, le diabète est un excès de sucre dans l'organisme. Les facteurs favorisant le diabète sont nombreux et contribuent ensemble à un dysfonctionnement des systèmes de régulation correspondants. Le diabète entraîne de multiples complications qui constituent le vrai problème de cette pathologie et les traitements actuels visent surtout à éviter les complications. Le diabète est de mieux en mieux connu et les critères de diagnostic sont améliorés, mais l'ampleur que ne cesse de prendre la maladie, montre que tous les facteurs ne sont pas encore maîtrisés.

#### **1. Le diabète hier et aujourd'hui**

##### ***a) Définition et diagnostic du diabète***

Si aujourd'hui le diabète est communément considéré comme une persistance d'un taux anormalement élevé de glucose dans le sang, il n'en a pas toujours été ainsi. Le terme diabète dérive du grec ancien διαβαίνω (*diabetes*) qui signifie « passer à travers ». Cela signifiait qu'une humeur filtrait en quantité anormale à travers le rein. Le diabète était qualifié de « sucré » lorsque les médecins détectaient une « saveur de miel » en goûtant l'urine de leur patient. Bien entendu, le sucre présent dans les urines n'est pas forcément que du glucose et peut être associée à d'autres pathologies (telles que la galactosémie). La présence de glucose dans l'urine peut également résulter d'une défaillance rénale (diabète rénal), alors que la glycémie est normale [1].

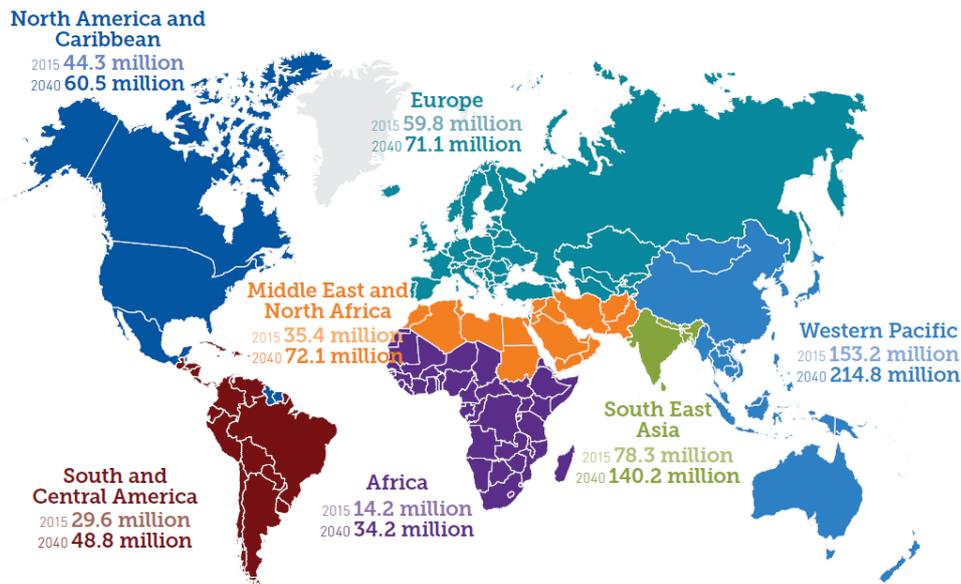
Les connaissances scientifiques concernant le diabète ont depuis considérablement évolué. Revue en 1998, la définition du diabète sucré selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) est la suivante : « le diabète sucré est le groupe des maladies métaboliques, d'étiologie multiple, caractérisées par une hyperglycémie chronique, avec des troubles du métabolisme des glucides, lipides et protéines résultant d'un défaut dans la sécrétion et/ou l'action de l'insuline » [2].

L'hyperglycémie correspond à une concentration de glucose dans le sang (glycémie) anormalement élevée. Une valeur normale de la glycémie à jeun est comprise entre 0,70 g/L (3,9 mmol/L) et 1,10 g/L (6 mmol/L). La glycémie post-prandiale (après le repas) ne doit pas dépasser 1,40 g/L (8 mmol/L) [3].

Pour un souci évident de diagnostic, le diabète se définit le plus souvent par une glycémie à jeun (au moins 8 heures)  $\geq 1,26$  g/L (7 mmol/L) mesurée à deux reprises ; ou par une glycémie  $\geq 2$  g/L accompagnée de plusieurs symptômes du diabète tels qu'une polyurie (urines abondantes), une polydipsie (soif excessive), une perte de poids anormale, ou une fatigue intense [4]. Lorsque la glycémie est anormalement élevée, le débit de glucose filtré dépasse le maximum de capacité du glomérule (environ 375 mg/min) et une partie va donc être éliminée avec l'urine, c'est la glycosurie [5]. Le test oral de tolérance au glucose (OGTT) peut être utilisé pour confirmer un début de diabète. Il se réalise après un jeûne préalable de 12 h et consiste à suivre l'évolution de la glycémie après l'ingestion de 1 g de glucose par kg, afin d'évaluer l'efficacité de la réponse insulinique [2].

### *b) La répartition du diabète en France et dans le monde*

Le diabète concerne 415 millions d'adultes dans le monde entier [6]. Les estimations prévoient que le nombre de diabétiques dépassera les 640 millions dans les 20 années à venir (*Figure 1*).



*Figure 1: Répartition du diabète dans le monde. Les chiffres en 2015 et les prévisions pour 2040 [6].*

Les dépenses liées au diabète ne cessent également d'augmenter, et représentent aujourd'hui plus de 12% des dépenses mondiales en soins de santé, la majorité étant consacrée au traitement des complications de la maladie [6]. En France, le nombre de personnes diabétiques s'élève à environ 2 millions. Parmi elles, seuls 10% sont insulino dépendantes de type 1. Les autres sont pour la

quasi-totalité des diabétiques de type 2. Le diabète de type 1 est dû à une déficience de la production d'insuline alors que les patients atteints de diabète de type 2 présentent une altération de la réponse à la stimulation de l'insuline, qu'on appelle « résistance à l'insuline » ou « insulino-résistance ». Il existe également un diabète dit gestationnel qui apparaît pendant la grossesse. Le diabète peut également se déclarer secondairement à d'autres maladies (pancréatiques, endocriniennes ou infectieuses) ou après la prise de certains médicaments (glucocorticoïdes, anticancéreux, antiépileptiques) [7].

Parmi les nombreux types de diabète, le diabète de type 2 reste de loin le plus fréquent (90% des cas) et représente un véritable problème de santé publique au niveau mondial mais aussi en France. Celui-ci touche en particulier le département de La Réunion où le nombre des patients diabétiques est également en progression constante et avec une plus forte prévalence qu'en métropole. D'après un rapport de l'institut de veille sanitaire (InVS) de 2015 le taux de diabète traité s'élève à 9,8% à la Réunion, soit deux fois plus qu'en métropole (4,6%). L'enquête REDIA (Réunion Diabète) a estimé à 18% la part de la population adulte réunionnaise (25 ans et plus) atteinte de diabète, traité ou non soit deux fois plus qu'en métropole (REDIA, 2005).

A cause de son expansion mondiale, le diabète est souvent qualifié de pandémie, bien que ce terme s'applique aux maladies infectieuses. Les causes de ce fléau sont variées (alimentation, mode de vie, facteurs génétiques), mais elles aboutissent toutes à une altération de l'homéostasie glucidique et par conséquent à une dérégulation de la glycémie [8].

## **2. Caractéristiques et causes du diabète**

### ***a) Les diabètes sucrés de type 1 et de type 2***

Le diabète de type 1, dit « insulino-dépendant » et autrefois appelé diabète maigre ou juvénile est caractérisé par une détérioration progressive des cellules bêta aboutissant à une disparition complète de la sécrétion d'insuline [9]. La destruction des cellules pancréatiques résulte d'un phénomène auto-immun, qui se caractérise par la présence de cellules inflammatoires intervenant par étape et aboutissant à la fabrication d'auto-anticorps [10, 11]. Longtemps considéré comme le diabète de l'enfant et de l'adolescent, il est maintenant reconnu qu'il peut aussi se déclarer à l'âge adulte [12].

Le diabète de type 2 est aussi appelé « diabète sucré non insulino-dépendant ». Il se caractérise par une résistance à l'insuline qui est le point de départ de l'installation d'une

hyperglycémie chronique [13, 14]. Etant donné le rôle clé de l'insuline dans le métabolisme, il en résulte également des changements au niveau lipidique avec le développement d'une dyslipidémie liée à l'augmentation des taux d'acides gras circulants [15].

L'atteinte des cellules du pancréas n'a lieu que tardivement chez les patients diabétiques de type 2. Le diabète de type 2 a la particularité d'évoluer très lentement, avec une phase précoce difficilement détectable par le malade car ne présentant que peu ou pas de symptôme. La résistance à l'insuline est généralement associée à un trouble de la sécrétion de l'insuline. Dans un premier temps, celle-ci est augmentée en compensation de la baisse de la réponse cellulaire, puis dans une phase beaucoup plus tardive, elle est diminuée par épuisement de la fonction pancréatique [16, 17].

Ainsi, chez les patients diabétiques de type 2, le taux d'insuline circulante est généralement élevé. L'hyperglycémie s'explique donc par une résistance à l'insuline, liée à une diminution du nombre de récepteurs à l'insuline ainsi qu'à une baisse de l'efficacité de la transmission du signal post-récepteur. La résistance à l'insuline se développe dans plusieurs organes, dont le muscle squelettique, le cœur, le foie et le tissu adipeux. Une cause importante de la baisse de l'efficacité de l'insuline au niveau de son récepteur est le taux élevé d'acides gras circulants. L'inflammation serait un des phénomènes sous-jacents majeurs induisant la résistance à l'insuline, certains acides gras ayant notamment un effet proinflammatoire (acides arachidonique et palmitique) [18]. Ceci explique pourquoi l'obésité est un facteur de risque majeur du développement du diabète de type 2 [19]. En se focalisant davantage sur le diabète de type 2, nous allons voir dans la partie suivante, les autres facteurs qui peuvent favoriser le développement du diabète.

### ***b) Les facteurs de risque du diabète***

L'hérédité a une influence certaine sur l'apparition du diabète de type 1 [11] Chez les patients présentant un terrain génétique très peu marqué, des facteurs environnementaux mal connus entraîneraient l'initiation du processus auto-immun [20, 21].

Le diabète de type 2 est d'origine multifactorielle mais est souvent lié au surpoids. Le risque de diabète de type 2 augmente avec l'indice de masse corporelle (IMC) [22] défini par l'OMS comme le quotient de la masse en kg par le carré de la taille en m :  $IMC = \text{masse} / (\text{taille})^2$ . Une valeur normale se situe entre 18,5 et 24,9. Le tableau 1 résume les correspondances pour les différentes plages d'IMC.

<b>IMC</b>	<b>Interprétation</b>
<b>&lt; 18,5</b>	Insuffisance pondérale
<b>18,5 – 24,9</b>	Eventail normal
<b>25,0 – 29,9</b>	Surpoids (Pré-obésité)
<b>30,0 – 34,9</b>	Obésité, classe I
<b>35,0 – 39,9</b>	Obésité, classe II
<b>≥ 40</b>	Obésité, classe III

*Tableau 1: Indices de masse corporelle et interprétation (adapté de [www.who.int](http://www.who.int))*

Le facteur génétique est un peu plus marqué chez les patients diabétiques de type 2 par rapport au type 1. Il est associé à l'obésité ainsi qu'à l'hypertension, la dyslipidémie, et les maladies cardiovasculaires au sein d'une même famille [23]. Une centaine de loci ont été répertoriés sur différents chromosomes comme étant susceptibles d'être liés à l'apparition du diabète de type 2 [24-26].

Outre ces paramètres génétiques et ceux intervenant pendant le développement de l'enfant (environnement fœtal, allaitement), d'autres facteurs interviennent au cours de la vie et viennent s'ajouter aux prédispositions existantes. Les facteurs environnementaux favorisant le développement du diabète de type 2 sont principalement une alimentation trop riche, un mode de vie sédentaire, le manque d'activité physique, l'alcool et le tabac [27-31].

En lien avec l'alimentation, la composition du microbiote intestinal joue également un rôle non négligeable dans la pathogénèse du diabète de type 2. En effet, l'endotoxémie, liée à la présence de certaines bactéries à gram négatif, semble participer au processus d'installation de la résistance à l'insuline par l'initiation d'une inflammation chronique de bas grade [32, 33].

Les facteurs favorisant le diabète sont donc variés mais tous contribuent à une altération des processus permettant la régulation de la glycémie. Nous allons dans la partie suivante présenter le fonctionnement général de la glycorégulation, qui, de par sa complexité, nous permettra de mieux comprendre la multiplicité des causes présentées ici, mais aussi les conséquences du diabète sur l'équilibre global de l'organisme.

### **3. Physiologie de la glycorégulation et physiopathologie diabétique**

#### ***a) Les mécanismes de régulation de la glycémie***

La quantité de glucose présente dans la circulation sanguine est constamment et finement régulée. En effet, entre son utilisation pour les besoins énergétiques et son apport provenant des aliments digérés, sa variation reste très limitée grâce à une adaptation permanente du système hormonal mettant en jeu le système nerveux, le pancréas, le foie et le rein. L'insuline est la seule hormone hypoglycémisante. En revanche, le système hyperglycémiant dépend de plusieurs hormones, dont les catécholamines, le glucagon, le cortisol et l'hormone de croissance [34].

##### ***i. Le rôle du système nerveux sur le contrôle de la prise alimentaire***

Le système nerveux central et en particulier l'hypothalamus situé au-dessous du cerveau ont un rôle crucial dans la régulation de la glycémie. Il est constitué de différents centres qui répondent aux variations chimiques, hormonales mais aussi psychiques et émotives [35]. En particulier, le noyau arqué de l'hypothalamus régule le métabolisme et la prise alimentaire. Les neurones du noyau arqué possèdent notamment des récepteurs à l'insuline (produite par le pancréas) et à la leptine (produite par le tissu adipeux). Ces hormones vont inhiber les neurones orexigènes (qui stimulent l'appétit). Au contraire, les neurones anorexigènes (qui suppriment l'appétit) vont être excités. Ainsi, l'hypothalamus participe à l'homéostasie glucidique en exerçant un contrôle sur l'appétit et la prise alimentaire [36, 37].

##### ***ii. Le métabolisme du glucose***

Le glucose provient en temps normal des glucides de l'alimentation qui sont hydrolysés et absorbés dans l'intestin. Le glucose arrive au foie par la veine porte où il est stocké sous forme de glycogène. La glycogénolyse libère le glucose dans la circulation selon les besoins tissulaires. Cette réserve est assez limitée puisqu'elle ne peut excéder 24 heures en cas de jeûne. Le glucose peut alors être synthétisé par néoglucogenèse à partir du lactate, des acides aminés ou du glycérol (*Figure 2*).

Le glucose sanguin pénètre dans les cellules sous l'action de l'insuline et va alors subir une dégradation selon deux voies : la voie principale est la glycolyse (ou voie d'Embden-Meyerhof) dans laquelle le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate, puis dégradé en phosphoglyceraldéhyde et enfin en pyruvate. En présence d'oxygène, les réactions se poursuivent et il se forme de l'acétylcoenzyme A. L'unité acétyle de ce dernier est complètement oxydée dans le cycle de Krebs et libère ainsi de l'énergie. L'acétylcoenzyme A peut également permettre

la synthèse des corps cétoniques, des acides gras et du cholestérol. La deuxième voie est celle des pentoses phosphates qui se branche en dérivation sur la première et a la particularité d'être une source de NADPH, qui permet notamment la synthèse des acides gras saturés [38] (Figure 2).

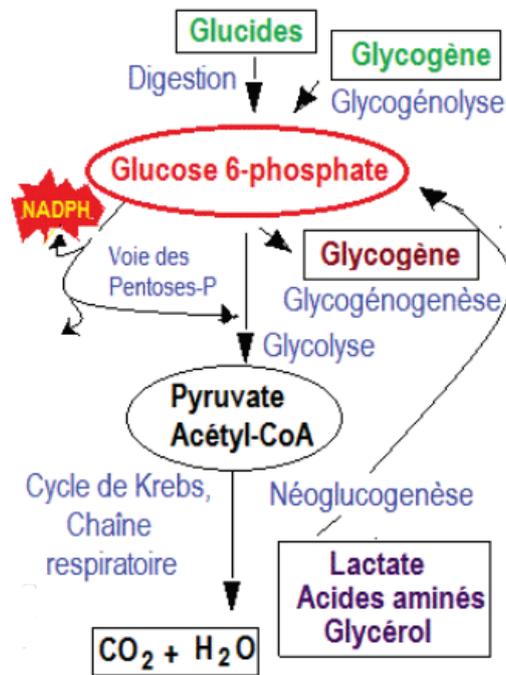


Figure 2 : Métabolisme du glucose (www.takween.com)

Si la quantité d'insuline est insuffisante, la première voie est fortement ralentie et la deuxième bloquée. Le glucose passe alors par des voies non insulino-dépendantes [39], impliquées dans l'apparition des complications liées au diabète dont nous parlerons plus loin. L'insuline, unique hormone du système hypoglycémiant, est donc une hormone clé du métabolisme du glucose. Bien avant de pouvoir l'isoler et comprendre comment elle agit, la médecine du XIX<sup>ème</sup> siècle présentait déjà le rôle essentiel de l'insuline dans la glycorégulation [40].

### iii. L'insuline : système hypoglycémiant

Découverte par Paulesco Redivivus, l'insuline fut isolée pour la première fois en 1921 par l'équipe de Frederick Banting. Cette découverte a considérablement amélioré l'espérance de vie des enfants atteints de diabète de type 1, une maladie qui était à l'époque toujours fatale [40, 41]. L'insuline est produite par les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas à partir de la proinsuline. Le clivage de la proinsuline libère un peptide C de connexion et une molécule d'insuline. Cette hormone est composée de deux chaînes A et B reliées entre elles par deux ponts

cystine (Cys7A-7B ; Cys20A-19B) (Figure 3). Un troisième pont disulfure existe entre les cystéines 6 et 11 de la chaîne A [42, 43].

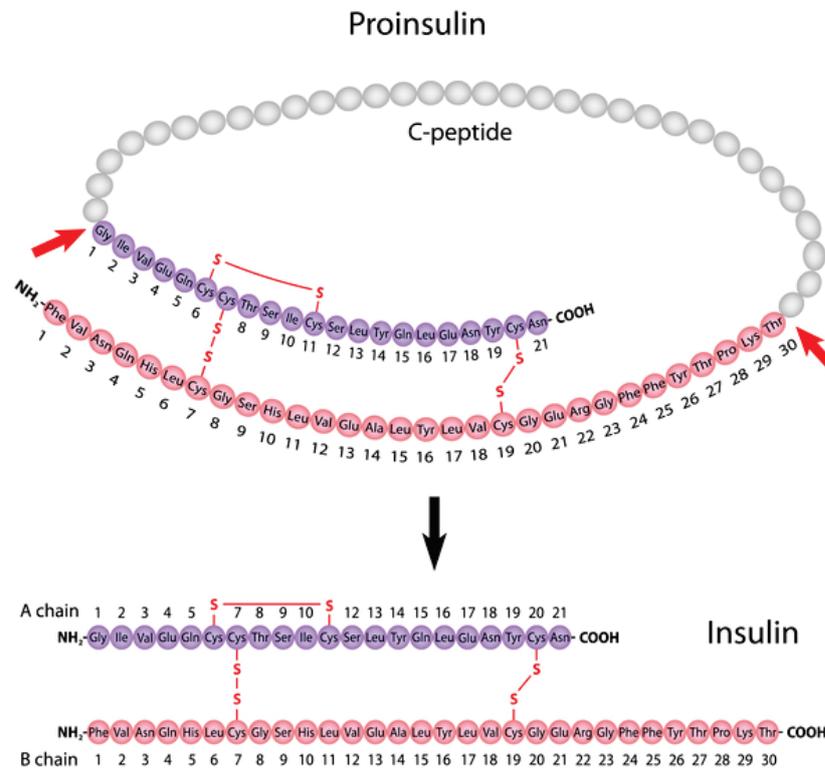


Figure 3: Structure de la proinsuline ([ghr.nlm.nih.gov](http://ghr.nlm.nih.gov)).

L'expression du récepteur à l'insuline est ubiquitaire mais elle est plus importante au niveau des hépatocytes et des adipocytes, cellules métaboliquement très actives [44]. L'insuline agit alors à trois niveaux : elle stimule l'entrée de glucose dans les cellules par le recrutement et la translocation du transporteur de glucose 4 (GLUT4), elle favorise également le stockage du glucose par la synthèse de glycogène et par la conversion du glucose en acides gras [42]. Un taux élevé d'acides gras sanguin peut empêcher l'action de l'insuline [18]. L'insuline va stimuler la sécrétion de la leptine, qui est une hormone produite par le tissu adipeux blanc [45]. Comme mentionné précédemment, elle stimule les neurones anorexigènes de l'hypothalamus [37].

Le premier facteur insulino-stimulant est le glucose. La hausse de la glycémie post-prandiale déclenche la sécrétion de l'insuline. Certaines hormones stimulent également la production d'insuline, il s'agit en particulier du glucagon, du polypeptide pancréatique, du GIP (Gastric Inhibiting Peptide) et de GLP-1 (Glucagon-like Peptide-1). Au contraire, l'adrénaline et la somatostatine inhibent la sécrétion de l'insuline. L'insuline elle-même, présente en excès, comme dans le cas d'un traitement insulinique déprime sa sécrétion pancréatique [45].

#### *iv. Le système hyperglycémiant*

Contrairement à l'insuline, unique hormone hypoglycémiante, les hormones hyperglycémiantes sont nombreuses. La principale est le glucagon qui est sécrétée par les cellules alpha des îlots de Langerhans du pancréas. Le glucagon active d'une part la glycogénolyse hépatique et d'autre part, il stimule la lipolyse pour permettre une restauration de la réserve glycogénique du foie [46]. Le glucagon contrebalance l'action de l'insuline. Ces deux hormones se régulent mutuellement au niveau sécrétoire, et permettent d'établir un équilibre [47].

D'autres substances hyperglycémiantes, telles que les catécholamines (comme l'adrénaline et la noradrénaline) ou les glucocorticoïdes (tels que le cortisol), sont produites par les glandes surrénales. Les catécholamines agissent en activant les récepteurs alpha et bêta-adrénergiques. Elles stimulent la glycogénolyse au niveau du foie et des muscles et la lipolyse au niveau du tissu adipeux [34]. Les glucocorticoïdes diminuent l'absorption cellulaire du glucose et stimulent la production de glucose à partir de composés non glucidiques (néoglucogenèse) et en cas d'ultime nécessité (jeûne prolongé), à partir d'acides aminés provenant de la dégradation des protéines musculaires [48]. L'hypophyse sécrète aussi l'hormone somatotrope (hormone de croissance ou somathormone (STH)) qui réduit la sensibilité à l'insuline [49].

D'autres hormones ont une action hyperglycémiante limitée. C'est le cas des hormones thyroïdiennes et œstrogéniques. Les hormones thyroïdiennes favorisent l'absorption de sucre au niveau intestinal [50]. Certains contraceptifs dérivés d'œstrogènes peuvent provoquer une hyperglycémie modérée voir un diabète transitoire. Il en est de même pour les œstrogènes endogènes chez la femme, pendant les premières semaines de grossesse qui peuvent induire un diabète gestationnel [51].

On peut donc constater qu'un maintien efficace de la glycémie n'est obtenu que par une régulation complexe et harmonieusement contrôlée par ces nombreux facteurs. Toute altération de ce mécanisme de régulation dans le sens de l'hyperglycémie peut ainsi être une porte ouverte au développement du diabète.

#### *b) Le diabète et ses conséquences métaboliques*

Les principales conséquences de l'hyperglycémie chronique sont la formation de produits avancés de glycation (AGE) ainsi que la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) contribuant à un stress oxydant.

La voie privilégiée pour la dégradation du glucose est celle de la glycolyse à près de 90% et celle des pentoses phosphates pour le reste. En situation d'hyperglycémie, le coenzyme réduit NADH (nicotinamide adénine dinucléotide H) produit par la glycolyse va s'accumuler. Ce donneur d'électron induit ainsi une surcharge électronique au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale entraînant une surproduction d'anion superoxyde [52]. Au moins cinq autres voies dérivent de la voie de la glycolyse : la voie des polyols ; la voie des hexosamines, la voie d'activation de la protéine kinase C (PKC), la voie du méthylglyoxal ou des AGE et la voie de l'auto-oxydation du glycéraldéhyde. Ces voies sont en temps normal très peu actives et représentent une part négligeable du glucose total métabolisé [53]. En cas d'hyperglycémie, la voie de la glycolyse étant très sollicitée, le glucose excédentaire va alors emprunter ces voies minoritaires. Ces voies conduisent également à la production d'espèces réactives de l'oxygène. La principale voie active en cas d'hyperglycémie est alors la voie des polyols dans laquelle le glucose est réduit par l'aldose réductase pour former du sorbitol qui est ensuite converti en fructose par la sorbitol déshydrogénase (*Figure 4*). Cette réduction du glucose consomme du NADPH et en condition hyperglycémique, cette voie normalement minoritaire, constitue alors plus de 30% du métabolisme du glucose [54]. Le NADPH est donc moins disponible, ce qui réduit par conséquent la régénération du glutathion réduit par la glutathion réductase (GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé), et qui contribue au stress oxydant [55]. Plusieurs études ont montré l'implication des ROS dans la pathogenèse et les complications du diabète de type 2 [56-58].

Mis à part les voies métaboliques minoritaires du glucose décrites précédemment, il existe d'autres facteurs favorisant un stress oxydant dans le cadre du diabète. Il s'agit entre autres des acides gras libres ou non-estérifiés, qui se retrouvent en excès chez le patient diabétique. Ces acides gras vont passer par le cycle de l'acide citrique et générer de l'acétyl-CoA (coenzyme A) et un excès de NADH qui va favoriser la production de superoxyde au niveau mitochondrial [59].

Le 3-désoxyglucosone issu de la dégradation du fructose est, comme le méthylglyoxal ou le glyoxal, un composé dicarbonylé très réactif qui va réagir avec les groupements amines des protéines et conduire à la formation de produits avancés de glycation (AGE) [60] (*Figure 4*).

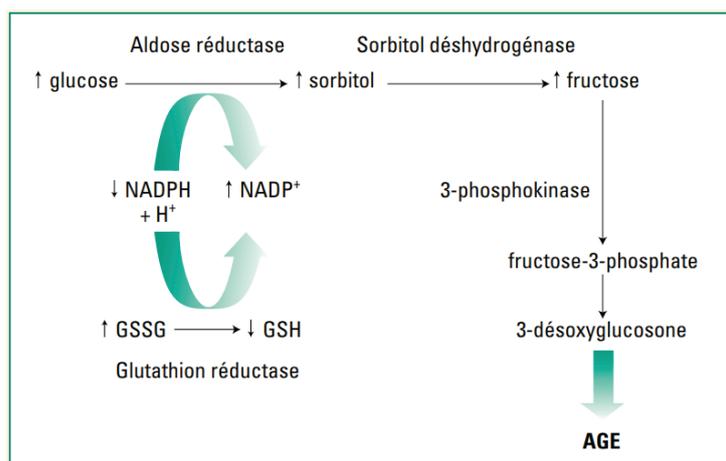


Figure 4 : Déplétion en NADPH, H<sup>+</sup> et la voie des polyols [60].

Une des conséquences directes de l'hyperglycémie est l'altération des protéines plasmatiques par la fixation de glucose ou de dérivés [61]. C'est sur ce phénomène appelé glycation que se porte tout l'intérêt de ce travail et que nous étudions dans la partie suivante.

#### 4. La glycation : une conséquence de l'hyperglycémie

##### a) Définition de la glycation

La glycation est une réaction non enzymatique (ou spontanée) d'un sucre avec une protéine. Elle a d'abord été découverte pour l'hémoglobine mais elle peut affecter de nombreuses protéines. Le terme fructosamine désigne l'ensemble des protéines ainsi glyquées. Aussi appelée « réaction de Maillard », la glycation consiste en une réaction de condensation du groupement carbonyle d'un sucre réducteur avec le groupement amine latéral d'un résidu d'acide aminé basique (ex : lysine, arginine) ou d'un acide aminé *N*-terminal (Figure 5). Une imine intermédiaire (aldimine) appelée base de Schiff se forme ensuite après élimination d'une molécule d'eau. Interviennent ensuite les réarrangements d'Amadori qui mènent à la formation d'un nouveau groupement carbonyle. Ce produit dit d'Amadori, pourra à son tour interagir avec une autre protéine. Cela conduit à la formation de produits de Maillard ou produits avancés de glycation (AGE : Advanced Glycation End-Products) [61]. Différents types d'AGE peuvent se former, suite à différents réarrangements ainsi que d'éventuelles réactions d'oxydation. (Figure 5).

La réaction de Maillard est connue en cuisine comme le processus permettant la caramélisation. Si l'aspect gustatif est apprécié, les effets néfastes sur la santé sont beaucoup moins connus. Il a par ailleurs été montré que l'alimentation constitue le principal apport en AGE [62].

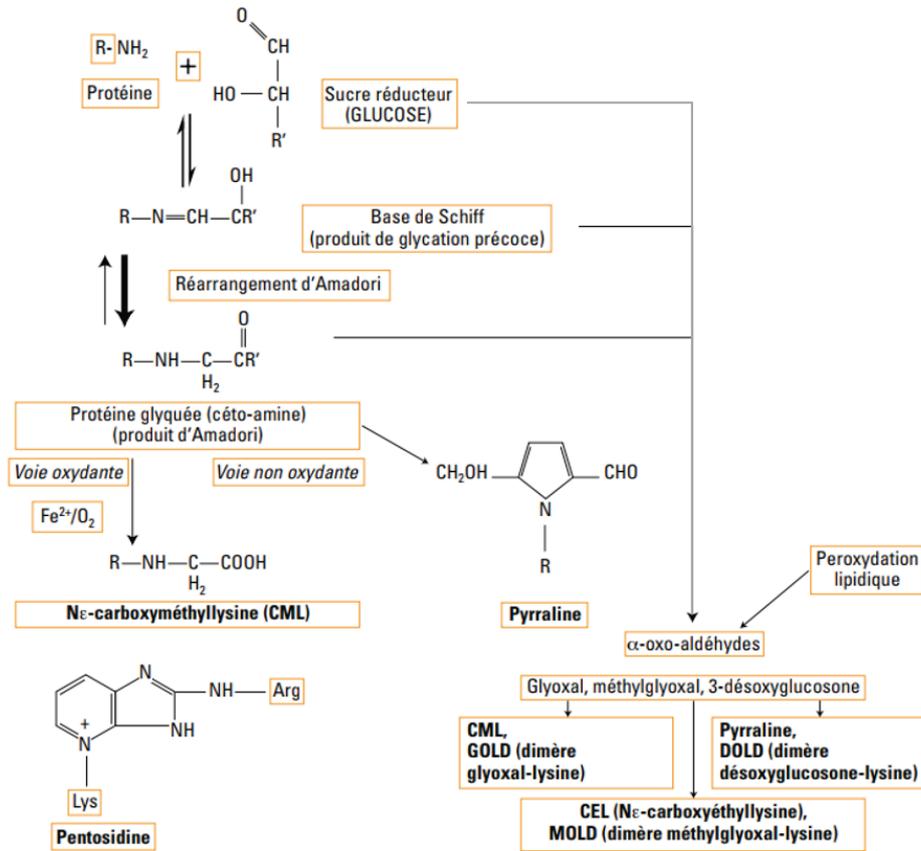


Figure 5: La formation des AGE [63].

### b) La glycation chez le patient diabétique

Dans des conditions normales, la glycation des protéines plasmatiques due au glucose est relativement limitée puisque la glycémie est maintenue autour de 1 g/L. Mais dans un contexte de diabète, l'hyperglycémie chronique va induire une glycation importante. La glycémie est d'ailleurs corrélée au taux d'hémoglobine glyquée, utilisée comme indicateur de l'état d'évolution du diabète, décrit plus loin. Le glucose n'est pas la seule espèce induisant la glycation. En effet, d'autres sucres tels que le galactose, le fructose ou le lactose participent à ce processus [64-66].

La glycation est également induite par des espèces issues des voies de dégradation du glucose et des bases de Schiff, telles que les α-oxoaldéhydes (le glyoxal, le méthylglyoxal et le 3-déoxyglucosone) (Figure 6) [67]. Le méthylglyoxal peut être formé lors de la glycolyse à partir du phosphodihydroxyacétone [68] mais aussi dans les voies métaboliques impliquant l'acétone [69] ou la thréonine [70]. Il peut aussi provenir de la peroxydation lipidique [71] ou de la dégradation des acides nucléiques [72].

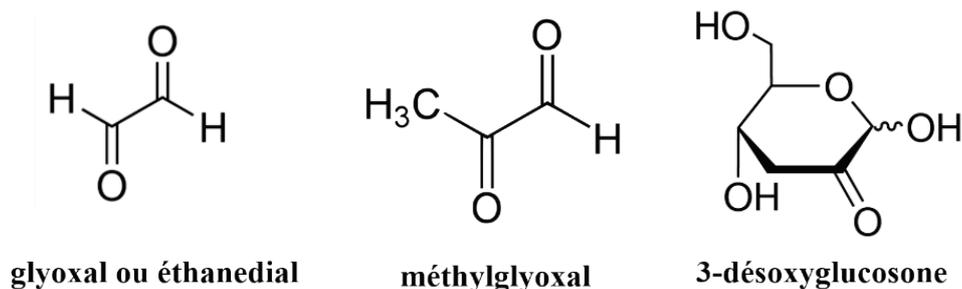


Figure 6 : Structure du glyoxal, du méthylglyoxal (pyruvaldéhyde ou 2-oxopropanal) et de la 3-désoxyglucosone

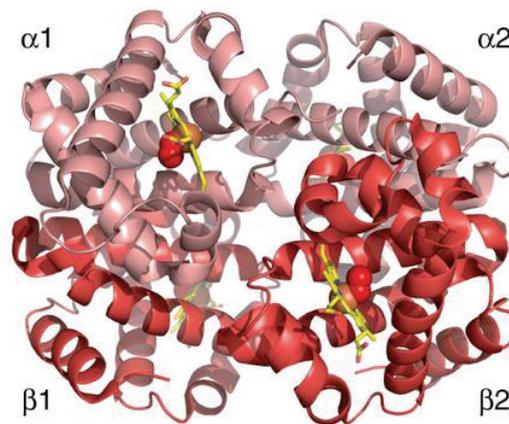
Le taux de méthylglyoxal est deux fois plus élevé chez les patients diabétiques [73, 74]. En effet, le méthylglyoxal, cinquante mille fois plus réactif que le glucose [75] induit une glycation drastique et entraîne rapidement la formation d'AGE. Le méthylglyoxal cible principalement les résidus arginine en formant l'hydroimidazolone appelé MG-H1 [76]. Indépendamment de la pathologie diabétique, un taux élevé de MG-H1 est associé à une mortalité cardiovasculaire plus élevée que la normale [77].

Chez les personnes diabétiques, l'hyperglycémie chronique est associée à des taux plasmatiques plus élevés de produits de glycation. A cette glycation s'ajoute des réactions d'oxydation qui peuvent avoir lieu sur les produits d'Amadori lors d'un stress oxydatif. L'association de ces deux processus étroitement liés correspond au phénomène appelé glycoxydation [78]. Chez les patients diabétiques, les produits avancés de glycation s'accumulent dans les tissus. Ils sont des initiateurs de stress oxydant en agissant via des récepteurs spécifiques. Le récepteur aux AGE le mieux caractérisé est appelé RAGE (receptor for advanced glycation-end products). La stimulation de RAGE active le facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B), qui active ses gènes cibles dont des cytokines proinflammatoires (tels que TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) [79]. Les AGE et leur récepteur sont impliqués dans plusieurs pathologies dont les maladies cardiovasculaires. Ils participent au maintien d'une inflammation de bas grade, associée notamment au diabète et à l'obésité. Selon un mécanisme mal connu impliquant la NADPH oxydase et les mitochondries, l'activation de RAGE par les AGE, induit également un stress oxydatif [80].

### c) L'hémoglobine glyquée

Du fait de sa longue durée de vie (environ 120 jours) et de sa concentration élevée (150 g/L de sang en moyenne), l'hémoglobine (Figure 7) contenue dans les globules rouges (hématies) est très sensible à la glycation. L'hémoglobine glyquée ou HbA1c résulte de la réaction du glucose sur sa chaîne bêta. L'HbA1c est plus abondante chez les patients diabétiques (>7%) comparés au sujets sains (<6,5%) [81-83]. Ainsi, elle constitue un bon marqueur de suivi de la glycémie

moyenne chez le diabétique sur une durée de quatre mois [84]. Chez certains patients diabétiques ce taux peut dépasser les 12%. L'hémoglobine A1c présente une affinité plus élevée pour l'oxygène, ce qui favoriserait une hypoxie au niveau des tissus. Cela contribuerait ainsi aux complications vasculaires et neurologiques chez les personnes diabétiques [85, 86].



*Figure 7 : Structure tridimensionnelle de l'hémoglobine native. Elle est formée de 4 sous-unités organisées en hélice  $\alpha$ , dans sa forme liée au dioxygène qui est fixé sur ses 4 groupements hèmes (en jaune) [87].*

Si la glycation de l'hémoglobine est un marqueur de l'état du patient diabétique, il n'en demeure pas moins que les autres protéines sont aussi des cibles de la glycation. Ainsi, l'albumine, l'insuline, les immunoglobulines ainsi que les protéines de la matrice extracellulaire sont également affectées par des processus de glycation et qui peuvent directement découler d'un état diabétique [88].

L'albumine, protéine abondante est une cible importante de la glycation, et peut apporter des informations complémentaires au dosage de l'HbA1c. Etant donné qu'elle circule librement dans le plasma et possède une durée de vie d'environ 3 semaines, elle permet une évaluation plus précise du contrôle glycémique chez les patients diabétiques notamment en termes de tolérance au glucose [89-91]. La mesure de l'albumine glyquée est une solution plus fiable en particulier dans certaines pathologies en lien avec des anomalies des globules rouges telle que la drépanocytose [92]. Une partie de ce travail, consacrée à l'albumine sera présentée au chapitre II.

Toutes ces protéines glyquées participent au stress oxydant qui s'installe progressivement et est à l'origine des nombreuses complications chez le patient diabétique [93]. Ainsi, les traitements

du diabète, visent en premier lieu à éviter les conséquences à long terme de l'hyperglycémie, qui conduisent au développement de différentes pathologies [94].

## **5. Les traitements du diabète de type 2 et ses complications**

### ***a) Les traitements classiques du diabète***

#### ***i. La modification du mode de vie***

Contrairement au diabète de type 1, le diabète de type 2 ne nécessite pas de traitement à l'insuline, sauf à partir des stades avancés ou lorsque les traitements oraux ne suffisent pas. Les personnes diabétiques de type 2 peuvent être traitées par un régime particulier avec ou sans médicaments. Une suppression de l'obésité ou du surpoids par un régime amaigrissant hypocalorique peut dans la plupart des cas inverser la pathologie et rétablir une glycorégulation normale. Si le changement au niveau de l'alimentation et du mode de vie ne suffit pas, les traitements médicamenteux sont nécessaires [94-96].

#### ***ii. Les traitements par voie orale***

L'objectif du traitement du diabète quel qu'il soit consiste dans un premier temps à rétablir une glycémie normale. Les objectifs thérapeutiques sont fixés en termes de taux d'hémoglobine glyquée (%HbA1c), qui correspondent à des paliers reflétant l'aspect évolutif du diabète. L'objectif final vise à atteindre étant un pourcentage en HbA1c inférieure ou égale à 7 %, valeur à partir de laquelle le risque cardiovasculaire est minime [97].

La metformine est le traitement de première ligne utilisé surtout pour les patients présentant une obésité et une résistance à l'insuline. Ce biguanide (dérivé de la guanidine) agit en réduisant la libération de glucose au niveau du foie, en inhibant la néoglucogenèse et la glycolyse. La metformine augmente la sensibilité à l'insuline au niveau musculaire et ralentit l'absorption de glucose au niveau intestinal [94]. Les dérivés de la sulfonurée vont permettre une sécrétion accrue d'insuline en bloquant les canaux potassiques des cellules bêta [98]. Il existe également de nombreux autres médicaments, tels que les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase qui empêchent la digestion des disaccharides et réduisent ainsi l'absorption de glucose au niveau de l'intestin [99], les meglitinides qui stimulent la sécrétion d'insuline [100], ou les thiazolidinediones qui augmentent la sensibilité à l'insuline [101].

Ces traitements oraux sont utilisés seuls (monothérapie) ou en association (thérapie combinée) chez des patients qui ont toujours une production basale d'insuline pancréatique. Si les

antidiabétiques oraux ne suffisent pas à réguler la glycémie, ou s'ils sont mal tolérés par le patient, des injections d'insuline peuvent alors être prescrites [94].

### iii. L'insuline et ses analogues

L'insulinothérapie est réservée aux patients présentant un diabète mal contrôlé, principalement pour compenser le manque d'insuline endogène, surtout au niveau musculaire [102]. L'inconvénient de l'insuline est qu'elle peut causer une glucolipotoxicité, la résistance à l'insuline ayant à l'origine, un rôle physiologique protecteur contre l'absorption excessive de glucose par les cellules [103, 104].

Des injections d'analogues de l'insuline à action rapide ou prolongée et sont utilisées pour compenser le manque de production d'insuline endogène. Il s'agit respectivement des insulines lispro, glulisine ou aspart et des insulines glargine ou détémir. Les insulines à action rapide entraînent un risque élevé d'hypoglycémie, qui se voit fortement réduit pour celles à action lente. Outre une délétion de la ThrB30, l'insuline détémir (Levemir®) possède un acide gras C:14 (acide myristique) greffé sur la LysB29 (*Figure 8*). Cette structure permet l'auto-association du détémir en hexamères ou dihexamères, mais permet également la liaison réversible du détémir à l'albumine humaine (HSA : human serum albumin) via son acide myristique [105].

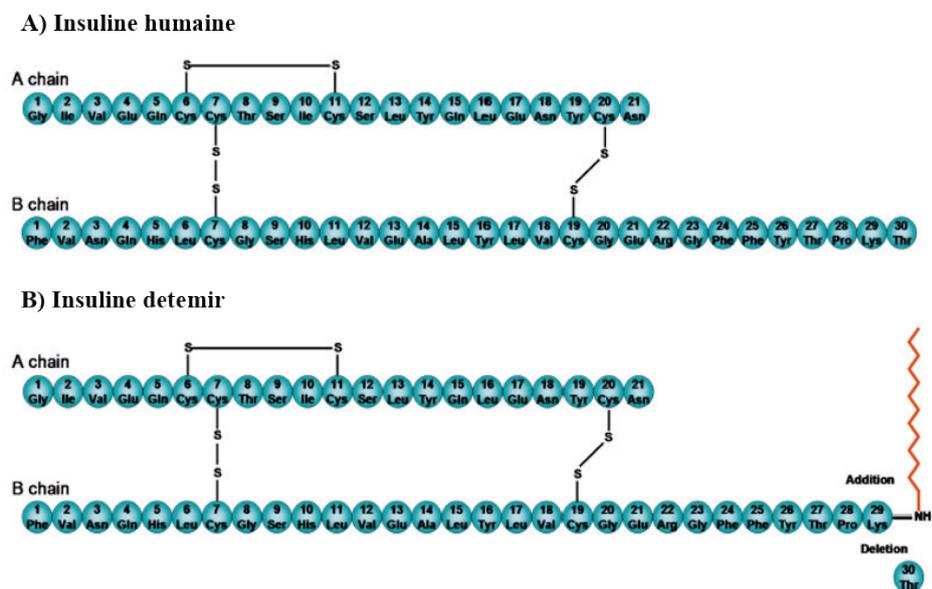


Figure 8: Structure primaire de l'insuline humaine (A) et de l'insuline détémir (B) (adapté de [106]).

### b) Le liraglutide et les analogues du GLP-1

Le GLP-1 est une hormone incrétine de 30 acides aminés sécrétée par des cellules L endocrines épithéliales de l'intestin en réponse à une hyperglycémie post-prandiale. Le GLP-1 est dégradé en trois minutes dans le plasma, sous l'action de la dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4). Le récepteur au GLP-1 est principalement exprimé au niveau du pancréas, du rein, du cœur, du cerveau, de l'estomac et de l'intestin. Le GLP-1 stimule la sécrétion de l'insuline (hormone incrétine) et inhibe celle du glucagon. Le GLP-1 diminue les mouvements gastro-intestinaux, ralentissant ainsi la digestion. Il régule également l'appétit et la prise alimentaire. C'est pourquoi le GLP-1 est très étudié comme molécule thérapeutique dans le diabète de type 2 [107].

Les analogues du GLP-1 sont principalement l'exendin-4, le lixisenatide, le liraglutide, l'albiglutide, le sémaglutide, et le dulaglutide (Figure 9). Bien qu'ils aient une structure plus ou moins différente du GLP-1, ils sont tous capable de lier et d'activer le récepteur au GLP-1 avec des affinités plus ou moins élevées [108].

L'exendine-4, dont l'équivalent synthétique est l'exénatide, est une molécule naturelle retrouvée dans la salive du monstre de Gila (*Heloderma suspectum*) qui se lie au récepteur au GLP-1 humain avec une durée de vie plasmatique supérieure au GLP-1 [109]. Le lixisenatide se base sur la structure de l'exendine-4 avec la délétion de la Pro36 et l'ajout d'une séquence de 6 lysines appelée SIP (structure-inducing probe) augmentant sa durée de vie [109].

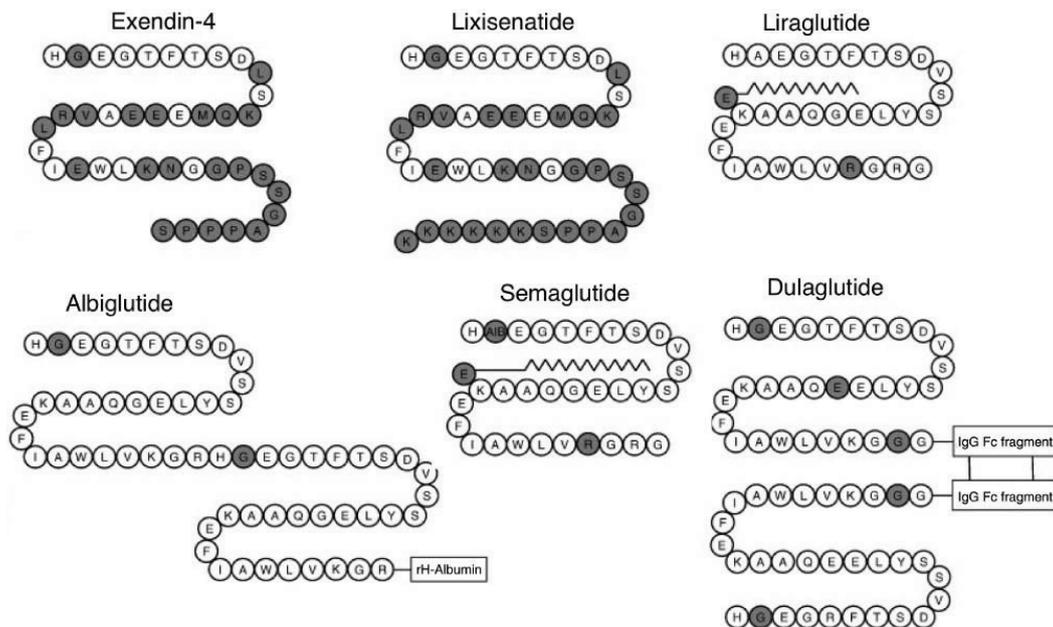


Figure 9: Les analogues du GLP-1  
Les résidus modifiés par rapport à la GLP-1 native sont indiqués en gris [110].

Le liraglutide a été commercialisé en 2013 sous le nom de Victoza®. C'est un médicament utilisé principalement pour le traitement du diabète de type 2. Le liraglutide possède 97% d'identité avec le GLP-1 humain. Il diffère du GLP-1 endogène par la substitution d'un acide aminé (Lys34Arg) et par un acide palmitique greffé sur la Lys26 via un lien glutamate. Comme le détémir, après injection sous-cutanée, le liraglutide se lie à la HSA par sa chaîne d'acides gras. Son absorption lente est également due à son auto-association en oligomères. De plus, sa dégradation par l'enzyme DPP-4 est ralentie par rapport au GLP-1, ce qui lui confère une durée de vie plasmatique de 12 heures. Ainsi, il nécessite une seule injection journalière. Comme le GLP-1 natif, le liraglutide déclenche la sécrétion d'insuline, inhibe la sécrétion post-prandiale du glucagon, retarde la vidange gastrique et améliore la satiété en agissant sur le cerveau [111, 112]. L'albiglutide est directement lié à une albumine humaine recombinante qui permet sa circulation dans la lymphe et sa faible clairance avec une durée de vie de 5 jours [113]. Le dulaglutide est un composé d'une séquence analogue du GLP-1 modifié liée via un peptide de liaison à un fragment (Fc) de chaîne lourde d'immunoglobuline humaine modifiée G4 (IgG4) qui réduit son potentiel immunogène [114].

Un analogue de GLP-1 très similaire au liraglutide, appelé semaglutide, a été récemment développé par Novo Nordisk avec une substitution de Ala8 par un acide 2-aminoisobutyrique afin de stabiliser la molécule contre la dégradation par DPP-4 et un acide stéarique (18C) au lieu d'un acide palmitique(16C) sur la même lysine 26 (la numérotation de GLP-1 commence à His7 après troncation). Son acide gras à chaîne longue confère au semaglutide une plus grande affinité pour l'albumine que le liraglutide. Grâce à ces propriétés, il nécessite seulement une injection seulement une fois par semaine. Cependant, le semaglutide présente une affinité trois fois plus faible que le liraglutide pour le récepteur de GLP-1 [115].

Le plus souvent associé à la metformine, le liraglutide s'est montré efficace dans le contrôle et la stabilisation de la glycémie (visible par la baisse des taux d'HbA1c), avec très peu de risque d'hypoglycémie étant donné son mécanisme d'action glucose-dépendant. En effet, au niveau de la cellule bêta, la fixation du GLP-1 sur son récepteur induit un mécanisme dépendant de molécules intermédiaires issues du métabolisme du glucose (telle que l'inositol-3-phosphate). En outre, le liraglutide aide à la perte de poids et à l'amélioration du risque cardiovasculaire lié au diabète de type 2 [116-118]. Ce dernier point est essentiel car les maladies cardiovasculaires figurent parmi les principales pathologies associées au diabète.

### *c) L'atteinte vasculaire, principale cause des complications du diabète*

L'hyperglycémie chronique peut rester très longtemps sans symptôme, mais elle altère progressivement l'organisme et entraîne ainsi le développement de pathologies sur le long terme. En effet, beaucoup de patients ignorent leur état diabétique, et ne le découvrent qu'au stade de complication. Ces complications peuvent être évitées ou retardées en maintenant entre autres une glycémie la plus proche possible de la normale [6].

L'hyperglycémie, par la formation des AGE et l'induction d'un stress oxydant, affecte les yeux-par atteinte des vaisseaux et des nerfs [119]. La néphropathie diabétique (affection des reins) est l'une des complications les plus sérieuses du diabète [120]. Les périodontites (inflammation du périoste alvéolo-dentaire ou membrane qui entoure la dent) [121] et les infections cutanées [122] sont également très courantes parmi les personnes diabétiques. L'exposition prolongée à l'hyperglycémie touche également le système nerveux et peut aussi conduire à une dysfonction érectile, à des problèmes digestifs, urinaires et bien d'autres [6]. Bien que la neuropathie soit l'élément principal de ce que l'on nomme le « pied diabétique », celui-ci se manifeste aussi par une diminution de la circulation sanguine due aux vaisseaux sanguins endommagés. Ces deux facteurs augmentent fortement le risque d'ulcération, d'infection et d'amputation [123, 124].

Ainsi, les principales conséquences du diabète sont liées à une atteinte des vaisseaux sanguins qu'on appelle angiopathie. Le fort taux de glucose sanguin perturbe l'homéostasie de l'endothélium vasculaire, principalement par la production de ROS intracellulaires, qui altèrent le statut rédox des cellules endothéliales [59]. La microangiopathie est spécifique du diabète et atteint surtout les capillaires sanguins mais aussi les artérioles et veinules. Plus le diabète est ancien et sévère et plus le risque de microangiopathie est élevé. Selon l'organe concerné, la pathologie sera différente. La destruction des péricytes, cellules murales de la lame basale des capillaires, entraîne des micro-anévrysmes, qui sont des dilatations localisées du vaisseau en forme de petite poche qui se remplit de sang, à l'origine de rétinopathies. L'altération des capillaires au niveau glomérulaire participe à l'installation d'une néphropathie diabétique [125].

La macroangiopathie concerne les artères de moyen et gros calibre. Elle n'est pas spécifique du diabète mais ce dernier en est un facteur de risque important. Elle peut toucher les artères coronaires, carotidiennes ou périphériques le plus souvent des membres inférieurs. La macroangiopathie se caractérise principalement par des lésions athérosclérotiques ou thrombotiques au sein de la média et l'intima des artères qui sont associées à des calcifications.

Ces lésions entraînent un risque élevé d'accident vasculaire cérébral, qui représente la première cause de mortalité parmi la population diabétique [126]. Le diabète est donc très étroitement lié à la pathologie de l'athérosclérose, que nous allons décrire dans le chapitre suivant.

## **B. L'athérosclérose**

L'athérosclérose, cause principale des angiopathies diabétiques, est considérée comme une maladie liée au style de vie moderne (alimentation riche, sédentarité). Alors que l'espérance de vie a doublé dans les pays développés entre 1800 et 2000, grâce notamment à la maîtrise des maladies infectieuses, l'athérosclérose y est devenue la première cause de mortalité. Pourtant, cette pathologie existe depuis plus de 5000 ans [127, 128]. Nous allons voir dans ce chapitre, les caractéristiques de cette maladie, ainsi que sa pathogénèse qui implique en particulier les lipoprotéines dont nous présenterons préalablement les différents types et le métabolisme. Nous verrons ensuite les facteurs de risque et les traitements de cette pathologie et nous discuterons enfin du lien étroit existant entre le diabète et l'athérosclérose.

### **1. Les caractéristiques de l'athérosclérose**

#### ***a) L'athérosclérose, une maladie artérielle***

L'athérosclérose, signifiant « durcissement de la paroi des artères » est le processus sous-jacent à bon nombre de maladies cardiovasculaires. Ces dernières constituent la première cause de mortalité mondiale, soit plus de 30%. L'athérosclérose touche davantage les pays développés, et se fait rare dans les pays d'Asie, d'Afrique, ou d'Amérique latine (*OMS, Centre des médias, Aide-mémoire, Janvier 2015*).

Au XVII<sup>ème</sup> siècle les dépôts blanchâtres observés sur la paroi interne des artères ont été comparés à de la bouillie de farine (du grec *athêra*) d'où le terme d'athérome (-ôma : maladie) proposé par Albrecht von Haller en 1755 [129].

Une artère est constituée de trois tuniques : la plus externe est l'adventice, puis la média et enfin l'intima, chacune séparé des autres par les limitantes externe et interne de la média et de l'intima, respectivement. L'athérosclérose est une maladie inflammatoire de la paroi des artères qui se caractérise par une accumulation progressive de lipides et de cellules inflammatoires à l'intérieur de l'intima des grosses artères. Il se forme d'abord une plaque contenant des lipides (athérome) qui va se durcir par fibrose (sclérose). La plaque peut ensuite évoluer jusqu'à la formation d'un caillot sanguin [130]. La figure suivante illustre la structure d'une artère saine et d'un cas d'athérosclérose (*Figure 10*).

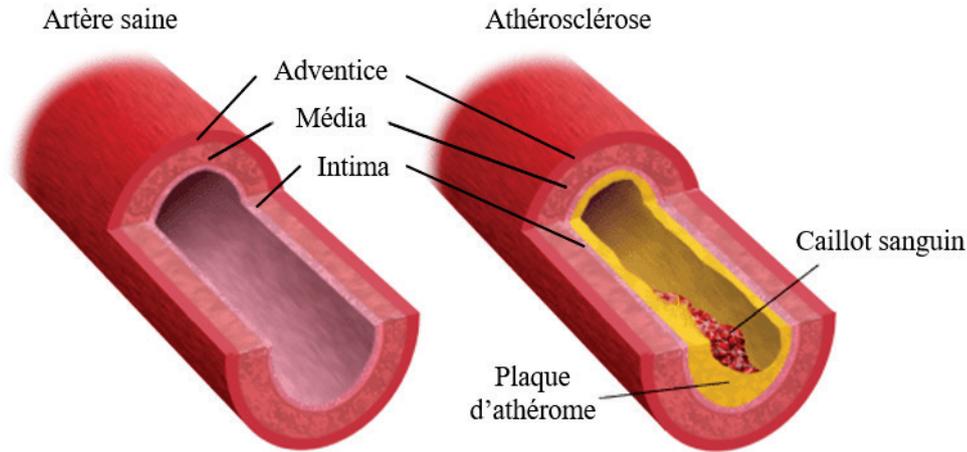


Figure 10: Schéma de la structure d'une artère saine et de l'athérosclérose (adapté de [cardiotherapy.com](http://cardiotherapy.com))

### ***b) L'athérosclérose, une maladie évolutive***

L'athérosclérose peut rester longtemps asymptomatique, même durant toute une vie. Si la lésion progresse, l'athérosclérose pourra évoluer en athérotrombose. Celle-ci peut avoir pour origine une rupture ou bien une érosion superficielle de la plaque. Un thrombus se forme alors en quelques minutes, et entraîne l'occlusion plus ou moins importante de l'artère concernée. Ainsi, l'athérotrombose est une complication de l'athérosclérose qui va avoir pour conséquence les événements cardiovasculaires tels que les accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou l'infarctus du myocarde [131].

En effet, la plaque d'athérosclérose peut induire un rétrécissement (sténose) plus ou moins important de l'artère et bloquer partiellement ou totalement le flux sanguin arrivant à un tissu ou un organe (ischémie). Selon l'organe concerné, l'athérosclérose pourra ainsi causer une maladie coronarienne (angor ou infarctus) s'accompagnant d'une angine de poitrine (douleurs), un risque d'AVC si elle touche la carotide ou les artères cérébrales, des maladies artérielles périphériques affectant les membres, ou encore une maladie rénale chronique. Une analyse des symptômes associés peut alors permettre un diagnostic [132].

### ***c) L'athérosclérose et le « mauvais cholestérol »***

Parmi les facteurs favorisant le développement de l'athérosclérose, tels que l'hypertension, le tabagisme, le diabète, l'obésité et la sédentarité, figure également le taux élevé de LDL-C (cholestérol des lipoprotéines de faible densité) couramment qualifié de « mauvais cholestérol ». L'autre cholestérol appelé HDL-C (cholestérol des lipoprotéines de haute densité), également appelé « bon cholestérol » possède plutôt des propriétés protectrices. Le déséquilibre entre ces

deux types de lipoprotéines, en faveur des LDL, nommé « dyslipidémie », est un facteur de risque majeur de l'incidence des accidents cardiovasculaires. Pour des raisons de prévention, tout comme des taux limites d'HbA1c sont fixés pour les patients diabétiques, des taux de LDL-cholestérol à ne pas dépasser sont déterminés pour les patients à risque. On comprend ainsi que le métabolisme lipidique et en particulier celui des lipoprotéines est un élément clé dans la compréhension de la physiopathologie de l'athérosclérose [133, 134].

## **2. Le métabolisme des lipoprotéines**

Après une présentation des différentes classes de lipoprotéines, en insistant sur celles impliquées dans le processus athérogéniques, nous décrirons leur métabolisme.

### ***a) Les lipoprotéines***

#### ***i. Les différentes classes de lipoprotéines***

Les lipoprotéines sont des macromolécules de taille et de composition variées. Elles sont constituées d'un corps lipidique hydrophobe composé de triglycérides et d'esters du cholestérol, enveloppé d'une monocouche de phospholipides et de cholestérol non estérifiés. La cohésion de ce complexe lipidique est assurée par des apolipoprotéines (apo) spécifiques qui déterminent le devenir de la lipoprotéine. Leur différence de densité a initialement permis leur isolement par ultracentrifugation.

Ainsi les principales lipoprotéines sont classées par ordre de densité croissante : les chylomicrons, les lipoprotéines de très faible densité ou VLDL (*very low density lipoprotein*), les lipoprotéines de densité intermédiaire ou IDL (*intermediate density lipoprotein*), les lipoprotéines de faible densité ou LDL (*low density lipoprotein*) et les lipoprotéines de haute densité ou HDL (*high density lipoprotein*) (*Figure 11*).

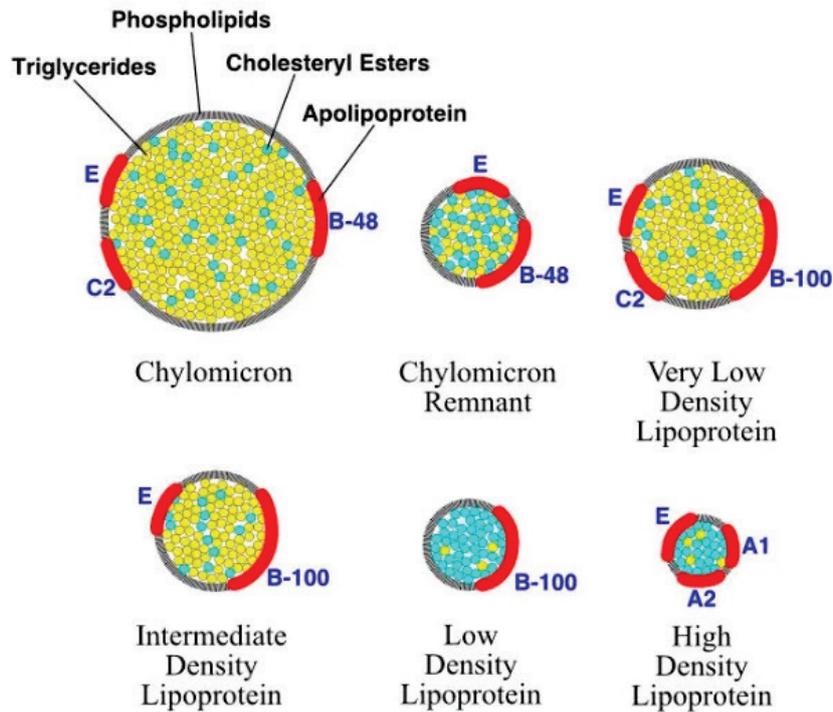


Figure 11: La composition des différents types de lipoprotéines (apoa1.org)

La densité d'une lipoprotéine diminue lorsque la proportion de lipides qu'elle contient augmente. Le lipodogramme par électrophorèse (sur gel d'agarose ou de polyacrylamide), plus rarement utilisée que l'ultracentrifugation, permet de les séparer en fonction de leur charge électrique en lipoprotéines  $\alpha$ , pré- $\beta$  et  $\beta$ . La méthode d'ultracentrifugation sépare les HDL<sub>2</sub> constituées des  $\alpha$ -1 HDL principalement et les autres se regroupant sous le nom de HDL<sub>3</sub>. Les lipoprotéines ont des fonctions variées. [135].

## ii. Fonctions et compositions des différentes lipoprotéines

Les chylomicrons assurent le transport des lipides de l'intestin vers le foie (voie exogène ou entéro-hépatique). Les VLDL, IDL et LDL transportent les lipides du foie aux tissus (voie endogène). Les HDL transportent les lipides, en particulier le cholestérol des tissus vers le foie (transport inverse du cholestérol). La taille, la composition en lipides et en apolipoprotéines ainsi que la fonction principale des différentes lipoprotéines sont détaillées dans le *Tableau 2*.

Classes de lipoprotéines	Sous-classes de lipoprotéines	Nom d'après l'électrophorèse	Taille	Densité	Composition	Principales apolipoprotéines	Fonctions principales
Les lipoprotéines de plus faible densité	Les chylomicrons	(Ne migre pas)	75 à 1200 nm	< 0,93	86 % TG, 2 % P, 12 % C + PL	ApoB48 (aussi ApoE et ApoC)	Transportent les lipides issus de la digestion
	Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL)	Lipoprotéines pré-β	30 à 80 nm	0,93 à 1,006	55 % TG, 19 % C, 18 % PL, 8 % P	ApoB100 (aussi l'ApoE et l'ApoC)	Transportent les triglycérides hépatiques
	Lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL)	Lipoprotéines pré-β lentes	25 à 35 nm	1,006 à 1,019	41% TG + PL, 40 % C, 19% P	ApoB100 (aussi l'ApoE)	Transportent le cholestérol vers les tissus
	Lipoprotéines de faible densité (LDL)	Lipoprotéines β	18 à 25 nm	1,019 à 1,063	39% C, 39% TG + PL, 22 % P	ApoB100 (aussi l'ApoE)	Transportent le cholestérol vers les tissus
Lipoprotéine (a) (Lp(a))		(migre entre LDL et HDL)	env. 25 nm	1,040 à 1,115	particule de LDL + apo(a) lié à l'ApoB100 par un pont disulfure		Transport des phospholipides oxydés
Les lipoprotéines de haute densité (HDL)	HDL2	Lipoprotéines α1	env. 11 nm	< 1,063	50% P, 30-35% PL, 22-47% C	ApoA1 (aussi ApoA2, parfois ApoC)	Transportent le cholestérol des tissus vers le foie
	HDL3	Lipoprotéines α2	9 à 12 nm	1,063 à 1,125			
		Lipoprotéines α3	7 à 9 nm	1,125 à 1,210			
	HDL naissants	Lipoprotéines α4 et pré-βHDL	5 à 8 nm	1,210 à 1,250			

Tableau 2 : Les différents classes de lipoprotéines, leurs caractéristiques et leur principale fonction. TG : triglycérides, P : protéines, C : cholestérol, PL : phospholipides (d'après [135-138]).

Les α-4 HDL et les pré-βHDL sont une population hétérogène de HDL naissantes, plus denses et plus petites que les HDL matures qui se distinguent par leur forme discoïdale (illustré en *Figure 12*). Les HDL naissantes sont générées *de novo* à partir de l'interaction de l'ApoA1 libre avec le transporteur ABCA1 (ATP-binding cassette 1, ou cholesterol efflux regulatory protein CERP) en initiant la formation du complexe ApoA1-phospholipides. [137, 138].

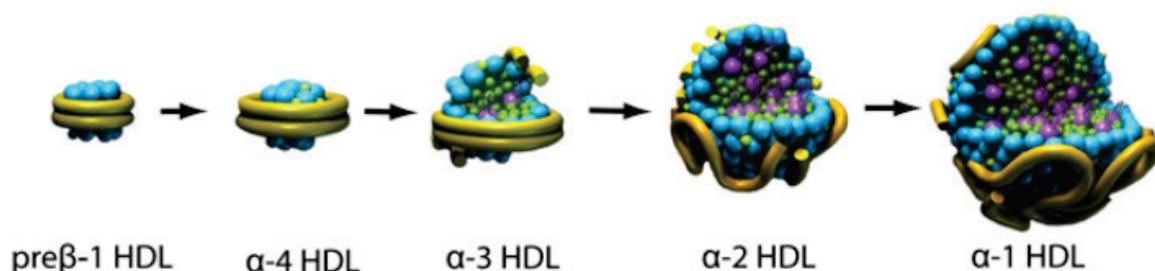


Figure 12: Les différents types de HDL ([www.bostonheartdiagnostics.com](http://www.bostonheartdiagnostics.com)).

### iii. Les lipoprotéines impliquées dans les maladies cardiovasculaires

Les LDL, reconnus par leur récepteur noté R-LDL via l'ApoB100 ou l'ApoE, fournissent le cholestérol aux tissus périphériques et jouent un rôle essentiel dans les processus de pathogénèse de l'athérosclérose, qui seront décrits par la suite. La Lp(a) est une classe particulière de lipoprotéine composée d'une molécule de LDL complexée à une apo(a) par un pont disulfure sur

l'ApoB100. Cette liaison ApoB100-apo(a) ne peut être rompue dans les conditions physiologiques car elle nécessiterait une forte réduction. Elle est riche en esters de cholestérol. Elle est également associée au développement des maladies cardiovasculaires[137].

Les HDL, ont au contraire un rôle protecteur. Les  $\alpha$ -1 HDL constituent la majorité des HDL<sub>2</sub> et leur taux est associé à un risque diminué de maladies cardiovasculaires. L'analyse des sous-populations de HDL permet de mieux prédire ce risque, comparé au taux de HDL total [139].

### ***b) Les trois voies principales du métabolisme des lipoprotéines***

Le métabolisme des lipoprotéines se décline en trois voies essentielles : la voie endogène, la voie exogène et le transport inverse du cholestérol (Figure 13).

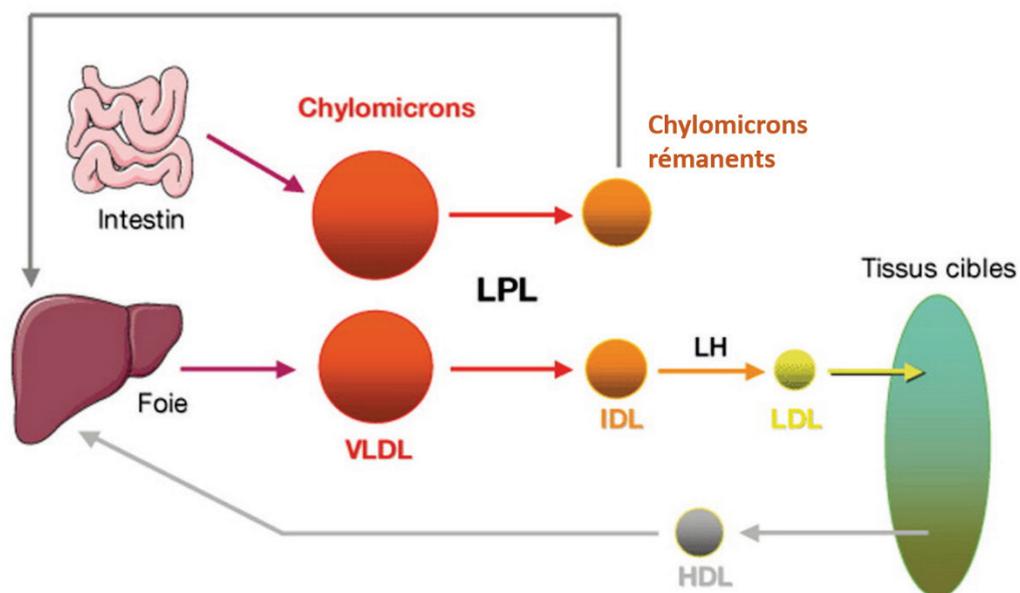


Figure 13 : Le métabolisme des lipoprotéines.

La voie exogène (des intestins au foie via les chylomicrons), la voie endogène (du foie vers les tissus périphériques via les VLDL, IDL et LDL) et le transport inverse du cholestérol (des tissus vers le foie via les HDL). LPL : lipoprotéine lipase ; LH : lipase hépatique [140].

#### ***i. La voie des lipides exogènes***

Les lipides provenant de l'alimentation sont absorbés au niveau des entérocytes de l'épithélium intestinal puis sont sécrétés dans la lymphe [141, 142]. Les chylomicrons transportent le cholestérol alimentaire qui est transformé en esters de cholestérol au niveau des entérocytes par l'action de l'acyl coenzyme A-cholestérol-acyltransférase (ACAT), dans le réticulum endoplasmique [143]. L'apo B-48 est nécessaire à la formation des chylomicrons et elle est obtenue des premiers 48% de l'apo B-100 par épissage alternatif de l'ARN messager. Les

chylomicrons passent dans la lymphe et rejoignent la circulation sanguine. Arrivés aux organes, la lipoprotéine lipase (LPL) hydrolyse les triglycérides des chylomicrons en acides gras libres pour les besoins énergétiques de la cellule. Les chylomicrons rémanents qui en résultent sont captés par le foie via l'ApoE reconnue par des récepteurs spécifiques, les R-LDL et LRP (R-LDL-related protein). Ainsi, la quantité de chylomicrons augmente après un repas et redescend à des niveaux très faibles après 12 heures post-prandiales.

### *ii. La voie des lipides endogènes*

Les lipides endogènes sont transportés du foie aux tissus périphériques. A distance des repas, les VLDL vont prendre le relais des chylomicrons pour assurer l'apport en triglycérides aux tissus. Les VLDL se forment dans le foie grâce à l'ApoB100. Une fois libérés dans la circulation, les VLDL vont recevoir l'ApoC2 et l'ApoE des particules de HDL rencontrées. Les VLDL sont également hydrolysées par la LPL au niveau des capillaires sanguins de l'organe pour permettre la libération des acides gras. Les triglycérides des IDL issues de ce processus vont ensuite être captées par le foie via l'ApoE et être davantage hydrolysées par la lipase hépatique formant ainsi des LDL, très riches en ester de cholestérol. Les LDL sont libérés de la circulation et peuvent se fixer aux cellules possédant le R-LDL qui reconnaît l'ApoB100. Les LDS sont ensuite captées par endocytose pour délivrer à la cellule le cholestérol et les autres lipides après hydrolyse. Au fur et à mesure, les LDL perdent leurs apolipoprotéines à l'exception de l'ApoB100, qui assure l'intégrité de la lipoprotéine, jusqu'à sa captation par un R-LDL. La LDL a une demi-vie d'environ trois jours [144]. Dans certaines pathologies comme l'hypercholestérolémie familiale (HF), ce temps est cependant allongé à cause de la diminution de la clairance des LDL [145].

Le cholestérol libre des LDL peut être estérifié par la lécithine:cholestérol acyltransférase (LCAT). La protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) peut échanger des esters de cholestérol contre des triglycérides entre différentes classes de lipoprotéines [137].

### *iii. Le transport inverse du cholestérol*

Le transport inverse du cholestérol est assuré par les HDL. Les apolipoprotéines des HDL sont synthétisées par le foie et l'intestin ou récupérées dans la circulation. Les HDL reçoivent du cholestérol des autres lipoprotéines hydrolysées mais aussi via le récepteur SRB1/CLA1 (au niveau du foie, des tissus stéroïdogéniques et des macrophages) et via ABCA1 (au niveau du foie, des macrophages, des reins, des intestins et des glandes surrénales). La LCAT intervient ensuite pour l'estérification du cholestérol. Progressivement, la taille du HDL augmente et passe

de HDL<sub>3</sub> à HDL<sub>2</sub>. La CETP permet l'échange du cholestérol estérifié contre des triglycérides entre les HDL et les lipoprotéines contenant l'ApoB100. Les HDL ne sont pas internalisés mais après la libération du cholestérol estérifié, il redevient disponible dans la circulation. Dans le foie, le cholestérol sera transformé en sels biliaires ou sera directement excrété dans la bile. Dans les tissus stéroïdogéniques, le cholestérol sera transformé en hormones stéroïdiennes [146].

Etant donné leur rôle dans l'acheminement du cholestérol des tissus vers le foie, les HDL ont un rôle protecteur dans la physiopathologie de l'athérosclérose. De surcroît, les HDL ont aussi d'autres propriétés telles qu'une action anti-inflammatoire et athéroprotectrice. Les LDL, quant à elles sont fortement proathérogéniques. Outre leur qualité de transporteur lipidique, les lipoprotéines ont donc un poids particulier dans la pathogénèse de l'athérosclérose [147].

### 3. La pathogénèse de l'athérosclérose

L'athérosclérose progresse au cours de différentes étapes au cours desquelles se forme puis s'aggrave la plaque d'athérome, jusqu'à se scléroser. Au cours du temps, la plaque peut demeurer stable ou croître et se compliquer par une rupture induisant la formation d'un thrombus (*Figure 14*). Le déséquilibre du métabolisme lipidique, en particulier en faveur des LDL joue un rôle essentiel dans l'installation de l'inflammation chronique non résolue qui sous-tend le processus pathogénique de l'athérosclérose [147].

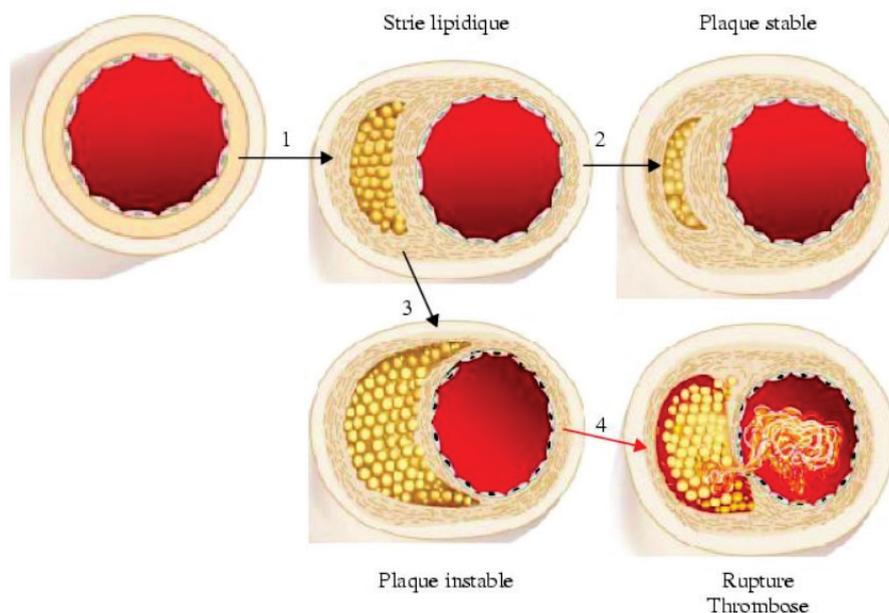


Figure 14 : La formation de la plaque d'athérome [148].

### ***a) La lésion de l'endothélium artériel***

La première étape de formation de la plaque, est la lésion de l'endothélium qui va permettre l'entrée des LDL dans l'intima. Les cellules endothéliales forment une barrière semi-perméable qui régule les échanges entre le sang et le compartiment interstitiel. L'intégrité de l'endothélium est nécessaire au maintien de l'homéostasie vasculaire. L'endothélium est capable de percevoir les stimuli locaux et systémiques et d'adapter son action. Entre autres, l'endothélium a une action régulatrice sur le tonus vasomoteur (degré de contraction des vaisseaux), sur l'activité plaquettaire, la thrombose, la fibrinolyse et l'adhésion leucocytaire. Ces points de contrôle sont essentiels dans le processus d'athérosclérose. Dans des conditions physiologiques, l'endothélium possède des propriétés anti-thrombogéniques, et contrôle le passage de substances et des cellules immunitaires du sang vers les tissus [130]. La cause majeure de la perturbation de l'endothélium est l'effet néfaste des LDL circulants sur la synthèse de l'oxyde nitrique (NO). Ce NO, impliqué dans la vasodilatation est synthétisé en réponse à un stress par l'enzyme eNOS (endothelial nitric oxide synthase) présente au niveau des cavéoles (invaginations membranaires riches en lipides) de la cellule endothéliale. Une concentration importante de LDL natifs ou bien la présence de LDL oxydés (LDLox) modifie les propriétés des cavéoles et empêche l'activation de l'enzyme eNOS en réponse aux signaux vasodilatateurs tels que l'acétylcholine. Cela peut donc favoriser une hypertension artérielle [149-151]. Au contraire, les HDL peuvent induire l'activation d'eNOS et présentent donc un effet protecteur [152]. Cette perte localisée de la fonction endothéliale va induire une réaction inflammatoire qui est la première réaction de l'organisme à un dommage tissulaire [151].

### ***b) La réaction inflammatoire***

La dysfonction endothéliale va se traduire par une expression du facteur nucléaire (NF)-kB et des molécules d'adhésion ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) et VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) qui vont favoriser l'adhésion leucocytaire et infiltration dans l'espace sous-endothélial. Les monocytes s'infiltrent par diapédèse et une fois activés, se différencient en macrophages qui vont phagocyter les LDL retenus par des protéoglycanes et oxydés dans l'intima. Les macrophages alors chargés de lipides deviennent des cellules spumeuses qui s'agrègent et forment alors des stries lipidiques : la plaque d'athérome est alors formée. Les LDLox vont induire l'augmentation de l'expression des peptides chémoattractants tels que MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), l'interleukine (IL)-8 ainsi que les molécules d'adhésion (intégrines et sélectines). Les LDLox vont aussi directement activer les plaquettes sanguines qui sont elles-mêmes impliquées dans le recrutement des leucocytes [130].

### ***c) La fibrose et la sclérose de la plaque***

Les stimuli libérés induisent la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses de la média qui vont migrer après rupture de la lame élastique interne. Il se forme alors une plaque fibromusculaire, composée principalement de fibres de collagène. Les fibres de collagène se calcifient progressivement et provoquent un durcissement ou sclérose de la plaque. Un corps nécrotique se forme au sein de la plaque, issu de l'apoptose et de la nécrose des cellules spumeuses et des cellules musculaires lisses qui s'accompagnent d'une accumulation de lipides, principalement de cholestérol. Le remaniement structural de la plaque induit la formation d'une chape fibreuse au-dessus du corps nécrotique contenant de plus en plus de lipoprotéines oxydées, de cholestérol et de débris cellulaires [153].

### ***d) L'angiogenèse et l'hémorragie intraplaque***

Des facteurs angiogéniques libérés par la plaque induisent le développement de néo-vaisseaux provenant de l'adventice. Il se produit ensuite une hémorragie intraplaque qui va favoriser l'expansion du corps nécrotique mais également l'inflammation en constituant une voie d'entrée alternative pour les monocytes et autres cellules immunitaires. Un processus inflammatoire aboutit généralement à une étape dite de résolution, pendant laquelle les macrophages quittent le site de la lésion pour rejoindre la lymphe pour la présentation d'antigène. La clairance des leucocytes apoptotiques induit un changement phénotypique des macrophages vers un statut anti-inflammatoire en faveur de la cicatrisation par la libération des facteurs profibrotiques et proangiogéniques. Si ce mécanisme n'est pas suffisant à la résolution de l'inflammation, notamment sous l'action proinflammatoire des LDLox, des macrophages proinflammatoires vont demeurer au sein de la plaque [153, 154].

### ***e) La rupture de la plaque et la formation du thrombus***

Les cellules inflammatoires aux abords de la plaque, notamment les macrophages activés, les lymphocytes T (tueurs) et NK (natural killer) ainsi que les cellules dendritiques, vont moduler le phénotype proinflammatoire de l'endothélium qui va contribuer à l'instabilité de la plaque. Cette instabilité est due à la perte graduelle des cellules musculaires lisses et à la protéolyse des composants de la matrice extracellulaire qui va amincir progressivement la chape fibreuse. Les plaques sujettes à une rupture se caractérisent par un corps lipidique proéminent une chape fibreuse fine contenant de nombreux macrophages, accompagnés d'une angiogenèse, d'une inflammation de l'adventice et d'une progression vers la lumière vasculaire [155]. L'érosion progressive de la plaque entraîne une ulcération de l'endothélium qui est ainsi mis à nu. La plaque

peut aussi se rompre brutalement, le corps nécrotique est alors exposé et l'hémorragie s'étend dans la lumière vasculaire. Les composés thrombogéniques libérés ainsi que ceux de la circulation vont aboutir à la formation du thrombus, notamment par l'adhésion des thrombocytes (ou plaquettes). Les LDL oxydés ou natifs participent également à l'activation plaquettaire. Le thrombus permet de contenir l'hémorragie mais si son volume progresse, il obstrue la lumière artérielle. A ce stade, la plaque est dite compliquée. Le thrombus peut évoluer jusqu'à ce que la circulation sanguine soit trop fortement compromise ou bien que le détachement du thrombus entraîne une occlusion en aval de l'artère. Cela entraîne une ischémie dans l'organe concerné et se traduit par un accident vasculaire à traiter d'urgence [153, 154]. Avant que cet événement ne se produise, il est donc essentiel de pouvoir prévenir l'initiation ou la progression de la plaque d'athérosclérose, notamment chez les sujets présentant des facteurs de risque.

#### **4. Les facteurs de risque, les traitements et la prévention de l'athérosclérose**

##### ***a) L'hypertension et l'hypercholestérolémie : principaux facteurs proathérogènes***

L'hypertension est un facteur associé aux maladies cardiovasculaires puisqu'elle peut être un facteur initiateur. En effet, une trop forte pression sanguine exercée sur la paroi des artères peut endommager l'endothélium vasculaire. Notamment, un taux élevé de LDL plasmatiques (hypercholestérolémie) est une des causes de l'hypertension comme expliqué précédemment [147].

L'hypercholestérolémie, se caractérise par des taux anormalement élevés de LDL circulants. Elle constitue un facteur clé de la pathogenèse de l'athérosclérose, étant donné que le fort taux de LDL circulant est impliqué, dans la dysfonction endothéliale et dans la persistance du phénomène inflammatoire au sein de la plaque. L'hypercholestérolémie est donc un facteur de risque important à prendre en compte pour la prévention des maladies cardiovasculaires. Elle est généralement liée à une alimentation riche en cholestérol et en acides gras saturés [147]. Il existe cependant une forme héréditaire de l'hypercholestérolémie dite familiale (HF). Celle-ci est une maladie autosomale dominante due à une mutation soit dans le gène du R-LDL soit dans celui d'une protéine impliquée dans sa voie de signalisation. Il peut par exemple s'agir d'une mutation gain de fonction dans le gène de la protéine PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9), impliquée dans la dégradation du R-LDL, ce qui induit une diminution de la clairance des LDL plasmatiques [156].

Des facteurs constitutionnels tels que l'âge et le sexe peuvent également favoriser l'athérosclérose. En effet, la sénescence cellulaire, liée au stress oxydant, diminue les capacités réparatrices de l'endothélium. [157]. Aussi, les femmes sont plus touchées que les hommes, parfois en lien avec la prise de contraceptifs hormonaux [158, 159]. Des facteurs liés au mode de vie tels que la sédentarité, le tabagisme [160] ou une alimentation riche en lipides sont également des facteurs de risque non négligeables [147]. Le stress et les chocs émotionnels peuvent également être impliqués dans la rupture de la plaque [153].

### ***b) Les traitements de l'athérosclérose***

Le traitement de l'athérosclérose consiste principalement à supprimer ou contrôler les facteurs contribuant à la progression de la plaque, c'est-à-dire soit les pathologies associées (hypercholestérolémie, hypertension) soit les comportements à risque (tabagisme, alimentation riche en lipides).

#### ***i. Les traitements classiques***

Puisque le tabagisme, l'obésité et l'hypercholestérolémie sont des facteurs importants de risque de l'athérosclérose, la première ligne de traitement curatif ou préventif se base sur une modification des habitudes alimentaires et du style de vie afin de rétablir un IMC correct et une lipidémie normale. Ce changement comprend l'arrêt du tabac, la reprise d'une activité physique et une nutrition adaptée. Les recommandations diététiques incluent une réduction des acides gras saturés en faveur des acides gras mono- et polyinsaturés, mais aussi un apport suffisant en vitamines et minéraux [161].

Bien que leur innocuité soit contestée chez les patients diabétiques [162], les statines représentent le principal traitement médicamenteux de l'hypercholestérolémie. Elles inhibent la biosynthèse du cholestérol en inhibant la 3-hydroxy-3-méthylglutarylcoenzyme (HMG-CoA) réductase au niveau du foie. Le déficit en cholestérol intracellulaire va induire une augmentation de l'expression du R-LDL, ce qui va diminuer le taux de LDL plasmatique [163]. -L'hypertension, en tant que facteur fragilisant l'endothélium artériel, est également un paramètre à contrôler. Les principaux traitements sont les bloqueurs de canaux calciques, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (AEC), et les antagonistes du récepteur à l'angiotensine [164].-Les antiagrégants plaquettaires sont parfois prescrits pour éviter la formation de caillots sanguins. Il peut s'agir de l'aspirine à faible dose ou du clopidogrel qui est un antagoniste des récepteurs de l'adénosine diphosphate au niveau des plaquettes [165].

## *ii. Les nouvelles thérapies*

### *– Modification du microbiote intestinal*

L'alimentation est le premier facteur déterminant la composition du microbiote intestinal, un facteur impliqué de manière non négligeable dans la stéatose hépatique, la résistance à l'insuline, l'obésité et les maladies cardiovasculaires [166]. Outre les changements alimentaires visant à modifier le microbiote, des molécules médicamenteuses peuvent cibler spécifiquement les métabolites nocifs produits par celui-ci. Ainsi, la triméthylamine, produite par les bactéries de la flore intestinale est associée au risque cardiovasculaire. L'inhibition de ce métabolite a été étudiée comme nouveau traitement de l'athérosclérose [167].

### *– Les microARN*

Les microARN sont des petites séquences d'ARN monobrins de 21 à 25 nucléotides, exprimé dans quasiment toutes les cellules. Ils ont un rôle clé dans la régulation de l'expression génique à un niveau post-transcriptionnel car ils inhibent la traduction des ARN messagers en se fixant à ces derniers par complémentarité de bases. L'implication de certains microARN dans l'athérosclérose a été démontrée bien que les mécanismes mis en jeu ne sont pas complètement élucidés. Certains microARN constituent donc des cibles thérapeutiques dont le blocage par des antagonistes spécifiques peut permettre la régression de l'athérosclérose, ce qui a par exemple été démontré chez la souris pour miR-33 dont l'inhibition augmente le taux de HDL. Les miR-33a/b sont impliqués dans l'homéostasie du cholestérol sanguin [168]. L'agoniste miR-126-5p possède également un effet protecteur. D'autres microARN sont connus pour leur implication dans le processus d'athérosclérose (*Figure 15*). Leurs effets ont été étudiés *in vivo* et *in vitro* [169, 170]. Notons que la notation « miR » correspond à la forme mature du microARN alors que la notation « mir » indique la forme initiale du pré-microARN.

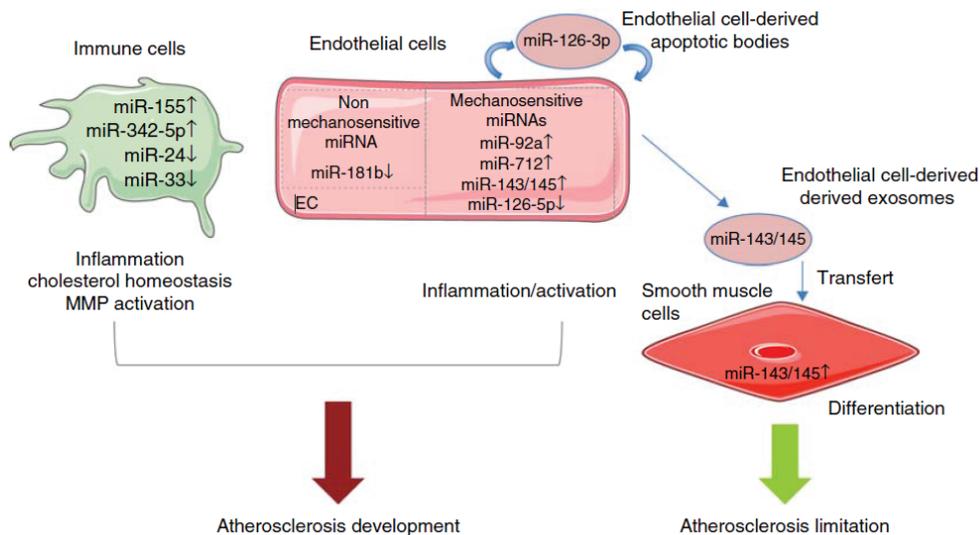


Figure 15: Les microARN connus pour leur implication dans l'athérogénèse [170].

Les HDL sont impliquées dans le transport et la distribution des microARN vers leurs cellules cibles. Parmi les microARN transportés par les HDL humains figure le hsa-miR-223, qui exerce une régulation post-transcriptionnelle de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines [171]. Le microARN miR-302a inhibe l'efflux de cholestérol en diminuant l'expression de l'ABCA1. Le traitement par des anti-miR-302 s'est ainsi montré efficace dans la réduction des plaques d'athérosclérose et de l'inflammation chez des souris déficientes pour le récepteur aux LDL [172]. Les HDL peuvent servir de vecteur pour le transport de petits ARN interférant (ARNi ou siRNA) jusqu'au foie pour la régulation de gènes dans différentes pathologies [173].

#### – La thérapie HDL

Des injections fémorales d'HDL recombinants (rHDL) chez des patients atteints d'athérosclérose se sont montrées efficaces dans la réduction de l'inflammation mais aussi dans la réduction du volume de la plaque [174]. Une injection unique de rHDL (CSL-111) chez des patients diabétiques de type 2 a montré qu'une augmentation de 40% du taux de HDL sanguin, réduit de 50 à 70% l'agrégation plaquettaire, comparé à l'injection d'un placebo. Les HDL sont en effet impliqués dans la diminution du risque de formation du thrombus [175]. Les HDL peuvent également être utilisés comme vecteurs pour des molécules thérapeutiques [176]. Des études ont notamment montré l'efficacité des HDL chargés avec le Tanshinone IIA, une substance antiathérogène naturelle extraite de la sauge rouge [177].

## **5. Le lien entre le diabète et l'athérosclérose**

### ***a) Le diabète : un facteur de risque indépendant de l'athérosclérose***

Le diabète de type 2 est associé à plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire, notamment l'hypertension, l'obésité et la dyslipidémie. Ce risque est 2 à 3 fois plus élevé chez les personnes diabétiques en ce qui concerne les hommes et jusqu'à 6 fois plus élevé chez les femmes. Les maladies cardiovasculaires sont d'ailleurs la première cause de mortalité dans la population diabétique, avant le cancer [178]. L'athérosclérose est plus précoce et plus agressive lorsqu'elle est associée à un diabète. Par ailleurs, le niveau de risque d'évènement vasculaire dans le cas du diabète est équivalent à celui des sujets déjà atteints de maladies cardiovasculaires et le risque d'AVC est trois fois supérieur comparé à un sujet sain. Enfin, le diabète est un facteur de mauvais pronostic en cas d'infarctus du myocarde [59, 179].

Comme expliqué précédemment, l'hyperglycémie peut être le facteur initiateur du processus athérogène en favorisant la dysfonction endothéliale par la création d'un stress oxydant via la production de ROS intracellulaires [59]. Le diabète est aussi impliqué dans la progression de l'athérosclérose, notamment par l'action des AGE, issus des processus de glycation et d'oxydation [180, 181].

La leptine, à la fois hormone de satiété et cytokine proinflammatoire, fabriquée par les adipocytes, est également un activateur de la production de ROS intracellulaire. Elle favorise l'oxydation lipidique et la production de MCP-1 par les macrophages [182]. Le niveau de leptine est augmenté chez les patients diabétiques de type 2 et est ainsi associée aux maladies cardiovasculaires [183].

### ***b) Rôle des AGE dans la pathogenèse de l'athérosclérose***

L'accumulation d'AGE, engendrée dans le contexte du diabète, intervient dans la pathogenèse de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires à cause de son implication dans le stress oxydant et dans le processus d'inflammation. La présence de taux élevés d'AGE dans les plaques d'athérosclérose des patients diabétiques peut être associée à la sévérité de la pathologie. Ils affectent en effet la matrice extracellulaire et contribuent à la perméabilité vasculaire, à l'inactivation du NO et causent la progression de la plaque par l'induction de cytokines proinflammatoires [184].

En se liant au récepteur RAGE, les AGE vont favoriser le stress oxydant par la production de ROS. D'une part, les AGE formés altèrent directement les propriétés des protéines touchées,

contribuant ainsi aux différentes complications du diabète. D'autre part, en activant le RAGE, les AGE induisent un stress oxydant et activent ainsi des facteurs de transcription redox-sensibles tels que le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B, la p21Ras ou la protéine activatrice AP-1 qui sont des intermédiaires de l'expression de médiateurs de l'inflammation et favorisent ainsi les processus proathérogéniques dont la coagulation et l'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) (Figure 16).

Le blocage des récepteurs RAGE par un antagoniste permet une stabilisation de la plaque chez la souris ApoE<sup>-/-</sup> [185, 186]. Les AGE sont également impliqués dans la fibrose des tissus. La glycation du collagène IV des vaisseaux aboutit à la formation d'AGE dont la conséquence directe est une sclérose de la matrice extracellulaire, cause d'une rigidité vasculaire. Le collagène n'est plus renouvelé à cause de sa résistance à la collagénase. D'autre part, l'activation du récepteur RAGE par un AGE active non seulement les voies de l'inflammation mais également d'autres voies encore peu connues dont celle favorisant la fibrose. Par exemple, la protéine Rap1a a été récemment identifiée comme intervenant dans la signalisation aboutissant à la fibrose. Des nouvelles cibles thérapeutiques sont ainsi envisagées : les antagonistes du récepteurs RAGE, la forme circulante du récepteur RAGE qui agit comme un compétiteur, ou les ARN interférants (siRNA ou ARNi) dirigés contre Rap1a par exemple [187, 188].

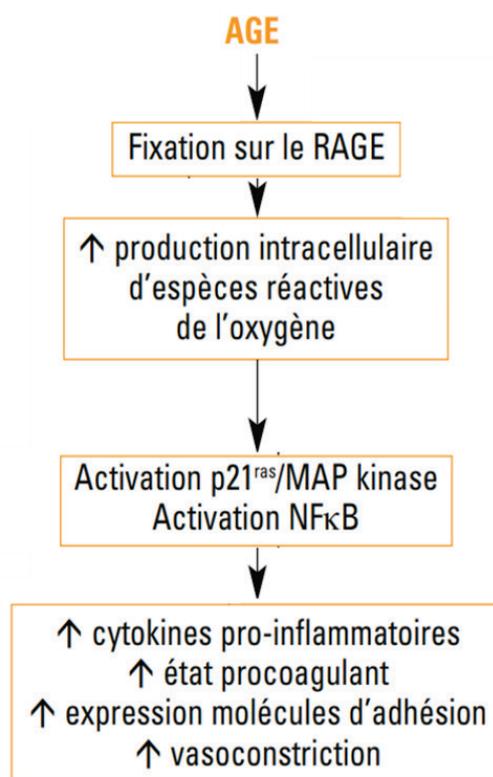


Figure 16: La contribution AGE dans l'athérosclérose via l'interaction avec RAGE [60].

### *c) La glycation et l'oxydation des LDL*

La glycation des LDL est un phénomène majeur dans l'athérogénèse. Les LDL sont glyqués principalement sur les résidus lysines de l'ApoB100. Les LDL de plus petite taille sont associés à l'athérosclérose et sont plus sensibles à la glycation. Des expériences d'oxydation au cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ont montré que les LDL glyquées sont plus sensibles à l'oxydation que les LDL natives. Certaines études ont montré un lien entre le diabète ou l'hyperglycémie post-prandiale et la sensibilité des LDL à l'oxydation. La glycation par les sucres réducteurs ou aldéhydes et l'oxydation par les espèces oxydantes ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) dont les ROS, apparaissent donc dans la pathologie diabétique comme deux phénomènes agissant en synergie. La glycoxydation qui en résulte contribue fortement au risque d'athérosclérose [189, 190].

Non seulement la glycation rend les LDL plus sensibles à l'oxydation, mais les AGE résultants favorisent également le stress oxydant, comme expliqué précédemment, ce qui amplifie encore davantage le risque d'oxydation des LDL [80]. Un stress oxydant est ainsi induit par les LDLox, via l'activation du récepteur LOX-1 (lectin-like oxLDL receptor) dans les cellules endothéliales aortiques via la voie de la phospholipase A2 [80]. Les voies de signalisation impliquent la phospho-kinase C (PKC), les ROS et le facteur NF- $\kappa$ B. Les AGE activent les cytokines inflammatoires et la modification de l'ApoB, ce qui favorise l'endocytose des LDL via le récepteur scavenger des macrophages (MSR), phénomène impliqué dans le processus d'athérogénèse [147].

En plus de favoriser l'oxydation des lipoprotéines et leur captation par les macrophages pour former des cellules spumeuses, les AGE sont également impliqués dans la progression des lésions athérosclérotiques notamment en bloquant la formation du NO [191]. Les AGE issus de la glycation des LDL induisent également l'inflammation via la voie du TLR4 (toll-like receptor 4) [192].

### *d) L'hyperglycémie : un facteur aggravant de l'athérosclérose*

Comme décrit précédemment, l'athérosclérose met en jeu un processus inflammatoire déterminant pour l'initiation et l'évolution de la plaque. Il a récemment été montré que l'hyperglycémie aiguë ou chronique est impliquée dans l'augmentation de l'activation leucocytaire chez les patients atteints de diabète de type 2 ou d'hypercholestérolémie familiale (HF) [193]. De manière intéressante, l'hyperglycémie post-prandiale apparaît plus élevée chez les patients atteints d'HF, ce qui constituerait donc un facteur favorisant l'athérogénèse chez ces patients [194].



## **II. L'albumine et l'apolipoprotéine A1 : deux protéines exposées à l'hyperglycémie**

L'albumine et l'ApoA1 sont des protéines plasmatiques toutes deux concernées par la glycation associée à la pathologie diabétique et impliquées dans le transport de molécules au sein du plasma. Elles font l'objet de notre étude concernant la glycation et ses effets sur leurs propriétés d'interaction.

### **A. L'albumine**

#### **1. Introduction**

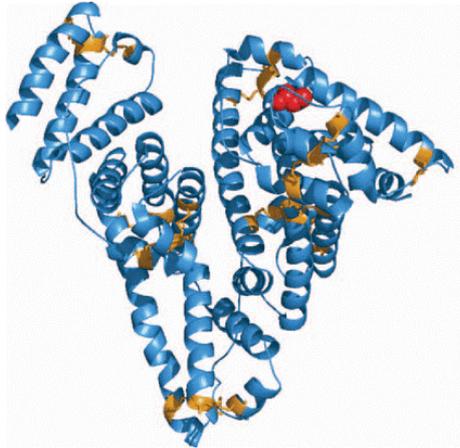
L'albumine est la protéine la plus abondante du plasma chez les vertébrés. C'est une des premières protéines à avoir été identifiée. D'ailleurs son nom vient du terme général « albumène », ou *albumen* qui signifie « protéine » en allemand. Son étymologie provient du latin *albus* (blanc) en référence au blanc d'œuf. Connue depuis l'époque d'Hippocrate (vers l'an 400) par sa présence dans les urines lors de maladies rénales, l'albumine n'a été nommée et étudiée qu'à partir du XIX<sup>ème</sup> siècle. La variation de la concentration sanguine en albumine est utilisée depuis longtemps comme critère de diagnostic pour les maladies rénales et hépatiques mais aussi pour la malnutrition. Elle était également utilisée en chirurgie pour traiter les chocs et traumatismes. Les fonctions de l'albumine sont très variées et sont principalement liées à son large panel de ligands avec lesquels elle est capable d'interagir [196].

#### **2. Les propriétés de l'albumine**

##### ***a) Structure générale de l'albumine***

C'est en 1975 que la séquence peptidique complète de l'albumine a été reportée. L'albumine a une masse moléculaire de 66 438 Da et se compose d'une unique chaîne polypeptidique de 585 acides aminés. C'est une protéine non glycosylée contrairement à la plupart des protéines plasmatiques. En cristallographie aux rayons X, elle a une forme de cœur ou de triangle équilatéral de 80 Å avec une épaisseur d'environ 30 Å. Avec ses 17 ponts disulfures, elle s'organise en trois domaines, possédant chacun deux sous-domaines A et B. Les sous-domaines sont formés de trois hélices alpha séparés par des brins simples. Les domaines adjacents sont connectés entre eux par des portions hélicoïdales [197-199]. L'albumine humaine possède 35 résidus cystéine, dont une seule, en position 34 ne forme pas de pont disulfure (*Figure 18*). Cette

cystéine présente donc un groupement thiol libre (-SH), qui compte quantitativement pour 80% des thiols du plasma. Ce thiol de l'albumine est majoritairement sous forme réduite, avec une très faible proportion sous forme disulfure en liaison avec d'autres petites molécules possédant un groupement thiol telles que des cystéines ou du glutathion. La forme dimérique de l'albumine, formée par pontage des Cys34 de deux monomères, est un marqueur du stress oxydant [200].



*Figure 18 : Structure cristallographique de l'albumine humaine. La seule cystéine réduite, la Cys34 est indiquée en rouge et les ponts disulfures en orange [201].*

### ***b) La synthèse de l'albumine***

L'albumine humaine est synthétisée à partir d'un gène unique situé sur le chromosome 4, dont les deux allèles s'expriment de manière codominante. Il existe un rare polymorphisme génétique de l'albumine, mais les variants qui en résultent sont bénins, et n'entraînent donc pas de pathologie [202].

L'albumine représente plus de 60% des protéines plasmatiques avec une valeur moyenne de 42 g/L et variant entre 35 et 50 g/L. Chaque jour, entre 10 et 15 g d'albumine est synthétisée au niveau des polysomes des hépatocytes. Parmi toutes les protéines synthétisées par le foie, l'albumine en représente 10%. Entre 60 et 70% de l'albumine synthétisée est distribuée dans les tissus, tels que les muscles et la peau, le reste étant retenu au niveau plasmatique [200, 203]. La durée de vie de l'albumine est de 21 jours en moyenne. Les modifications de l'albumine, par exemple par glycation peuvent favoriser sa dégradation par les lysosomes [204].

### ***c) L'albumine et les maladies***

Une faible concentration en albumine peut être due à une baisse de sa synthèse, signe d'une malnutrition ou d'une maladie hépatique. Elle peut aussi résulter d'une perte importante due à une néphrose ou une gastroentéropathie [205]. Le lien entre le taux d'albumine et les maladies

est de plus en plus étudié. Par exemple, une hypoalbuminémie est associée à un risque plus élevé d'apparition de maladies cardiovasculaires. Des études ont également montré qu'un taux d'albumine supérieur à 48 g/L est associé à une mortalité six fois moindre par rapport à un taux inférieur à 40 g/L [206, 207]. Cette correspondance entre taux d'albumine et santé montre bien le rôle essentiel de cette abondante protéine qui assure une multitude de fonctions bénéfiques au sein de l'organisme.

### **3. Les rôles de l'albumine**

#### ***a) Le maintien de la pression oncotique***

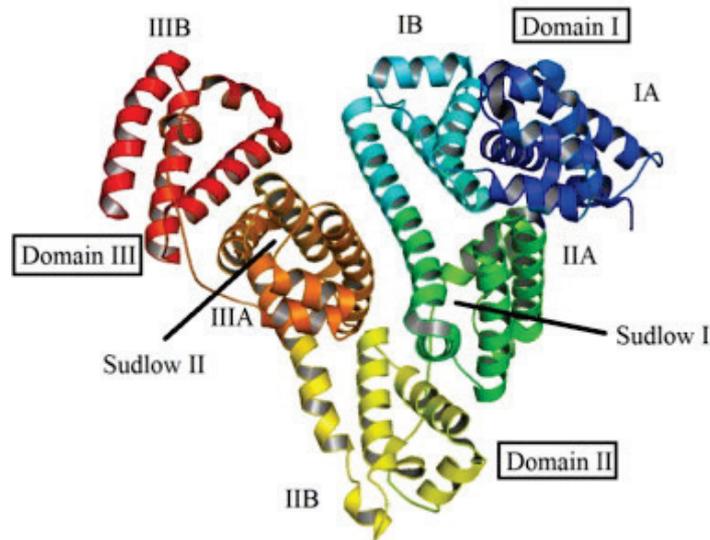
L'albumine a plusieurs rôles au sein de l'organisme. Sa première fonction est d'assurer 80% de la pression oncotique du plasma (pression osmotique qui attire l'eau vers les protéines). D'une part, elle contribue avec les autres globulines à la pression de van't Hoff (pression osmotique exercée par les protéines) par sa masse. D'autre part, elle assure par son faible point isoélectrique, la quasi-totalité de l'effet Donnan (pression osmotique due aux charges électriques portées par les protéines) par sa charge négative [208, 209]. Cette charge négative attire le sodium et permet également à l'albumine de retenir l'eau. L'albumine jouerait également le rôle de tampon du pH plasmatique [200], mais cette affirmation a été ensuite contredite par d'autres auteurs [199].

L'albumine peut aussi agir sur l'intégrité vasculaire. En effet, elle peut se fixer à la matrice interstitielle et au sous-endothélium vasculaire. Elle peut ainsi diminuer le passage de différentes substances (ions, peptides, acides gras) à travers l'endothélium, mais aussi de manière indirecte en retenant certaines molécules (espèces oxydantes, métaux, sodium...) [210, 211]. Outre cette action sur la perméabilité vasculaire, cette capacité de liaison à un large panel de molécules confère à l'albumine de nombreuses autres fonctions, telles que le transport, la détoxification ou encore la défense antioxydante [200].

#### ***b) Structure de l'albumine : une protéine adaptée à la liaison de ligands diversifiés***

Les nombreuses fonctions de l'albumine, dont ses rôles de protection de transport sont dus à sa capacité à lier une multitude de petites molécules. On la compare souvent à une éponge ou un bateau marchand de la circulation sanguine. L'albumine a une structure flexible qui lui permet de s'adapter à plusieurs ligands qui se lie au niveau de nombreux sites localisés dans ses trois domaines. Elle interagit avec un large spectre de composés endogènes et exogènes, hydrophobes pour les plus affins [199]. Les acides gras, les ions métalliques, certains métabolites, et médicaments font partie de ces composés [212]. Les deux principaux sites de liaison de

l'albumine à ses ligands sont situés dans les cavités hydrophobes des sous-domaines IIA et IIIA, respectivement connus sous le nom de sites de Sudlow I et II [213, 214]. La structure tertiaire de l'albumine humaine cristallisée est illustrée ci-après (*Figure 19*).



*Figure 19: Structure de l'albumine humaine cristallisée (HSA) et les sites de Sudlow (PDB 1e7e).*

Le site I lie généralement les molécules hétérocycliques ainsi que les acides dicarboxyliques. Ce site s'adapte à la liaison de plusieurs composés, dont plusieurs médicaments, avec une affinité relativement haute. Il est assez large et peut accueillir des composés tels que la bilirubine et les porphyrines. Le site II en revanche est plus petit et moins flexible, avec des liaisons plus stéréospécifiques. L'albumine peut également lier des molécules de manière covalente par sa Cystéine 34. Il peut s'agir de petites molécules thiolées comme vu précédemment, ou des médicaments qui se lient en formant un pont disulfure [215].

### ***c) Le rôle protecteur de l'albumine***

#### ***i. La fonction de séquestration des molécules toxiques.***

La bilirubine est un pigment jaune orangé toxique formé par la dégradation de l'hémoglobine dans la rate par l'hème-oxygénase. L'albumine a un rôle clé dans le transport et la séquestration de la bilirubine qu'elle lie sur un site primaire dans le sous-domaine IIA ( $K_a$  de l'ordre de  $10^8 \text{ M}^{-1}$ ) et deux sites secondaires au niveau des sous-domaines IB et IIIA. La bilirubine est donc transportée par l'albumine jusqu'au foie où elle sera dégradée et excrétée dans la bile. La liaison de la bilirubine à l'albumine permet sa photo-isomérisation et lui enlève ainsi son caractère

neurotoxique [216, 217]. L'hématine, combinaison de la protoporphyrine de l'hémoglobine avec un atome de fer à l'état ferrique, est aussi transportée par l'albumine et libérée au niveau du foie pour sa dégradation, en cas de saturation de son transporteur l'hémopexine [212].

De nombreuses toxines exogènes sont également séquestrées par l'albumine. Certaines se lient de manière covalente à l'albumine qui les rend ainsi inoffensives. C'est par exemple le cas du benzène qui devient un groupement S-phényl en se liant à la Cys34 de l'albumine. De façon similaire, l'aflatoxine G1, une toxine de champignons cancérigène pour l'homme retrouvée dans les produits agricoles, se lie aux lysines de l'albumine [218].

## *ii. La fonction antioxydante*

Les espèces oxydantes et réductrices sont toutes deux nécessaires au maintien de l'homéostasie redox, indispensable à la survie des cellules. Lors de la respiration mitochondriale, l'oxygène est l'accepteur final des électrons, à partir duquel se forment des composés fortement oxydants, appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou ROS (reactive oxygen species en anglais). Il s'agit du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou des espèces radicalaires telles que l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) ou le radical hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ). Il existe d'autres pro-oxydants appelées espèces réactives de l'azote (RNS en anglais), telles que le monoxyde d'azote NO produit par des enzymes telles que la NADPH oxydase ou l'oxyde nitrique synthases (NOS en anglais). La défense antioxydante se compose principalement du glutathion (un tripeptide comportant une cystéine, noté GSH dans sa forme réduite), mais aussi d'enzymes que sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, l'hème oxygénase, et la peroxydase. L'albumine intervient plutôt comme un antioxydant de type « scavenger » qui va limiter les dommages causés par les ROS et RNS. Ces propriétés antioxydantes s'expliquent par la configuration tertiaire spécifique de la protéine ainsi que sa structure primaire. L'oxyde nitrique peut se fixer à la cystéine 34 par addition électrophile de sa forme nitrosonium ( $NO^+$ ) [219]. On voit ainsi qu'en liant des composés oxydants, l'albumine participe à la défense antioxydante mais elle possède également une fonction de protection en retenant des composés nocifs [212]. L'extrémité N-terminale de l'albumine lie les ions Cu(II) mais aussi les ions Fe(II), qui peuvent, s'ils sont libres, participer à la formation d'espèces radicalaires très délétères. Ce rôle de scavenger, est également lié aux résidus méthionine de l'albumine, sensibles à l'oxydation, et formant le plus souvent la méthionine sulfoxyde. En liant les acides gras polyinsaturés, l'albumine permet également de limiter indirectement les dommages oxydatifs (*Figure 20*) [220]. La Cys34 de l'albumine est considérée comme le facteur prépondérant de la propriété antioxydante. Elle peut aussi être oxydée par ces composés qui vont

alors induire la formation d'un acide sulfonique ou sulfinique de manière irréversible. La Cys34 est un bon indicateur pour l'évaluation du stress oxydatif au sein de la circulation [221].

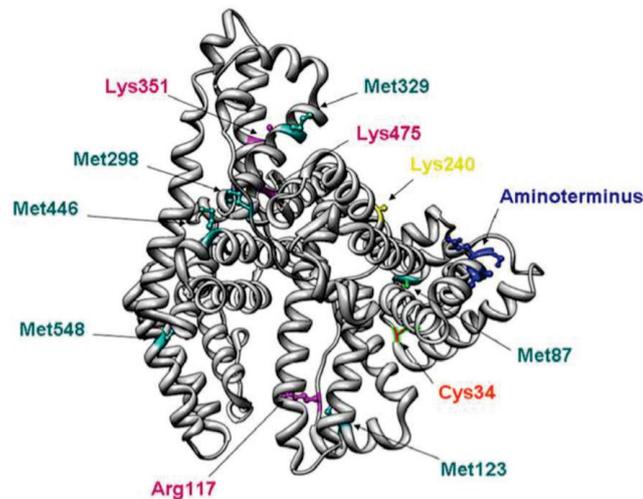


Figure 20 : Les principaux sites de l'albumine  
Les sites impliqués dans son activité antioxydante (Met et extrémité N-ter en bleu), et les sites impliqués dans la liaison aux acides gras polyinsaturés (en violet) [220].

#### **d) La fonction de transport**

##### **i. Liaisons aux molécules endogènes**

Outre sa fonction de séquestration, l'albumine transporte d'autres molécules. Les acides gras à longue chaîne figurent parmi les ligands naturels de l'albumine les plus affins. Ils se lient au niveau de 7 sites différents avec des affinités ( $K_a$ ) de l'ordre de  $10^7$  à  $10^8$   $M^{-1}$ . Trois d'entre eux se situent dans les sites de Sudlow. En particulier, la région de l'albumine englobant les résidus 377 à 582, comprenant une partie du domaine II et l'ensemble du domaine III, est considérée comme le principal site de liaison pour les acides gras à longue chaîne [222, 223]. Plus précisément, le rôle clé de R410 (Site de Sudlow II) et K525 (domaine IIIB) pour la liaison des acides gras a été rapporté [224]. L'acide gras majoritaire lié à l'albumine est l'acide palmitique [225, 226]. Les interactions hydrophobes sont les principales forces impliquées dans la liaison de l'albumine aux molécules organiques anioniques telles que les acides gras. Ces liaisons s'accompagnent d'une faible variation d'enthalpie, et d'une augmentation de l'entropie, probablement due à la libération de l'eau lors de la formation du complexe anion-protéine [227, 228]. De par sa capacité de liaison aux acides gras, l'albumine a un rôle régulateur dans la lipolyse. Elle active notamment la libération d'arachidonate par les macrophages [229]. La thyroxine (T4) une hormone thyroïdienne, ainsi que les hormones stéroïdiennes telles que le

cortisol, la progestérone, la testostérone ou l'aldostérone sont également transportées par l'albumine [230-234]. L'albumine assure également le transport de minéraux (calcium, magnésium, chlorure, zinc, cuivre II) et vitamines (C, D3, B9, B12) [212].

## *ii. Le transport des médicaments*

Outre le transport de molécules endogènes, l'albumine lie également des molécules exogènes, et améliore ainsi leur biodistribution et leur biodisponibilité. C'est notamment le cas de certains médicaments. En retenant ces derniers dans la circulation, l'albumine permet de contrôler leur concentration en forme libre et active, jouant ainsi un rôle de réservoir qui permet leur action prolongée [235]. Certains peuvent se lier de manière covalente à la Cys34 de l'albumine tels que le cisplatine utilisé dans le traitement du cancer, la D-pénicillamine (un antirhumatismal) et la N-acétyl-cystéine prescrite en cas de bronchite [215, 221]. L'albumine transporte également la warfarine (anticoagulant), la pénicilline (antibiotique), ou le diazépam (anxiolytique et sédatif). La liaison de ces molécules à l'albumine étant réversible, elle permet de réguler leur absorption, leur distribution, leur métabolisme, leur excrétion ou leur toxicité [235]. Concernant les traitements antidiabétiques, nous avons abordé précédemment le cas de l'insuline détémir, du liraglutide ou du sémaglutide qui se lient à l'albumine via leur acide gras et sont de cette façon libérés progressivement dans la circulation, prolongeant ainsi leur durée de vie et d'action [106, 115].

Certains contextes peuvent favoriser des modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine, tels que le tabagisme [236], le vieillissement, certaines maladies neurodégénératives [237], ou l'insuffisance rénale [238] du fait de l'accumulation de substances nocives. Dans le cas du diabète, c'est la glycation, qui est le principal phénomène affectant l'intégrité structurale et fonctionnelle de l'albumine, induisant notamment une altération de ses propriétés de liaison à plusieurs ligands [239].

## **4. La glycation de l'albumine**

L'albumine, de par son abondance dans le plasma, est très exposée à la glycation induite par le glucose ou autres composés réducteurs du sang. Le taux d'albumine glyquée est d'environ 10% en situation physiologique mais peut doubler voire tripler chez les personnes diabétiques [240, 241].

### a) Les modifications structurales de l'albumine glyquée

Lors de la glycation, un certain nombre d'unités glucose ou d'autres espèces réductrices s'ajoutent secondairement au niveau des résidus de l'albumine, augmentant sa masse moléculaire globale [242]. Les résidus de l'albumine concernés par la glycation sont les lysines et les arginines mais aussi la Cys34 du fait de leur caractère nucléophile. En particulier, la lysine 525 apparaît comme un site privilégié de la glycation, bien qu'elle ne soit que très peu exposée en surface. Les lysines en position 199, 281 et 439 sont également des sites principaux de la glycation *in vivo* [241, 243-245].

La glycation de l'albumine par le methylglyoxal cible plutôt les arginines. Il se forme alors un hydroimidazolone. L'arginine 410 est le site majeur de la réactivité du methylglyoxal. Il existe également des sites mineurs tels que les arginines 114, 160, 186, 208, 428 [246]. Les principaux AGE résultants de la glycation avancée de l'albumine humaine sont représentés en *Figure 21*.

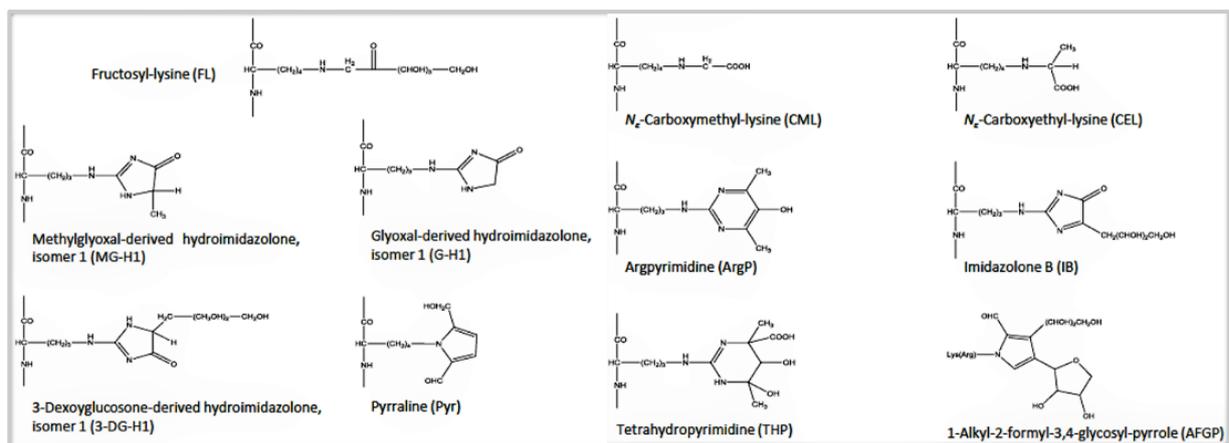


Figure 21: Principales structures d'AGE reportés pour l'albumine humaine glyquée [247].

La glycoxydation qui combine la glycation et des processus oxydatifs affecte également la Cys34 de l'albumine [200].

La structure tertiaire de l'albumine est également altérée par la glycation. Après 3 semaines d'incubation de l'albumine avec du glucose (35 mM), le repliement peut être altéré et on observe alors une forme proche de l'état appelé « globule fondu » correspondant à une certaine désorganisation du repliement. La formation d'agrégats de haut poids moléculaire permet la stabilisation de la forme glyquée de l'albumine. Cette augmentation de la stabilité de la protéine due à la glycation pourrait avoir un impact sur sa durée de vie et augmenter le temps de résidence de l'albumine glyquée dans le système circulatoire [88].

Toutes ces modifications peuvent affecter les nombreuses fonctions de l'albumine, qui contribuent au maintien de l'homéostasie. Chez les personnes diabétiques, le taux élevé d'albumine glyquée, est associée aux nombreuses complications du diabète (maladies rénales, ou cardiovasculaires) [248-250].

#### ***b) Les conséquences physiologiques de la glycation de l'albumine***

En affectant sa structure, la glycation peut impacter de façon plus ou moins sévère les différentes propriétés de l'albumine selon les sites concernés par la modification [88]. Cette glycation, augmentée dans la physiopathologie du diabète altère notamment les capacités antioxydantes de l'albumine. En effet, la Cys34, élément clé de cette fonction antioxydante, est également sensible à la glycation et à la glycoxydation [251, 252]. Cette altération de la capacité antioxydante due à la glycation de l'albumine chez les personnes diabétiques peut être prévenue par la metformine, qui est le traitement oral le plus courant [253].

La glycation de l'albumine intervient dans la pathogénèse des complications rénales, micro- et macrovasculaires associées au diabète [248-250, 254]. De manière plus générale, les AGE de l'albumine, comme les autres AGE, constituent un facteur majeur du risque cardiovasculaire en induisant notamment une dysfonction endothéliale, une rigidification des vaisseaux due à l'altération du collagène, un stress oxydant et une inflammation dues à l'activation des récepteurs RAGE [248, 255].

Ainsi, la glycation fait basculer l'albumine d'un rôle protecteur à un rôle délétère. Les modifications structurales de l'albumine par la glycation affectent également ces propriétés de transport de ligands endogènes et exogènes.

#### ***c) L'effet de la glycation de l'albumine sur son interaction avec ses ligands***

La capacité de liaison de l'albumine à ses ligands dépend de la structure particulière de ces nombreux sites de liaison. La fixation d'un sucre au niveau de ces derniers peut modifier la conformation mais aussi la flexibilité des domaines et altérer ainsi les propriétés de liaison de l'albumine. De plus, les changements conformationnels retrouvés chez les AGE peuvent entraîner une réduction de l'accessibilité des sites situés à l'origine en surface [256, 257].

Ainsi, l'albumine voit son affinité pour plusieurs ligands drastiquement diminuée par la glycation. Il s'agit par exemple des acides gras à longue chaîne et de la bilirubine [241]. L'altération de l'affinité de l'albumine pour plusieurs ligands après glycation *in vivo* ou *in vitro* montre que les principaux résidus glyqués tels que les lysines 199 ou 525 sont impliqués dans

ces liaisons [88]. En effet, ces résidus sont situés à proximité des sites connus de liaison aux médicaments notamment les sites de Sudlow [258]. Par exemple, la glycation diminue l'affinité de l'albumine pour le kétoprofène, un anti-inflammatoire non stéroïdien qui se lie sélectivement au niveau du site de Sudlow II mais aussi au site I [259].

Les formes glyquées de l'albumine présentent également une affinité réduite pour le tolbutamide et l'ibuprofène dans les sites I et II [257]. L'albumine glyquée, *in vivo* ou *in vitro* avec du glucose ou du méthylglyoxal présente également une baisse de son affinité pour la warfarine et le kétoprofène [260].

En affectant sa structure primaire et tertiaire, la glycation de l'albumine altère ses propriétés d'interaction avec ses ligands. L'albumine n'est pas la seule protéine ayant une fonction de transport plasmatique. Par exemple l'hémoglobine transporte le dioxygène sur les ions ferreux de ses quatre groupements prosthétiques [261], la transferrine transporte le fer [262]. Un autre transport, celui du cholestérol, est assuré par les lipoprotéines qui circulent dans le plasma, comme cela a été décrit précédemment (partie I.B.2). Parmi celles-ci, les HDL présentent le plus grand intérêt thérapeutique car elles sont antiathérogènes. Les propriétés des HDL sont très majoritairement attribuées à l'apolipoprotéine A1 (ou ApoA1), principale protéine qui les compose [263]. Nous décrirons dans la suite de ce travail, que l'ApoA1 est une protéine très importante dans la structure et la fonction des HDL, et qu'elle est également sujette à la glycation chez le sujet diabétique.

## **B. L'Apolipoprotéine A1**

### **1. Introduction**

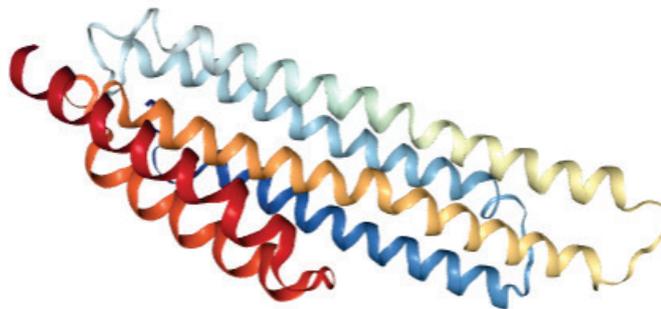
L'apolipoprotéine A1 est la protéine majoritaire des HDL puisqu'elle constitue 70% de leur fraction protéique. Elle est essentielle à la structure et la fonction de ces lipoprotéines. En effet, elle est notamment impliquée dans l'interaction des HDL avec les récepteurs cellulaires, dans l'activation de la LCAT et dans l'activité antiathérogène des HDL. Comme beaucoup d'apolipoprotéines, l'ApoA1 est synthétisée majoritairement dans le foie et l'intestin grêle [263]. L'ApoA1 a une durée de vie de 3 à 4 jours [264]. Elle peut se déplacer entre les différentes lipoprotéines. On la retrouve ainsi en très faible proportion dans les chylomicrons et les VLDL [263].

Contrairement à l'ApoB qui voit sa concentration plasmatique augmenter avec l'âge (de 0,8 à 1,2 g/L), la quantité d'ApoA1 reste stable mais est plus élevée chez les femmes (1,5 à 1,6 g/L) que chez les hommes (environ 1,4 g/L). Un taux faible d'ApoA1 (< 1,20 g/L), plus fréquent chez les hommes (19% contre 6% des femmes) est un facteur de risque important de maladies cardiovasculaires alors qu'un taux élevé ( $\geq 1,65$ ), plus fréquent chez les femmes (28% contre 9% des hommes) constitue un facteur protecteur [265, 266].

## 2. Les propriétés de l'ApoA1

### a) Structure de l'apoA1 native

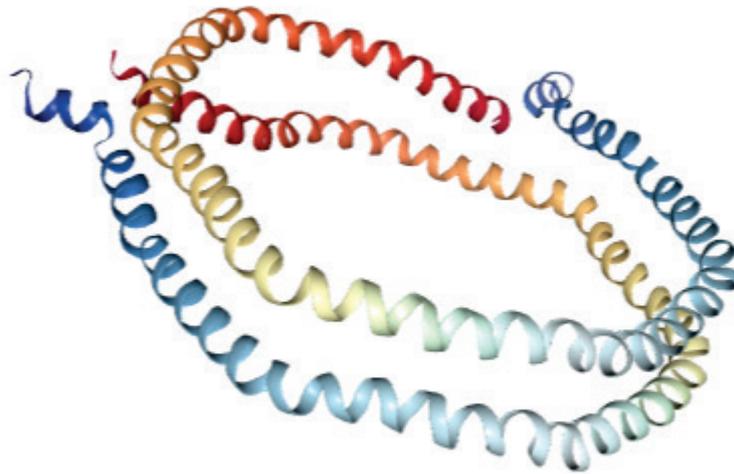
Codée par un gène comprenant deux exons et situé sur le chromosome 11 (11q23.3), l'ApoA1 est une protéine monomérique de 243 acides aminés (28 kDa). La structure cristallisée de l'ApoA1 délipidée est présentée en *Figure 22*. Elle n'est pas glycosylée et ne possède pas de pont disulfure, car sa séquence ne comporte aucun résidu cystéine (ProtParam P02647). Elle possède huit hélices- $\alpha$  amphiphiles contenant chacun 22 acides aminés avec deux répétitions de 11 acides aminés. L'ApoA1 libre est partiellement structurée avec une forme stable très flexible appelée « globule fondu » dans des conditions physiologiques qui va permettre l'initiation de la formation des HDL par association aux lipides. Le domaine N-terminal (résidus 1 à 184) de l'ApoA1 libre forme un ensemble en hélice. Les 43 premiers résidus sont essentiels pour la stabilisation de la protéine libre. Le domaine C-terminal (résidus 185 à 243) sans structure définie est responsable de l'initiation de la liaison aux lipides. L'ApoA1 a une grande affinité pour les phospholipides qui modulent sa structure secondaire et tertiaire [267, 268].



*Figure 22: Structure cristallisée de l'ApoA1 humaine délipidée (pdb 2A01).*

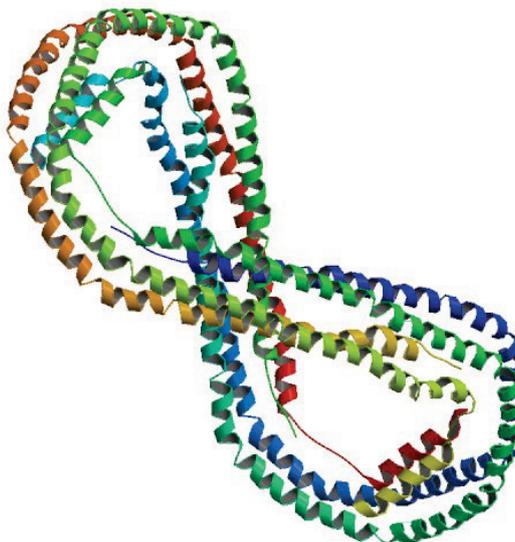
Les propriétés de l'ApoA1 font d'elle un puissant détergent qui induit la formation de complexes micellaires stables en association avec les phospholipides, le cholestérol, les triglycérides ainsi

que les esters de cholestérol [269]. La structure de l'ApoA1 associée aux lipides au sein de la particule de HDL est présentée en *Figure 23*.



*Figure 23 : Structure de l'ApoA1 humaine au sein d'une lipoprotéine de haute densité (pdb 2N5E).*

Il existe également une forme tronquée (recombinante) de l'ApoA1, comprenant les résidus 44 à 243 (exon 4) de l'ApoA1 qui se lie aux lipides de façon similaire à l'ApoA1 native, mais qui a la particularité de garder la même conformation en présence et en absence de lipides. Elle est presque entièrement constituée d'hélices- $\alpha$  amphiphiles séparées par des nœuds de proline [270] (*Figure 24*).



*Figure 24 : Structure cristallisée de la forme tronquée de l'ApoA1 humaine (pdb 1AV1).*

## ***b) Les différentes formes de l'ApoA1***

### ***i. Les principales isoformes de l'ApoA1***

L'ApoA1 est retrouvée sous différentes isoformes, avec une forme majoritaire (75%), une forme plus basique et deux formes plus acides. La forme acide est retrouvée dans les LDL des sujets obèses et apparaît plus sensible à l'oxydation des méthionines [263, 271]. On trouve également des variants de l'ApoA1 de masse moléculaire comprise entre 30 et 35 kDa dans les HDL analysés en gel d'électrophorèse à deux dimensions [271].

### ***ii. Les formes de l'ApoA1 liée à des pathologies***

La forme glyquée de l'ApoA1 est associée au diabète et altère sa fonction, notamment sa capacité à activer la LCAT et son action anti-inflammatoire [272, 273]. D'autre part, plusieurs mutations dans le gène APOA1 peuvent entraîner une altération de la fonction des HDL. C'est le cas de l'hypoalphalipoprotéïnémie familiale, une maladie rare et dominante qui entraîne un déficit en ApoA1 et donc en HDL. Les signes cliniques de ces maladies sont généralement des opacités cornéennes et des xanthomes (petits nodules de cholestérol), compliqués par une maladie coronarienne précoce, mais dont la gravité des manifestations dépend fortement de la mutation concernée [274].

### ***iii. L'ApoA1 Milano***

L'ApoA1 Milano (ApoA1M) est un variant naturel de l'ApoA1 découverte chez les habitants du village de *Limone sul Garda* en Italie en 1985. Les individus concernés ont des taux de HDL plasmatique très faibles (0,1 à 0,3 g/L) et des taux de triglycérides plus élevés que la normale mais présentent cependant une longévité accrue et un risque cardiovasculaire diminué. L'ApoA1M diffère de l'ApoA1 native par la substitution d'une arginine par une cystéine en position 173 (notée R173C). Elle peut ainsi former des dimères liés par un pont disulfure entre deux cystéines [275]. La perte de l'arginine, potentiellement impliquée dans les liaisons entre hélices influe également sur l'affinité de l'ApoA1M pour les lipides [276].

## ***c) L'importance de l'ApoA1 dans la composition des HDL***

Les HDL se composent en moyenne de 3 ou 4 molécules d'ApoA1, le reste étant principalement des lipides (*Tableau 3*).

Type de molécule	Nombre moyen / molécule d'HDL
ApoA1	3-4
Phospholipides	80-120
Cholestérol	20-40
Esters du cholestérol	100-160
Triglycérides	25

Tableau 3 : Composition moyenne des HDL [269].

La diminution du taux d'ApoA1 native au sein d'une HDL a un impact majeur sur la formation et donc la composition globale de la lipoprotéine. Cette diminution est souvent retrouvée dans les maladies associées à un risque cardiovasculaire important [269]. Ainsi, l'hypercholestérolémie se traduit par des HDL ayant un contenu en ApoA1 inférieur à la normale et au contraire un contenu en ApoE, apoC1 et ApoC3 plus élevé [277].

### 3. Le rôle de l'ApoA1 dans la formation et la fonction des HDL

#### a) La formation des HDL à partir de l'ApoA1 libre

L'ApoA1 permet la maturation des HDL via son interaction avec le transporteur ABCA1, l'activation de la LCAT et la liaison des HDL à SRB1 au niveau hépatique [263]. Une fois synthétisée, l'ApoA1 va se lier à quelques lipides extracellulaires. Cette ApoA1 dite pauvre en lipides interagit alors avec le transporteur ABCA1 situé à la surface des cellules, qui lui transfère les phospholipides ainsi que le cholestérol provenant de la cellule. Dans le plasma, un remaniement du HDL ainsi formé va impliquer l'estérification du cholestérol par la LCAT, elle-même activée par l'ApoA1. L'action de la LCAT va permettre la maturation du HDL qui va notamment passer d'une forme discoïdale à une forme sphérique (*Figure 25*). Les HDL vont échanger des protéines et des lipides, entre eux et avec les autres lipoprotéines. La particule de HDL poursuit ensuite sa maturation et va pouvoir capter davantage de cholestérol cellulaire via les récepteurs SRB1 ainsi que les transporteurs de surface ABCG1. Des échanges de lipides vont également avoir lieu grâce à la protéine de transfert de phospholipides (PLTP) et d'esters de cholestérol (CETP). Plusieurs lipases vont participer à l'hydrolyse des lipides des HDL (la lipoprotéine lipase (LpL), la lipase hépatique (HL) ou la lipase endothéliale (EL)) [278-280].

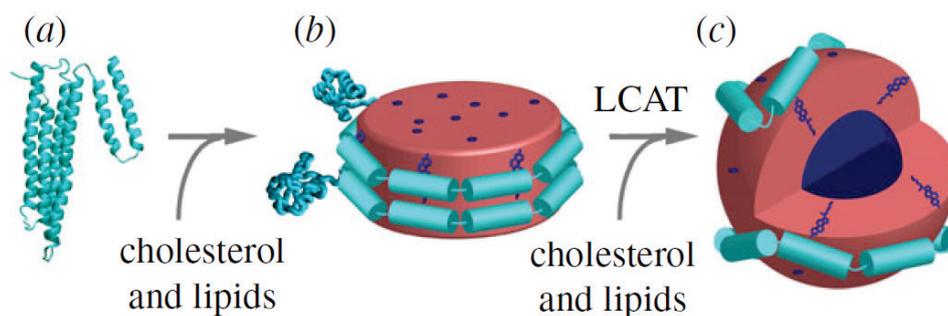


Figure 25 : La maturation des HDL.  
ApoA1 libre (a), HDL discoïdal (b) et HDL sphérique (c) [281].

## **b) Les propriétés des HDL et l'implication de l'ApoA1**

### **i. Les fonctions antiathérogènes, antioxydantes et anti-inflammatoires**

L'athérosclérose étant considérée comme une maladie inflammatoire chronique, les effets antiathérogène et anti-inflammatoire des HDL sont intimement liés. L'ApoA1 initie la formation du HDL mais elle est également en grande partie responsable des propriétés des HDL [282]. En tant que constituant majeur des HDL, l'ApoA1 est associé à son rôle d'athéroprotection, à l'inverse de l'ApoB qui est contenue dans les autres lipoprotéines. Ainsi, le rapport ApoB/ApoA1 est fortement corrélé au risque cardiovasculaire chez les personnes en surpoids [283]. Le rôle antiathérogène des HDL est principalement attribué à sa fonction de transport inverse du cholestérol, lié à la capacité de liaison de l'ApoA1 aux récepteurs ABCA1 et SRB1. En particulier, les HDL permettent la diminution du taux de cholestérol au niveau des macrophages et des cellules endothéliales, induisant ainsi une réduction de l'inflammation [284].

De la même manière, l'ApoA1 et les HDL ont montré un effet anti-inflammatoire sur les adipocytes *in vitro* (lignée 3T3L-1) et *in vivo* dépendante de l'interaction avec ABCA1, ABCG1 et SRB1 [285]. Les HDL ont aussi un effet inhibiteur sur l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 des cellules endothéliales [130]. Dans un modèle *in vivo* d'inflammation vasculaire aiguë chez le lapin, la perfusion d'ApoA1 a permis la réduction de l'infiltration des cellules immunitaires et de leur activation par les cellules endothéliales, réduisant ainsi l'inflammation [286]. Des études utilisant des HDL reconstituées (ApoA1 recombinante associée à des phospholipides) suggèrent également que l'ApoA1 a un rôle prépondérant dans la fonction des HDL. En effet, l'ApoA1 participe notamment à leur action antioxydante et anti-inflammatoire et donc à leurs propriétés antiathérogènes [263, 287, 288].

L'ApoA1 a une propriété de piégeage des ROS et protège ainsi contre les dommages oxydatifs. De plus, elle permet de capter les lipides et les lipoprotéines oxydés proinflammatoires des cellules dont les LDLox [146]. L'ApoA1 agit également sur l'inflammation en inhibant le stress oxydant induit par le glucose sur des macrophages humains [287].

*ii. L'importance de l'environnement lipidique de l'ApoA1 dans son efficacité antiathérogène*

Différents peptides mimétiques de l'ApoA1 ont été synthétisés et étudiés, comme le peptide L-4F (Ac-DWFKAFYDKVAEKFKAEAF-NH<sub>2</sub>) qui possède une meilleure affinité pour les LDLox [289]. L'étude *in vitro* des effets antiathérogènes de l'ApoA1 ou de ses peptides mimétiques, ne doit pas se limiter aux formes délipidées, car ces dernières peuvent présenter des propriétés qui n'existeraient pas *in vivo*, pour la forme lipidée dans le plasma [290]. Puisqu'elle adopte son repliement final en présence de lipides, les propriétés anti-inflammatoires et d'efflux de cholestérol de l'ApoA1 dans les HDL reconstitués (HDLr) peuvent en outre varier selon la composition en phospholipide de la particule [291, 292]. De plus, les HDLr injectés changent de composition au cours de leur circulation dans le plasma [293].

L'efficacité de l'ApoA1 Milano, présentée précédemment a aussi été montrée : l'injection d'ApoA1M recombinante, complexée à des phospholipides, a montré un effet significatif sur la réduction de la plaque d'athérosclérose et de l'inflammation chez la souris ApoE<sup>-/-</sup> [294], tout en réduisant le contenu de la plaque en cholestérol, lipides et macrophages [295].

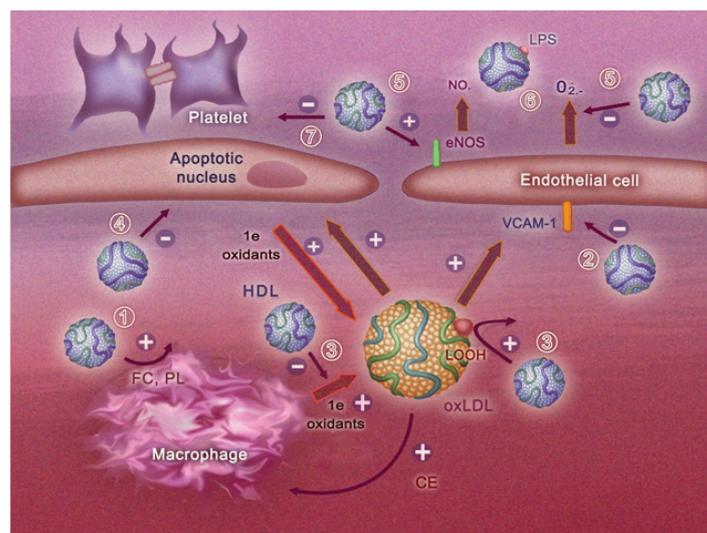
*c) Les propriétés des HDL attribuées aux constituants autres que l'ApoA1*

De très nombreux autres constituants des HDL participent également à ses fonctions antioxydante et anti-inflammatoire tel que l'ApoA4, l'ApoE, l'ApoM ou la paraoxonase-1 (PON1). Ces molécules ont par exemple un rôle antioxydant en débarrassant les cellules et autres lipoprotéines de leurs ROS et lipides oxydés [269]. La PON1, qui se lie aux HDL via les phospholipides [269], inhibe la production de MCP-1 (marqueur d'inflammation) par les cellules endothéliales EAhy926, induite par les LDLox [296].

Les HDL ont aussi une activité anti-infectieuse via l'action de la protéine de liaison au LPS (LPB : LPS-binding protein) et de l'ApoA1 qui peut également interagir avec le LPS (lipopolysaccharide) des bactéries permettant de le neutraliser. Comme l'ApoA1, la sphingosine-1-phosphate (S1P) contribue à l'action vasodilatatrice des HDL en activant certaines voies de signalisation [269]. La S1P est issue du métabolisme de la sphingomyéline. Elle agit via

l'activation de ses récepteurs spécifiques (les S1PR) et possède des fonctions très variées dont la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. Elle joue notamment un rôle clé dans la formation des jonctions cellulaires. Elle participe à la régulation de la migration cellulaire à travers l'endothélium et permet la stabilisation des vaisseaux lors de l'angiogenèse [297]. L'alpha-1-antitrypsine ( $\alpha$ 1AT) appelé aussi l'inhibiteur de l'alpha-1-protéinase ( $\alpha$ 1PI), présente chez l'homme à des taux plasmatiques moyens de 1 à 2 g/L. Elle fait partie des protéines détectables des HDL et son taux est augmenté lors de l'inflammation. Elle est sécrétée par le foie lors de l'inflammation et possède un rôle anti-inflammatoire et protecteur des cellules contre les enzymes libérées par les cellules dans un contexte inflammatoire, notamment les protéases à sérines (ou serpines) telle que l'élastase des neutrophiles. La déficience en  $\alpha$ 1AT, une maladie génétique, affecte fortement le foie et les poumons mais favorise également le risque cardiovasculaire [298, 299].

Dans la figure ci-après (*Figure 26*), les 7 principaux rôles des HDL sont illustrés, à savoir dans l'ordre des numéros : l'efflux de cholestérol notamment son effet sur les macrophages, l'activité anti-inflammatoire telle que l'inhibition de l'expression de VCAM-1 induite par les LDLox, l'activité antioxydante par l'inhibition de l'oxydation des LDL ou l'extraction des phospholipides oxydés, le rôle de cytoprotection notamment contre les effets des LDLox (exemple : l'apoptose), l'action vasodilatatrice comme la stimulation de la production de NO et l'inhibition de la libération d'anion superoxyde, les propriétés anti-infectieuses comme la liaison au LPS et enfin l'effet antithrombotique dû à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire [269].



*Figure 26 : Les activités biologiques majeures des HDL*

*1 : l'efflux de cholestérol, 2 : activité anti-inflammatoire, 3 : activité antioxydante, 4 : cytoprotection, 5 : vasodilatation, 6 : rôle anti-infectieux, 7 : activité antithrombotique. FC : cholestérol libre, PL : phospholipide, oxLDL : LDL oxydés [269].*

#### *d) Les ligands de l'ApoA1*

En étudiant ses propriétés et son implication dans la formation et la fonction des HDL, nous avons déjà mentionné les capacités d'interaction de l'ApoA1 avec différentes molécules. Ainsi, nous avons vu que l'ApoA1 interagit avec les lipides, notamment pour la formation du HDL. L'ApoA1 a une affinité élevée pour une large variété de phospholipides : le PDPC (1-palmitoyl-2-docosahexaenoylphosphatidylcholine) ( $K_d = 2,2 \text{ nM}$ ), le PEPC (1-palmitoyl-2-elaidoyl sn-glycero-3-phosphatidylcholine) ( $K_d = 2,1 \text{ nM}$ ) et le POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) ( $K_d = 1.2 \text{ nM}$ ) [300].

L'ApoA1 se lie également au récepteurs ABCA1, ABCG1 et SRB1 afin de permettre l'efflux de cholestérol entre les cellules et la HDL [285]. La protéine de liaison à l'ApoA1 (A1BP) se lie à l'ApoA1 et faciliterait l'efflux de cholestérol [301]. L'activation de la LCAT, indispensable à la maturation des HDL, implique les hélices 5, 6 et 7 de l'ApoA1 [302]. L'ApoA1 se lie également à la PLTP, permettant ainsi l'échange de lipides entre les lipoprotéines [280].

L'ApoA1 se lie à l'haptoglobine et inhibe ainsi l'activation de la LCAT. Cette inhibition met en jeu une compétition pour un site situé entre la Glu113 et l'Asn184 de l'ApoA1 [303]. La liaison de l'ApoA1 à l'haptoglobine (HP) aurait un rôle dans la réaction acrosomique permettant la fusion des gamètes [304].

Elle interagirait aussi avec le récepteur au CD4 (cluster de différenciation 4), montrant notamment un effet potentiel de compétition avec les protéines virales du VIH (virus d'immunodéficience humaine) que sont les glycoprotéines gp120 et gp41 [305].

Il existe également d'autres protéines dont l'interaction avec ApoA1 a été montrée mais pour lesquelles ces interactions sont beaucoup moins étudiées. Il s'agit par exemple de l'ApoB, de l'ApoL1, du transporteur de groupement phosphate (HPR), du récepteur scavenger B1 (SCARB1) et de la protéine de kinétochore MIS12 comme présenté dans la figure ci-dessous (*Figure 27*).

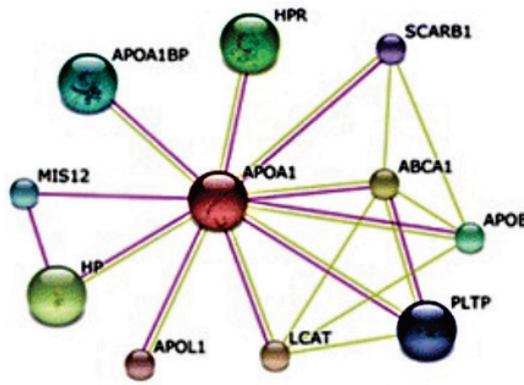


Figure 27 : Le réseau d'interaction protéique autour de l'ApoA1. Les traits violets et verts sont les interactions mise en évidence de manière expérimentale et par textmining (prévisions statistiques) respectivement [306].

#### 4. La glycation de l'ApoA1

Dans la physiopathologie diabétique, l'hyperglycémie entraîne la glycation des protéines plasmatiques [307]. Comme nous l'avons décrit pour l'albumine, l'ApoA1 peut également être affectée au niveau de sa structure et ses fonctions par le processus de glycation, ce qui va par conséquent entraîner des altérations quantitatives et qualitatives au niveau des particules de HDL. En effet, en tant que constituant majoritaire, l'ApoA1 est un facteur limitant de la formation des HDL et d'elle dépendent leurs principales fonctions antiathérogènes [273].

##### a) Les modifications structurales de l'ApoA1 glyquée

La glycation par le glucose de l'ApoA1 touche les résidus arginines, lysine et tryptophane. Une étude a déterminé qu'après 3 semaines de glycation *in vitro* par 25 mM de glucose, proche d'une concentration physiopathologique, 6% des résidus lysines de l'ApoA1 sont modifiés alors que les arginines et le tryptophane ne sont pas affectés. En présence d'une concentration en glucose de 100 mM pendant 3 semaines, 30% des lysines, 8% des arginines et 6% des tryptophanes sont modifiées [272].

La glycation de l'ApoA1 par le méthylglyoxal, plus réactif, modifie les résidus arginine, lysine et tryptophane plus rapidement que le glucose, mais ses effets dépendent de la concentration utilisée et de la durée d'incubation. Par exemple, une glycation pendant 24 heures avec 1,5 mM de méthylglyoxal affecte déjà significativement les 3 types de résidus [272]. Le méthylglyoxal est un des principaux composés dont le niveau est augmenté chez les personnes diabétiques et qui participe à la formation d'AGE. C'est donc le modèle de glycation par le méthylglyoxal qui est le plus souvent choisi pour l'étude de l'ApoA1 et des HDL [73, 77, 246].

La glycation de l'ApoA1 par le méthylglyoxal n'affecte pas la stœchiométrie des HDLr, qui est de 100 phospholipides par ApoA1. Cependant, le diamètre des particules est diminué, en lien avec une modification de la conformation de la protéine. La glycation de l'ApoA1 entraîne également une altération importante de l'exposition de l'épitope reconnu par l'anticorps spécifique du site de liaison de la LCAT [272].

***b) Les conséquences de la glycation sur la fonctionnalité de l'ApoA1 et des HDL***

La glycation affecte l'association de l'ApoA1 avec les phospholipides, ce qui a pour conséquence une baisse d'efficacité dans la synthèse de HDLr, avec une diminution de la taille et de la charge surface des HDL [272]. Par ailleurs, l'injection d'ApoA1 délipidée glyquée, entraîne une diminution de son action anti-inflammatoire [308]. La glycation de l'ApoA1 entraîne également une baisse de sa capacité à activer la LCAT et affecte le rôle des HDL dans le transport inverse du cholestérol [272].

Des expériences sur cellules ont montré que les AGE issus de l'ApoA1 voient leurs propriétés antiathérogènes grandement affectées, ce qui se traduit notamment par une baisse de l'efflux de cholestérol et par une baisse de la capacité d'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion leucocytaires [309]. Par contre, d'autres expériences de glycation de HDL extraits de plasma humain avec 25 mM de glucose pendant 3 jours n'ont mis en évidence aucun impact sur les capacités d'efflux de cholestérol [310]. Cependant, chez les patients diabétiques, les HDL voient leur fonction altérée par des mécanismes alliant à la fois des phénomènes de glycation et d'oxydation [311]. Des expériences de glycation *in vitro* avec du méthylglyoxal ont montré une diminution de la capacité anti-inflammatoire des HDL [308]. Notamment, la glycation altère leur action protectrice contre l'adhésion des monocytes induite par les LDLox sur les cellules endothéliales [312]. Les HDL issus de patients diabétiques de type 2 présentent également une fonction anti-inflammatoire diminuée faisant apparaître une corrélation avec le niveau d'hyperglycémie [313]. La glycation de l'ApoA1 chez les patients diabétiques a aussi montré une instabilité de la protéine ainsi qu'une diminution de la fonction d'efflux de cholestérol des HDL [314].

Le méthylglyoxal ainsi que le 3-deoxyglucosone contribuent fortement à la glycation des HDL. Ces réactions entraînent une altération de la fonction des HDL mais aussi une accélération de sa dégradation *in vivo* (illustré sur la *Figure 28* ), participant ainsi à l'augmentation du risque vasculaire [315].

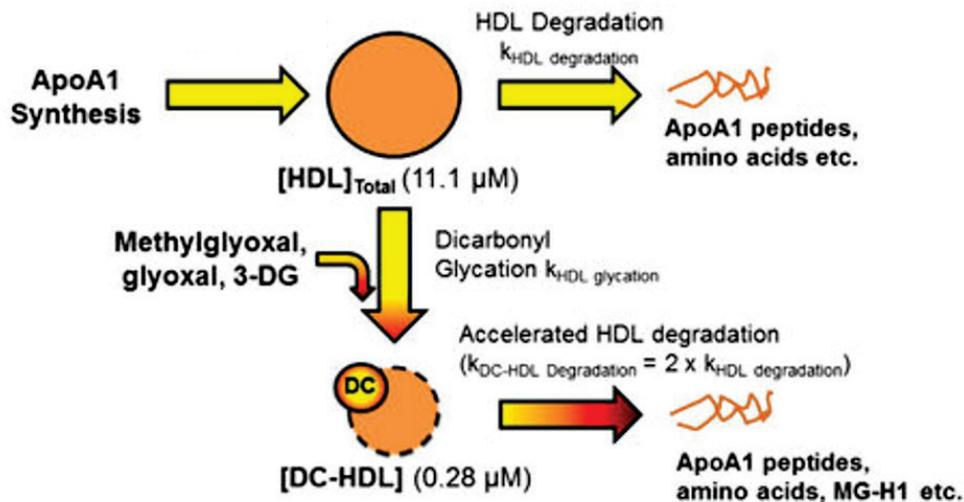


Figure 28 : La glycation accélère la dégradation des HDL [315].

### c) L'ApoA1, les HDL et le développement du diabète et de l'athérosclérose

Bien qu'elle soit 25 fois moins concentrée que l'albumine, l'ApoA1 présente également un grand intérêt, en particulier dans la compréhension du lien existant entre l'athérosclérose et le diabète de type 2. En effet, la fonctionnalité des HDL est affectée si l'ApoA1 est en quantité diminuée ou modifiée, par exemple par la glycation. C'est alors l'équilibre lipidique de l'organisme qui est susceptible d'être affecté. Le déficit en ApoA1 est lié à la fois à la résistance à l'insuline [316] et à l'athérosclérose [317]. En effet, les HDL favoriseraient la production de l'insuline, régulant ainsi la glycémie [318]. Une étude *in vitro* a d'ailleurs montré que l'ApoA1 délipidée peut stimuler la sécrétion d'insuline à partir de cellules bêta via la liaison à ABCA1 et SRB1 [319]. Leur dysfonctionnement chez les patients diabétiques est associé au risque de maladies cardiovasculaires [320]. Le faible taux de HDL est un facteur athérogénique [265] mais favorise également le développement de la résistance à l'insuline [321]. Ainsi les HDL et l'ApoA1 s'ajoutent aux éléments faisant le lien entre ces deux pathologies, comme illustré ci-dessous (Figure 29).

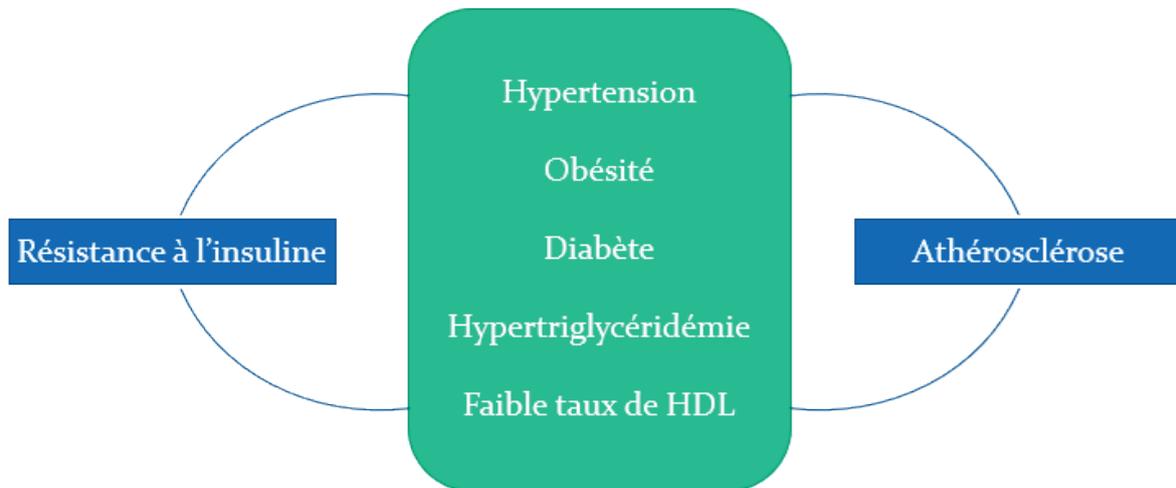


Figure 29 : Les principaux facteurs communs à la résistance à l'insuline et l'athérosclérose (adapté de [321]).

Comme nous l'avons explicité, la capacité de l'ApoA1 à former les HDL et assurer leur fonctionnalité, dépend de sa capacité d'interaction, avec les phospholipides et les protéines (ABCA1, ABCG1, LCAT etc...). Cette capacité de liaison de l'ApoA1 à ses partenaires peut être altérée par la glycation ou l'oxydation. La connaissance de ces modifications structurales et fonctionnelles est au centre de la compréhension des effets observés au niveau physiologique. L'étude de l'impact de ses altérations sur l'efficacité des interactions protéine-ligand permet de mieux comprendre la pathogénèse qui y est associée. De nombreuses méthodes existent pour étudier ces propriétés de liaison. Dans la partie suivante nous allons voir les bases d'une interaction biochimique, les paramètres qui la caractérisent et les principales techniques permettant de les appréhender et de les mesurer.

### III. Les interactions protéine-ligand et les méthodes d'étude

#### A. Les mécanismes d'une interaction protéine-ligand

##### 1. Les propriétés de liaisons des protéines

Les interactions protéine-ligand sont primordiales dans le fonctionnement du vivant. La fonction d'une protéine est déterminée par ses propriétés d'interaction avec de petites molécules (sels, métaux, oxygène etc...), avec d'autres protéines ou peptides, avec des acides nucléiques, ou encore avec elle-même. La nature des ligands et des interactions dépend des caractéristiques de la protéine, notamment de sa séquence primaire d'acides aminés, de ses éventuelles modifications post-traductionnelles et de son repliement à différents niveaux en structures secondaire, tertiaire ou même parfois quaternaire lorsque plusieurs monomères s'associent (*Figure 30*).

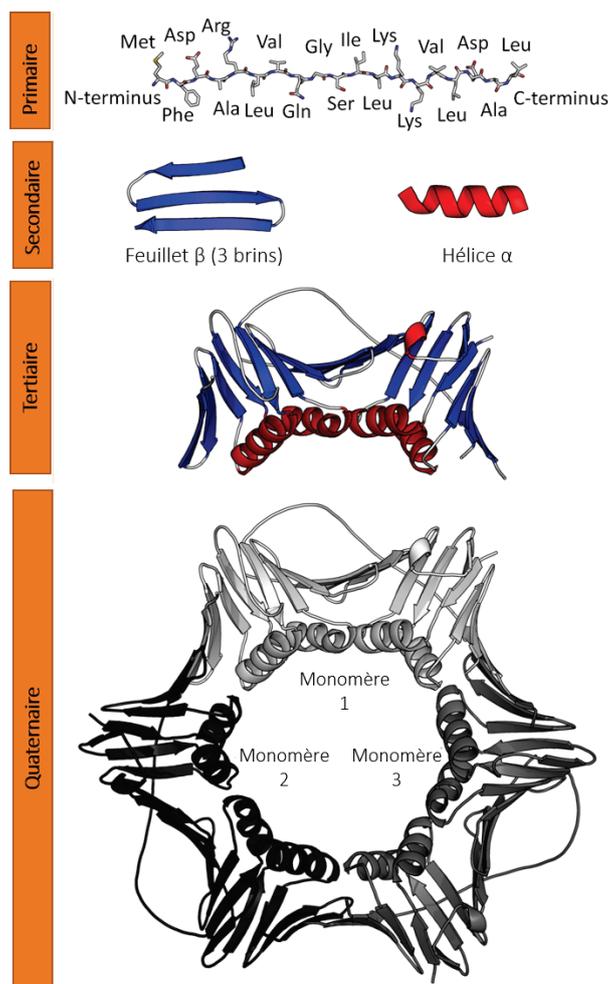


Figure 30 : Les quatre niveaux structuraux des protéines (auteur : T. Shafee).

Ce repliement dépend en partie des paramètres du milieu et il se stabilise grâce à l'interaction avec les molécules d'eau et les ions. Les liaisons faibles qui maintiennent la structure d'une protéine sont les mêmes qui interviennent dans les processus d'interactions protéine-ligand. Les liaisons intramoléculaires non covalentes stabilisant le repliement sont les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogène, les interactions électrostatiques (charge-charge). Par ailleurs, on retrouve aussi des liaisons covalentes comme le pont disulfure entre deux résidus cystéines [322] (Figure 31).

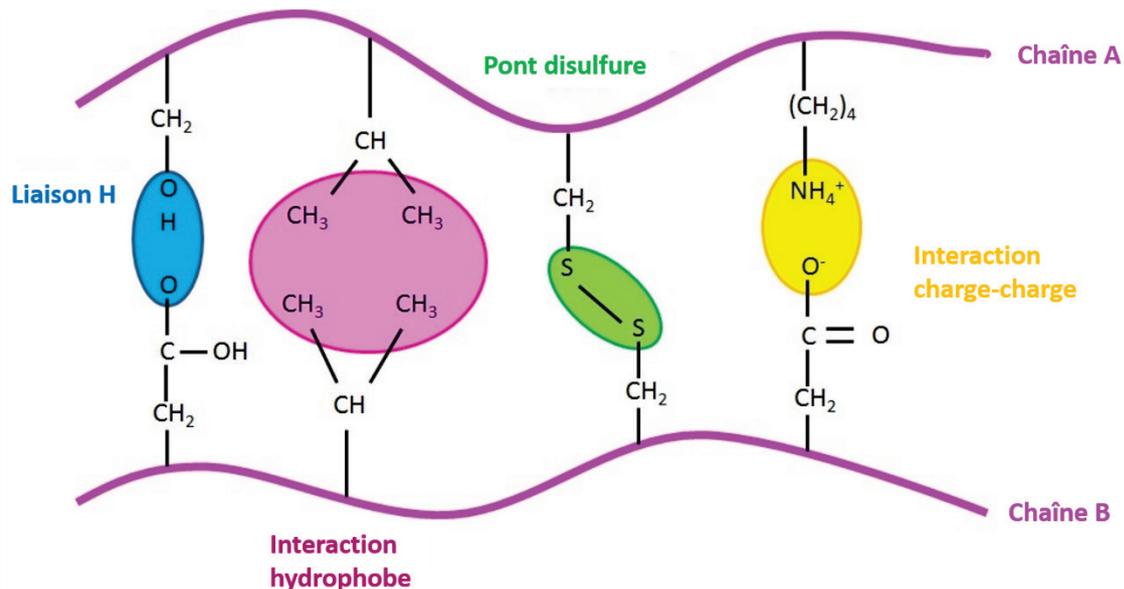


Figure 31 : Les interactions stabilisant la structure d'une protéine (adapté de static.fastbleep.com)

Les protéines ont des rôles très diversifiés au sein de l'organisme, dans la structure comme les composants du cytosquelette, dans le fonctionnement mécanique du muscle, dans les processus biochimiques notamment enzymatiques, dans la signalisation cellulaire comme les cytokines ou les hormones. Une protéine interagit avec son ligand de manière plus ou moins spécifique, en formant des liaisons non-covalentes plus ou moins fortes. Cette interaction se caractérise ainsi par deux paramètres importants : la spécificité et l'affinité. Un ligand peut se définir comme toute molécule capable de se lier à une protéine avec une spécificité et affinité relativement élevée. Pour comprendre les mécanismes qui régissent ces interactions, il est important de caractériser les mécanismes mis en jeu lors de la formation du complexe protéine-ligand [323].

## 2. Cinétique et thermodynamique des interactions

Dans cette partie nous allons étudier les paramètres cinétiques et thermodynamiques d'une liaison entre une protéine et son ligand, ainsi que les facteurs déterminants de la liaison.

### a) La cinétique d'une liaison protéine-ligand

L'étude cinétique d'une interaction décrit la vitesse à laquelle les deux partenaires de liaison se lient entre eux. L'association entre une protéine (notée P) et son ligand (noté L) est dépendante du temps et peut être formulée ainsi :



On note PL le complexe protéine-ligand et  $k_{\text{on}}$  et  $k_{\text{off}}$  sont les constantes de vitesse correspondant à la réaction d'association et de dissociation et s'expriment respectivement en  $M^{-1}.s^{-1}$  et  $s^{-1}$ .

Lorsque l'équilibre est atteint, les deux réactions se compensent, ce qui se traduit par la formule suivante :

Formule 2 :

$$k_{\text{on}}[P][L] = k_{\text{off}}[PL]$$

La notation entre crochets correspond à la concentration à l'équilibre.

La constante de liaison ou d'association notée  $K_a$ , s'exprime en  $M^{-1}$  et se définit par la formule suivante :

Formule 3 :

$$K_a = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1}{K_d}$$

La constante de dissociation  $K_d$ , s'exprime en M. On peut voir qu'une vitesse d'association plus grande que la vitesse de dissociation donne une constante de liaison élevée et une constante de dissociation faible, correspondant à une affinité élevée [323, 324].

### ***b) L'aspect thermodynamique d'une interaction protéine-ligand***

Une protéine, son ligand ainsi que le solvant (l'eau et les ions) dans lequel ils baignent constituent un système thermodynamique. Des échanges thermiques ont lieu entre ces trois éléments. Le transfert de chaleur est lié à des échanges d'énergie qui suivent les lois de la thermodynamique.

L'enthalpie libre ou énergie libre de Gibbs, notée  $G$  et s'exprimant en calories (cal) est une grandeur qui permet de déterminer le caractère spontané ou non d'une réaction donnée en condition isotherme (température constante) et isobare (pression constante). Pour qu'une association protéine-ligand ait lieu, il faut que la variation d'énergie libre ( $\Delta G$ ) du système soit négative lorsqu'il atteint l'état d'équilibre à pression et température constante. La stabilité de liaison est déterminée par l'amplitude du  $\Delta G$ .

La relation de Gibbs relie la constante de liaison  $K_a$  à l'énergie libre de liaison standard  $\Delta G^\circ$  qui correspond à la variation d'énergie libre mesurée sous une pression de 1 atm et une température de 298 K et une concentration en protéine et ligand de 1 M :

*Formule 4 :* 
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a$$

On appelle  $R$  la constante universelle des gaz parfaits ( $1,987 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$  soit  $8,314 \text{ J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) et  $T$  la température en degré Kelvin (K). On peut remarquer que plus la constante d'association est élevée, plus le  $\Delta G^\circ$  est négatif. Les paramètres cinétiques déterminent donc la stabilité du complexe protéine-ligand.

Dans une situation d'équilibre, le quotient de la réaction, noté  $Q$  est égal à  $K_a$ . En dehors de cet équilibre, l'énergie libre d'une réaction est donnée par l'équation suivante :

*Formule 5 :* 
$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln K_a$$

Le  $\Delta G$  peut aussi être exprimé par la contribution de l'enthalpie et de l'entropie par la relation suivante :

*Formule 6 :* 
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$\Delta H$  et  $\Delta S$  sont les variations d'enthalpie et d'entropie du système lors de la liaison au ligand. L'enthalpie se définit par l'énergie totale d'un système thermodynamique. L'entropie mesure la distribution de la chaleur dans le système et se réfère aussi au degré d'ordre. On peut également mesurer la variation de la capacité calorifique notée  $\Delta C_p$  qui sera particulièrement utile pour la

méthode d'étude d'interaction par titrage microcalorimétrique isotherme (ITC). Ses variations mesurées entre un état initial et un état final, reflètent en réalité la complexité du processus d'interaction. En effet, la formation du complexe protéine-ligand implique la rupture de liaisons faibles au sein de la structure de la protéine, telles que les liaisons hydrogène ou les interactions de van der Waals (interactions électriques faibles entre atomes et molécules). Pour décrire le mécanisme de ces interactions complexes, différents modèles ont été proposés [323, 325].

### **3. Les modèles d'interactions protéine-ligand**

#### ***a) Les trois modèles de la reconnaissance moléculaire***

On considère généralement trois principaux modèles pour décrire la liaison protéine-ligand. Il s'agit des modèles « clé-serrure », d'ajustement induit et la sélection conformationnelle.

Dans le modèle « clé-serrure », la protéine et le ligand sont rigides et le site de liaison sur la protéine correspond parfaitement à la zone de liaison sur le ligand (*Figure 32a*). Il arrive souvent que la forme du ligand ne soit pas bien adaptée à la protéine. Un autre modèle permet donc de décrire le mécanisme mis en jeu : l'ajustement induit. Dans ce modèle, le site de liaison est flexible et l'interaction avec le ligand induit une modification de la conformation de la protéine au niveau de l'interface concernée (*Figure 32b*). La plupart des protéines ont cependant une grande flexibilité même en dehors de l'interaction avec le ligand. Le modèle de la sélection conformationnelle considère la protéine comme un système dynamique adoptant plusieurs conformations coexistant au sein d'un équilibre avec son milieu. Le ligand peut alors se lier de manière sélective à une ou plusieurs conformations avec une certaine probabilité et déplace ainsi l'équilibre dynamique du système. Un ligand protéique peut également lui-même ajuster sa conformation au site de liaison de la protéine (*Figure 32c*).

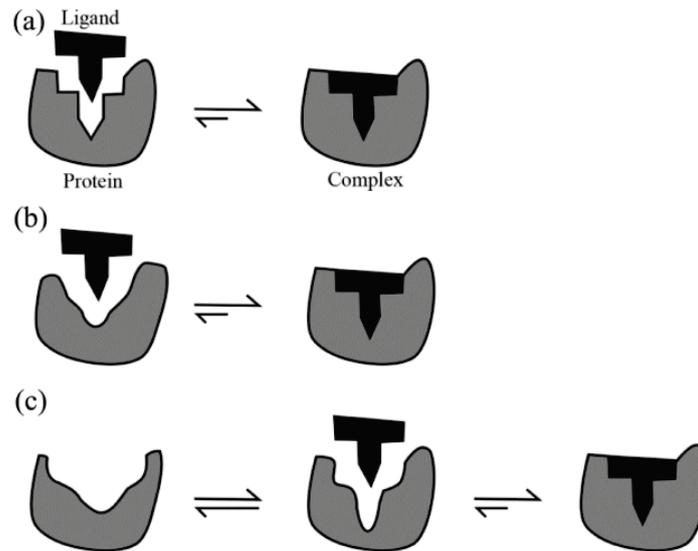


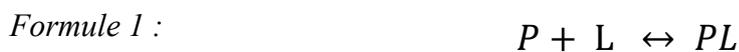
Figure 32 : Schéma illustrant les trois principaux modèles d'interaction protéine-ligand. Le modèle « clé-serrure » (a), d'ajustement induit (b) et la sélection conformationnelle (c) [323].

### **b) Les modèles théoriques de liaison**

Dans un milieu biologique, les molécules s'associent et se dissocient constamment des autres molécules environnantes. La grande majorité de ces liaisons sont trop faibles et d'une durée trop courte pour être détectée. Ce sont des interactions non-spécifiques. L'étude des ligands d'une protéine concerne donc la petite minorité de molécules qui se lient de manière relativement forte et stable. Ces interactions sont dites spécifiques. Quatre modèles de liaison ont été proposés pour les décrire [322].

#### **i. La liaison à un site avec une seule affinité**

La liaison peut se définir par la formule ci-dessous, déjà présentée dans la partie III.A.2.



Si on appelle B le rapport du nombre de moles de ligands liés par mole de protéine ( $[L]_{\text{lié}} / [P]_t$ ), on peut écrire l'équation suivante connue sous le nom d'équation de Scatchard :

Formule 7 :

$$B = 1 - \frac{1}{K_a} \frac{B}{[L]}$$

En faisant varier la concentration en ligand et donc les valeurs de B et de [L], on peut alors effectuer la représentation graphique de B en fonction de B/[L]. Cette représentation est une droite dont le coefficient directeur est  $-1/K_a$  et l'ordonnée à l'origine donne 1 (Figure 33).

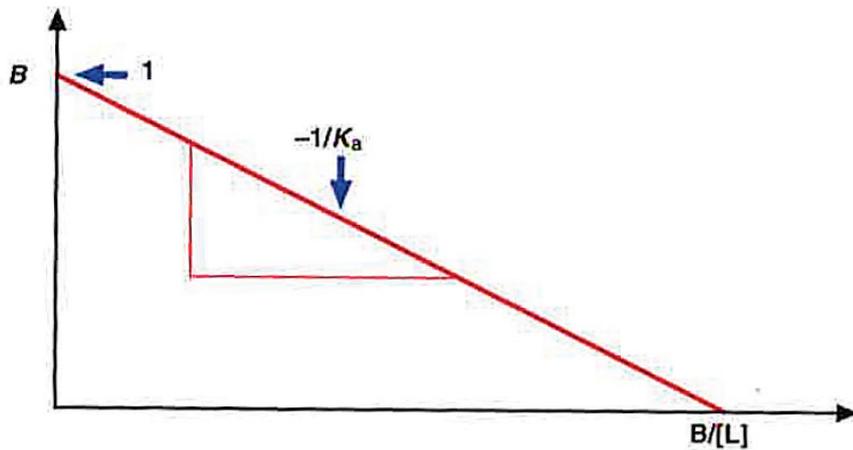


Figure 33 : Représentation de Scatchard d'une liaison à un site [322].

**ii. La liaison à plusieurs sites indépendants ayant des affinités égales**

Le schéma de liaison est représenté par :



L'équation de Scatchard peut être simplement adaptée à une situation avec n sites de liaison ayant la même affinité :

Formule 9 : 
$$B = n - \frac{1}{K_a} \frac{B}{[L]}$$

Ainsi, la représentation graphique de B en fonction de B/[L] correspond à une droite qui a pour ordonnée à l'origine la valeur du nombre de sites (Figure 34).

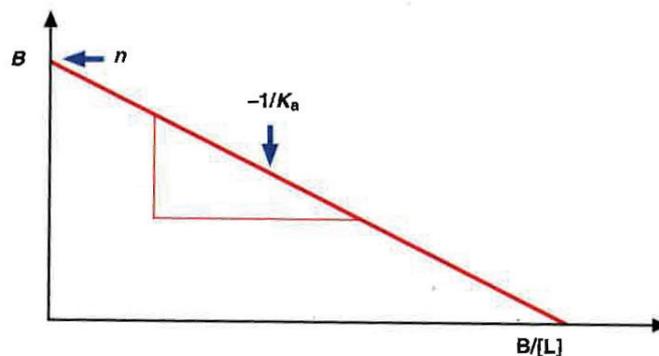


Figure 34 : Représentation de Scatchard d'une liaison à plusieurs site ayant la même affinité [322].

**iii. La liaison à plusieurs sites indépendants ayant des affinités différentes**

Le cas de plusieurs sites avec chacun une affinité différente est beaucoup plus complexe. Pour simplifier on peut considérer que l'on a plusieurs équilibres successifs suivant le schéma suivant :



Les constantes d'association stœchiométriques correspondant à chaque liaison successive, avec  $i$  allant de 1 à  $n$  est donnée par la formule suivante :

Formule 11 :

$$K_{ai} = \frac{[PL_i]}{[PL_{i-1}][L]}$$

Etant donné la complexité de l'équation de degré  $n$  à laquelle aboutit la résolution d'un tel problème, on peut utiliser une équation appelée équation des sites fantômes.

Formule 12 :

$$\sum_{\alpha}^v \frac{K_{\omega}[L]}{1 + K_{\omega}[L]}$$

$K_{\omega}$  est la constante de liaison des sites successifs en partant de  $\alpha$ .

Cette équation permet le calcul de constantes d'associations stœchiométriques des sites fantômes. Cette méthode aboutit à des valeurs aidant à la résolution de l'équation réelle de degré  $n$  [322].

**iv. La liaison coopérative à plusieurs sites interdépendants : l'équation de Hill**

La coopérativité ne peut concerner que les protéines multimériques, telles que l'hémoglobine. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, ce quatrième cas est un peu moins complexe à résoudre que le précédent. Les sites sont interdépendants et la liaison d'un ligand sur un des sites va favoriser la liaison du ligand sur les sites voisins. Il s'agit donc d'une coopérativité positive qui implique que seuls les équilibres de liaison en situation de saturation finale peuvent déterminer le comportement de liaison du ligand. Donc seules les valeurs maximales de liaison ( $K_{a,1}$ ,  $K_{a,2}$  ...  $K_{a,n}$ ) sont pertinentes pour écrire une expression de  $B$ .

Formule 13 :

$$B = \frac{n(K_{a,1}, K_{a,2} \dots K_{a,n})[L]^n}{1 + (K_{a,1}, K_{a,2} \dots K_{a,n})[L]^n}$$

Une équation simplifiée peut alors s'écrire en utilisant  $K'$  comme constante de liaison composite :

Formule 14 :

$$\frac{B}{n} = \frac{[L]^n}{K' + [L]^n}$$

La forme linéaire de cette même équation est appelée équation de Hill :

Formule 15 :

$$\log\left(\frac{B}{n - B}\right) = n \log[L] - \log K'$$

Les représentations graphiques de ces équations sont présentées dans la figure suivante (Figure 35). Avec la formule 14 on obtient des courbes sigmoïdales qui se décalent vers la droite au fur et à mesure que  $K'$  augmente avec la concentration en ligand (Figure 35a). La représentation linéaire de l'équation de Hill donne des droites dont les coefficients directeurs et les ordonnées à l'origine correspondent aux valeurs de  $n$  et  $-\log K'$  respectivement (Figure 35b).

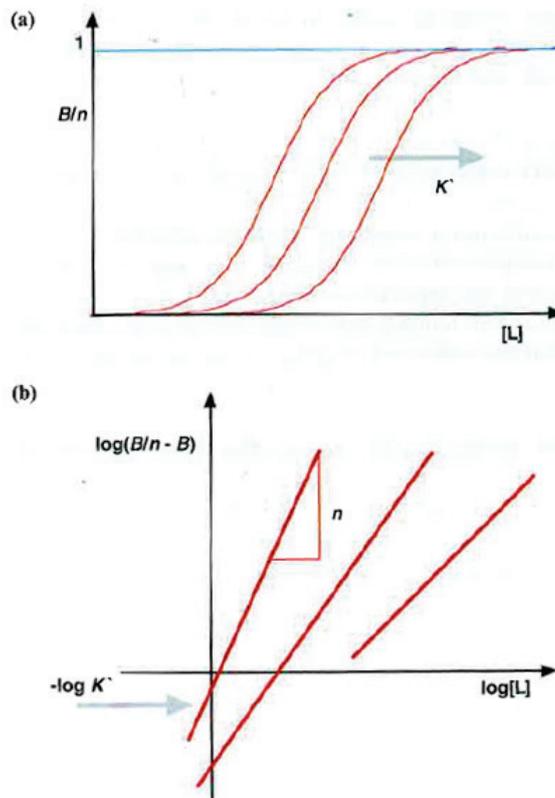


Figure 35 : Représentation graphique de l'équilibre d'une liaison coopérative.  
 (a) La représentation sous forme de courbe sigmoïdale. (b) La représentation sous forme linéaire [322].

Les méthodes présentées permettent d'appréhender la mesure de l'affinité dans des cas plus ou moins complexe. Déterminer ces constantes de liaison est d'autant plus délicat que de nombreux paramètres influencent la mesure et la valeur déterminée n'est donc valable que dans certaines conditions. En effet, il existe plusieurs facteurs pouvant influencer une interaction, notamment la composition du milieu et les modifications affectant la structure d'une protéine donnée.

#### **4. Les facteurs pouvant moduler une interaction**

Les paramètres du milieu tels que le pH, la concentration en ions, la température, et la présence d'autres molécules interagissant avec une protéine influencent son interaction avec son (ou ses) ligand(s) [325]. Au sein de l'organisme, une protéine peut subir des modifications structurales qui altèrent ses propriétés de liaison par rapport à sa forme native. Comme décrit dans les parties I et II, les protéines peuvent être modifiées par glycation et par oxydation dans le cadre de la pathologie diabétique et leurs propriétés sont alors altérées [78]. L'albumine voit ainsi son affinité diminuée pour certains ligands (acides gras, médicaments) [237, 260].

Des mutations génétiques peuvent également modifier l'affinité d'une protéine pour son ligand. Ces modifications peuvent induire une baisse comme une augmentation de l'affinité. Dans un contexte physiologique, une baisse d'affinité n'est pas forcément délétère. Par exemple l'ApoA1 Milano possède une mutation qui lui confère une plus faible affinité pour les lipides mais elle permet cependant une meilleure athéroprotection comparée à l'ApoA1 native, probablement dû à un renouvellement rapide de l'ApoA1 [276].

Des mutations au niveau d'hormones ou de récepteurs peuvent empêcher leur interaction. Ainsi, des mutations dans le gène de la leptine (appelée hormone de la satiété) ou de son récepteur, peuvent abolir leur interaction et entraîner une obésité par une dérégulation de la prise alimentaire. Une mutation faux sens a été ainsi reportée dans le gène de la leptine chez un enfant obèse, induisant la substitution d'un Glu (acide aminé chargé et acide) par une Asn (acide aminé non chargé). Une unique mutation peut donc induire un changement des propriétés locales influençant ainsi la capacité de liaison de la protéine à son récepteur [326].

Par conséquent, pour de nombreuses pathologies, telles que celles dues aux mutations et celles impliquant des variations des conditions du milieu intérieur (diabète, hypercholestérolémie), l'étude des modifications des liaisons protéine-ligand est importante pour la compréhension des mécanismes sous-jacents. Il existe de nombreuses méthodes ayant pour but de comprendre et de quantifier ces interactions.

## **B. Les méthodes d'étude d'interaction protéine-ligand**

Il existe de nombreuses techniques pour détecter et analyser les interactions protéine-ligand. Elles se basent sur des méthodes biochimiques, biophysiques, génétiques ou informatiques. Elles permettent d'étudier ces interactions de manière qualitative ou / et quantitative. L'utilisation de l'une ou l'autre de ces techniques dépend du contexte *in vivo* ou *in vitro*, de la question posée et des contraintes liées à la nature même de la protéine étudiée [327]. Etant donné l'intérêt de ce travail pour l'étude des effets de modifications de protéines sur leurs propriétés d'interaction, nous allons présenter dans cette partie quelques techniques susceptibles de répondre à cette problématique. Les méthodes purement qualitatives telles que la co-immunoprécipitation, le double hybride ou le pull-down ne seront pas présentées ici. Nous décrirons les méthodes quantitatives les plus utilisées. D'abord quelques techniques courantes seront présentées, puis nous décrirons de manière plus détaillée les deux méthodes principales utilisées dans ce travail de recherche, à savoir la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et la titration calorimétrique isotherme (ITC). Ces techniques sont adaptées à l'étude qualitative et surtout quantitative des interactions entre une protéine donnée et un ligand potentiel.

### **1. Les méthodes courantes pour l'étude des interactions**

#### ***a) La dialyse à l'équilibre***

La dialyse à l'équilibre est la méthode la plus simple permettant de mesurer les proportions de ligand liés et non lié et déterminer ainsi les constantes d'équilibre. Le système de dialyse comporte deux compartiments de volume identique séparés par une membrane semi-perméable. Les échantillons de protéine et de ligand de concentrations initiales connues sont placés dans chacun des compartiments. Seul le ligand peut diffuser librement à travers la membrane, la protéine restant dans le compartiment initial. Une fois l'équilibre atteint, la concentration finale en ligand libre est mesurée dans le compartiment contenant uniquement le ligand. On peut alors en déduire la quantité de ligand lié en mesurant la concentration en ligand total dans le compartiment contenant la protéine et sachant qu'à l'équilibre, la concentration en ligand libre est la même de part et d'autre de la membrane (*Figure 36*). On peut ainsi déterminer la valeur de  $B$  pour différentes concentrations en ligand et donc les constantes  $K_a$  et  $K_d$ .

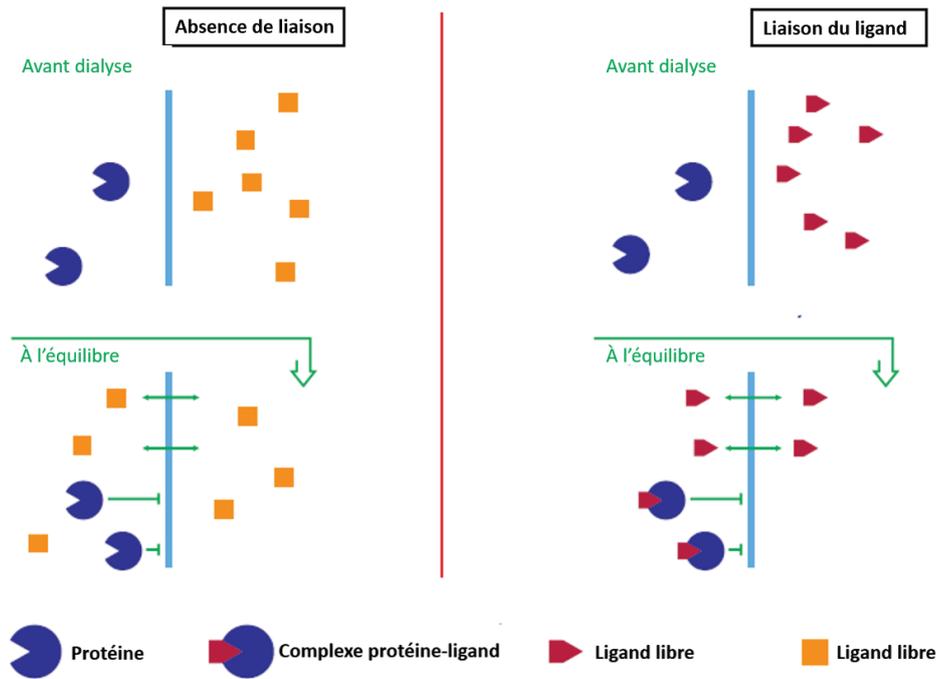


Figure 36 : Principe de la dialyse à l'équilibre (adapté de nestgrp.com)

### b) La fluorescence

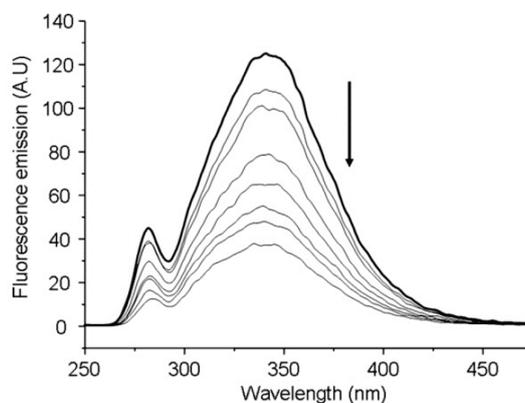
La fluorescence est une technique intéressante pour la mesure des constantes de liaison entre protéines et ligands. Le principe de la fluorescence repose sur deux phénomènes importants : l'excitation de la molécule fluorescente (fluorophore) par absorption d'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée suivie d'une émission à des longueurs d'onde plus élevées due à une perte d'énergie (par conversion interne ou relaxation vibrationnelle).

Les résidus d'acides aminés qui confèrent aux protéines leurs propriétés de fluorescence sont principalement la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. La fluorescence des phénylalanines est faible, celle de la tyrosine est souvent éteinte par les groupements voisins dans la protéine native. La fluorescence du tryptophane, facilement détectable est très sensible aux changements d'environnement. Ainsi, la liaison d'un ligand peut modifier le signal de fluorescence de protéine. Cela peut se traduire soit par une exaltation de fluorescence (effet hyperchrome), soit par une baisse (effet hypochrome), soit par une augmentation ou une diminution de la longueur d'onde d'émission maximale (effet batho- ou hypsochrome respectivement).

Nous prenons comme exemple ici l'effet hypochrome appelé aussi « quenching de fluorescence » qui est souvent observé lors des interactions protéines-ligand. Le terme « quenching » est un terme anglais signifiant « extinction ». Le quenching de fluorescence est la diminution de

l'intensité de fluorescence d'un fluorophore, induite par des interactions avec une autre molécule qualifiée alors de « quencher ». [328]. Cette technique est très sensible, puisqu'on peut détecter la fluorescence à des concentrations de l'ordre du  $10^{-7}$  M. La concentration du fluorophore est proportionnelle à la fluorescence pour des concentrations relativement faible, c'est-à-dire donnant une absorbance inférieure à 0,05 à la longueur d'onde utilisée pour l'excitation [329].

Lorsqu'un ligand se lie à la protéine, il va modifier sa fluorescence. La figure suivante (*Figure 37*) illustre le phénomène de quenching de la fluorescence de la HSA par des concentrations croissantes en kétoprofène (médicament se liant à l'albumine) [260].



*Figure 37 : Quenching de fluorescence de l'albumine. Diminution de l'intensité de l'émission de fluorescence de l'albumine humaine par ajout de concentrations croissantes en kétoprofène [260].*

Si on considère que la diminution de la fluorescence est liée au taux de ligand lié, on peut déterminer la constante de liaison en utilisant l'équation suivante appelée formule :

*Formule 16 :*

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log Ka + n \log[L]$$

$F_0$  est la fluorescence de la protéine à une concentration notée [P] en absence de ligand et  $F$  est la fluorescence de la protéine à la même concentration [P] mais en présence d'une concentration [L] en ligand. La valeur  $n$  correspond au nombre de sites de liaisons concernés par la liaison. La représentation graphique de  $\log(F_0 - F/F)$  en fonction de  $\log[L]$  permet de déterminer les valeurs de  $K_a$  ( $\log K_a$  est l'ordonnée à l'origine) et  $n$  (le coefficient directeur). La figure suivante (*Figure 38*) montre l'exemple d'une étude mettant en évidence une augmentation de la constante de dissociation ( $K_d$ ) du kétoprofène de l'albumine issue de patients diabétiques comparée et à celle

de patients non diabétiques. [260]. L'albumine de patients diabétiques présente donc une affinité altérée pour le kétoprofène.

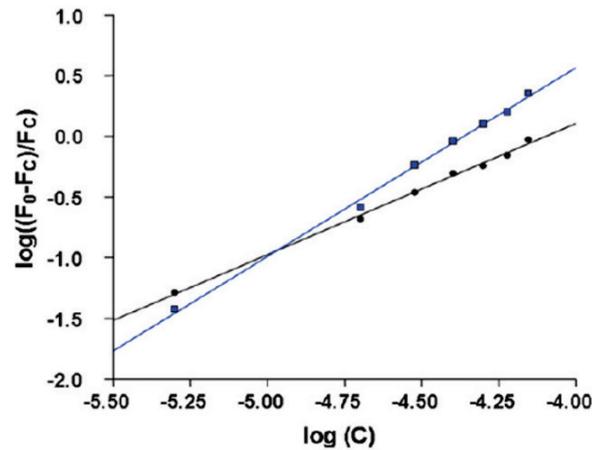


Figure 38 : Graphique d'analyse des données de quenching de fluorescence. Liaison du kétoprofène à l'albumine de patients non diabétiques ( $K_d=163 \text{ nM}$ ,  $n=1,55\pm 0,05$ ,  $r=0,995$ ) (carrés bleus) et diabétiques ( $K_d=34\mu\text{M}$ ,  $n=1,08\pm 0,03$ ,  $r=0,989$ ) (points noirs) [260].

### c) La résonance plasmonique de surface (biacore)

Cette méthode spectroscopique utilise des biocapteurs à miroir résonant qui peuvent mesurer l'interaction protéine-ligand en temps réel. On obtient ainsi des constantes cinétiques qui permettent d'en déduire la constante  $K_a$  correspondant au rapport entre les constantes d'association et de dissociation  $k_{on}/k_{off}$ .

La méthode se base sur la réfraction d'une lumière laser qui traverse un prisme en quartz. Accolée au prisme, une couche de résonance est constituée d'un hydrogel contenant la protéine immobilisée par liaison covalente à la surface du prisme. Si la lumière incidente est complètement réfléchie, le faisceau sortant ne présentera aucune perte d'intensité. En revanche, pour un angle d'incidence appelé angle de résonance, on aura une réfraction d'une partie de la lumière arrivant à l'interface entre le prisme et le gel, formant ainsi une onde évanescente. Le faisceau sortant est alors d'une intensité réduite. L'angle de résonance exact varie en fonction de l'indice de réfraction du gel. En ajoutant le ligand qui diffuse dans le gel, l'indice de réfraction change et au fur et à mesure de la liaison du ligand à la protéine, des perturbations importantes peuvent être mesurées en temps réel (voir illustration Figure 39).

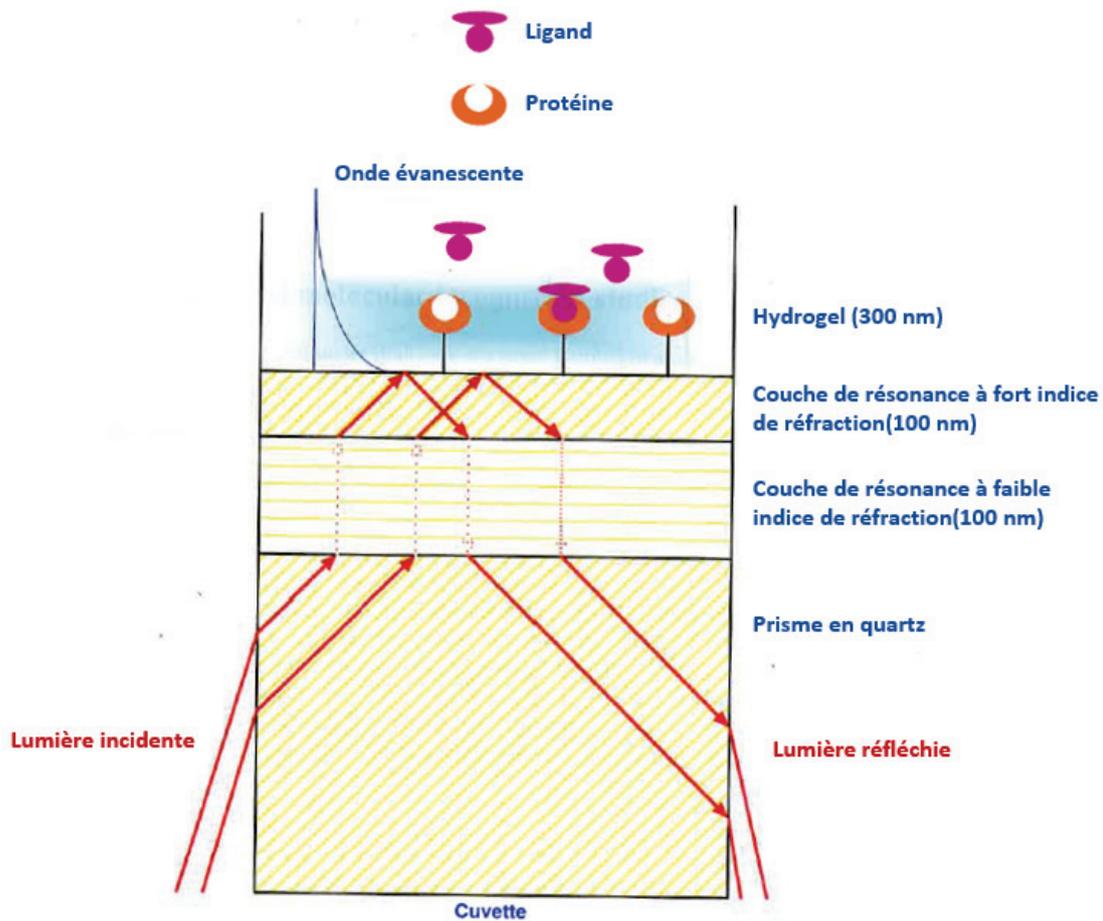


Figure 39 : Schéma du principe de la résonance plasmonique de surface (adapté de [322]).

Les constantes de liaison peuvent être déduite de la constante de vitesse déterminée par la formule suivante :

Formule 17 :

$$Y_t = Y_{\infty} \exp(-k_{\text{off}} t) + Y_0$$

Avec  $Y_t$  l' angle de résonance,  $Y_{\infty}$  l'angle final, et  $Y_0$  l'angle initial.

## 2. La résonance magnétique nucléaire : une méthode biophysique

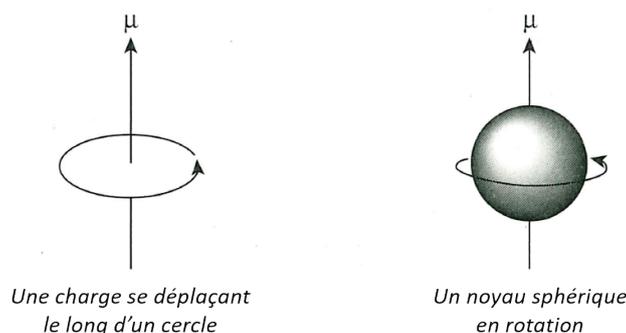
Depuis sa mise au point en 1945, la technique de résonance magnétique nucléaire est très utilisée par les chimistes puisqu'elle permet de déterminer la structure des molécules. Une grande avancée dans le domaine biomédical a eu lieu avec la naissance de l'IRM (imagerie par résonance magnétique) qui est une adaptation de la RMN faisant appel à un marquage spatial. Les applications de la RMN sont très nombreuses, parmi lesquelles l'analyse des interactions protéine-ligand [330]. Après un rappel de ses principes de base nous abordons les méthodes d'étude par RMN des liaisons intermoléculaires.

## a) *Le principe de base de la RMN*

### i. *Le spin des noyaux*

La RMN se base sur les propriétés de spin des noyaux des atomes. Le spin est la rotation du moment magnétique nucléaire d'un noyau. Etant donné sa charge positive, on peut comparer un noyau atomique à un aimant microscopique en rotation autour d'un axe. En effet, la rotation d'une particule chargée va générer un champ magnétique, associé à un moment magnétique, représenté par un vecteur qu'on appelle  $\mu$ , possédant une intensité et une direction comme présenté sur la *Figure 40*. L'intensité de ce vecteur dépend du rapport gyromagnétique noté  $\gamma$  caractéristique de chaque noyau.

Selon leur nombre quantique de spin noté  $I$ , déterminé par le numéro atomique (nombre de protons) et le nombre de masse (nombre de nucléons : protons et neutrons), le noyau a une forme sphérique ( $I = 1/2$ ) ou une forme ellipsoïde ou quadripolaire ( $I = 1$  ou plus avec incrément de  $1/2$ ). Sont plus facilement exploitables en RMN, les noyaux ayant un spin de  $1/2$  tels que  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{29}\text{Si}$  et  $^{31}\text{P}$ . Ainsi les principaux éléments des molécules organiques possèdent au moins un isotope de spin  $1/2$ , sauf pour l'oxygène. Ce sont ces propriétés magnétiques des noyaux atomiques qui sont exploitées pour obtenir des informations sur les structures moléculaires [331]. Dans les parties suivantes, le proton est utilisé comme exemple.



*Figure 40 : Analogie entre le spin d'un noyau et la rotation d'une charge. Le spin des noyaux induit un champ magnétique. Le moment magnétique  $\mu$ , du fait de sa charge, tout comme une charge en rotation le long d'un cercle [331].*

### ii. *L'utilisation des propriétés gyromagnétiques des noyaux*

Un spectromètre RMN est constitué d'un aimant supraconducteur puissant qui génère un champ magnétique intense appelé  $B_0$  de l'ordre du tesla (T). Ce champ atteint 14,1 T pour un

spectromètre 600 MHz, soit plusieurs millions de fois plus intense que le champ magnétique terrestre. Le vecteur  $B_0$  s'oriente selon la direction d'un axe z. Lorsqu'on applique à une molécule ce champ magnétique  $B_0$ , le moment magnétique  $\mu$  des noyaux va avoir une fréquence de précession caractéristique du noyau appelée fréquence de Larmor, notée  $\omega_0$  en radians par seconde ( $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et proportionnelle à  $B_0$  selon la formule suivante :

Formule 18 : 
$$\omega_0 = \gamma B_0$$

Pour un spectromètre RMN générant un champ magnétique d'intensité atteignant les 14 T, la fréquence de Larmor du proton est de 600 MHz (1 Hertz= $2\pi\cdot\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Le vecteur  $\mu$  peut s'orienter dans la même direction que  $B_0$  (+z) (parallèle) ou dans la direction opposée (-z) (antiparallèle). L'intensité  $I_z$  de  $\mu$ , lue sur l'axe z vaut alors  $-1/2$  ou  $+1/2$  comme montré sur la *Figure 41*. L'état de spin  $+1/2$  correspond à un niveau d'énergie un peu plus bas que l'état de spin  $-1/2$ . La répartition des noyaux entre les deux directions se fait donc légèrement en faveur de la direction +z. Plus l'intensité de  $B_0$  augmente, plus cette différence d'énergie notée  $\Delta E$  est élevée. [331].

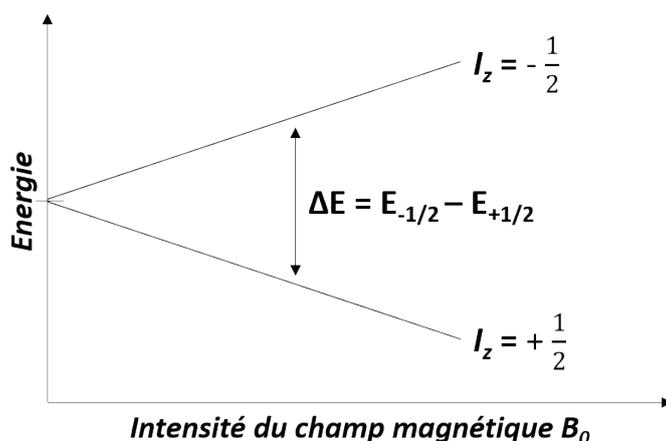


Figure 41 : Niveaux d'énergie des états de spin en fonction de  $B_0$  (d'après [331]).

On peut préciser qu'en absence de  $B_0$ , il n'y a pas de phénomène de précession et tous les noyaux ont la même énergie : on dit alors qu'ils sont dégénérés.

### iii. La résonance et la relaxation

On peut faire passer un noyau d'un état de spin à l'autre en appliquant un second champ magnétique perpendiculaire à  $B_0$  appelé  $B_1$  émettant des ondes de radiofréquence correspondant exactement à la fréquence de Larmor. Cette fréquence est appelée fréquence de résonance. On appelle l'application de  $B_1$  une impulsion de champ de radiofréquence (RF en anglais). Il y a

absorption de l'énergie nécessaire ( $\Delta E$ ) par les noyaux pour passer de l'état  $+1/2$  à  $-1/2$ , alors qu'il y a au contraire une émission d'énergie ( $\Delta E$ ) par les noyaux passant de l'état  $-1/2$  à  $+1/2$ . Comme il y a initialement un peu plus de noyaux dans l'état  $+1/2$ , il en résulte une absorption d'énergie. On peut utiliser une impulsion de champ de radiofréquence faisant basculer l'aimantation à  $90^\circ$  ou  $180^\circ$  en jouant sur la phase du champ RF. Lors de la relaxation, les noyaux vont libérer l'énergie qui avait été absorbée et retournent ainsi à l'état initial, en reprenant leur position par rapport à l'axe  $z$  (relaxation longitudinale ou spin-réseau) et par rapport à l'axe  $x$  ou  $y$  (relaxation transversale ou spin-spin) (Figure 42). Le signal est mesuré dans le temps. Après un traitement mathématique appelé Transformation de Fourier (FT), on obtient ainsi un spectre avec l'intensité d'énergie en fonction de la fréquence [330-332].

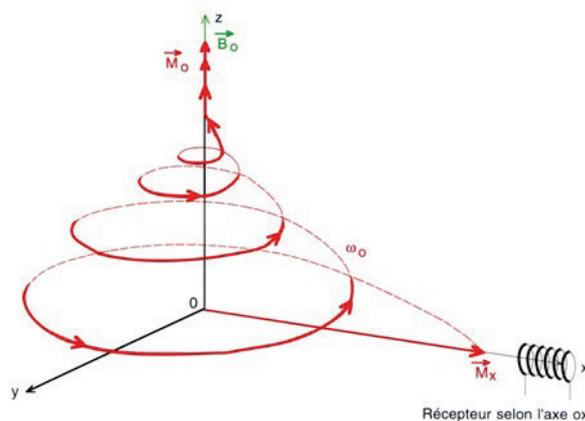


Figure 42 : Représentation de la relaxation.  
Référentiel fixe  $(x, y, z)$  après une impulsion RF de  $90^\circ$ .

#### iv. Environnement et déplacement chimique

Généralement, on n'utilise pas l'unité de fréquence en Hz sur le spectre car les différences sont très faibles et nécessiteraient des nombres avec plus de 6 chiffres après la virgule, et cette fréquence varie également selon le champ magnétique utilisé. On se sert donc du déplacement chimique noté  $\delta$  (delta) qui s'exprime en ppm (partie par million). Pour l'homogénéité des expériences faites avec différents spectromètres, une référence existe pour chaque noyau utilisé, dont le déplacement chimique du signal est considéré comme étant égal à 0 ppm. Le tétraméthylsilane ( $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ , habituellement appelé TMS) est la molécule de référence pour la RMN du proton et du carbone. Le déplacement chimique du proton se calcule en utilisant la formule suivante où  $\nu$  est la fréquence de résonance du proton,  $\nu_{\text{ref}}$  est la fréquence de résonance du TMS et  $B_0$  est la fréquence du champ magnétique appliqué à l'échantillon, ces trois valeurs étant exprimées dans la même unité (Hz ou  $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Formule 19 :

$$\delta = 10^6 \times \left( \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{B_0} \right)$$

Les protons d'une molécule ont des fréquences de résonance différentes selon leur environnement. En effet, les électrons autour des noyaux vont également générer un champ magnétique qui vont légèrement altérer  $B_0$  au niveau du microenvironnement du noyau selon une valeur de modulation appelée constante d'écran et notée  $\sigma$ . Un noyau entouré d'un nuage électronique dense est dit « blindé », le terme contraire étant « déblindé ». On aura ainsi un shift (un décalage) du pic. Le blindage va dépendre de différents facteurs dont le principal est l'électronégativité des atomes environnants. Pour un noyau donné, la fréquence de résonance  $\nu$  en Hz est définie par la formule suivante :

Formule 20 :

$$\nu = \frac{\gamma B_0 (1 - \sigma)}{2\pi}$$

#### v. **Protons équivalents et couplage spin-spin**

Des protons ayant exactement le même environnement (protons équivalents) auront des signaux identiques dont les intensités vont s'additionner. Dans ces phénomènes réside tout l'intérêt de la technique RMN puisque pour une fréquence donnée on peut déterminer les atomes potentiels entourant les protons et l'intégration du signal informe sur le nombre de noyaux détectés pour chaque pic. Des tables répertorient ces valeurs et leurs correspondances. Il existe de surcroît un phénomène de couplage spin-spin entre noyaux. Si le couplage direct (ou dipolaire) n'existe pas en solution (par effet de moyenne), le couplage scalaire (indirect ou J) entraîne l'apparition de multiplets. Un signal en singulet, doublet, triplet ou quadruplet, indique la présence respective de 0, 1, 2 ou 3 atomes d'hydrogènes équivalents dans environnement proche du proton concerné (à moins de 4 liaisons) [330, 331]. L'exemple du spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'éthanol est donné en *Figure 43*.

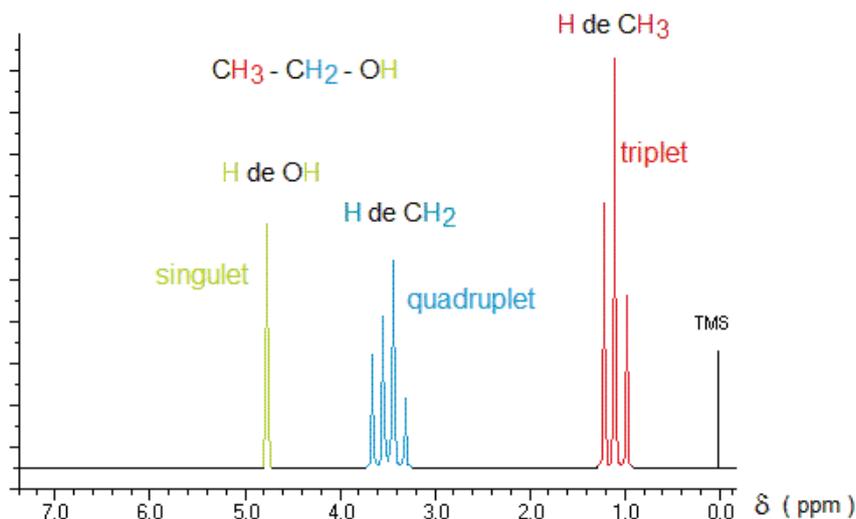


Figure 43 : Spectre RMN de l'éthanol.  
TMS est utilisé comme référence ([www.superprof.fr](http://www.superprof.fr)).

## ***b) La RMN comme méthode d'étude des interactions protéine-ligand***

### ***i. Les variations des paramètres RMN pour l'étude des interactions***

Nous avons vu que le signal RMN d'un noyau est modifié par la densité du nuage électronique à proximité. Pour une molécule donnée, d'autres critères vont entrer en jeu pour moduler les paramètres du signal RMN. L'environnement varie selon le solvant ou par la présence d'autres substances présentes dans le milieu et entrant en interaction avec la molécule étudiée. Ainsi la RMN est une technique de choix pour étudier les interactions moléculaires. L'analyse de la variation de certains paramètres RMN peut permettre de caractériser les interactions protéine-ligand. Ces paramètres doivent pouvoir être mesurés facilement et avec une grande sensibilité pour en détecter les variations. Il s'agit par exemple du déplacement chimique, du coefficient de diffusion, ou des temps de relaxation transversale et longitudinale. On peut également utiliser l'effet NOE (Nuclear Overhauser Effect) et le transfert de saturation. En mesurant ces variations pour des rapports protéine/ligand différents, on peut extraire des expériences des constantes cinétiques ( $k_{on}$  ou  $k_{off}$ ) ou d'affinité ( $K_a$  ou  $K_d$ ). L'expérience NOE apporte des informations supplémentaires au niveau structural. Les changements ayant lieu au niveau de ces paramètres lors de la liaison, peuvent être mesurés en se servant de deux approches différentes. En effet, on peut analyser l'interaction soit à partir des signaux de la protéine ou de ceux du ligand.

L'effet observé dépendra alors essentiellement du régime d'échange dans lequel l'interaction se situe (*Figure 44*).

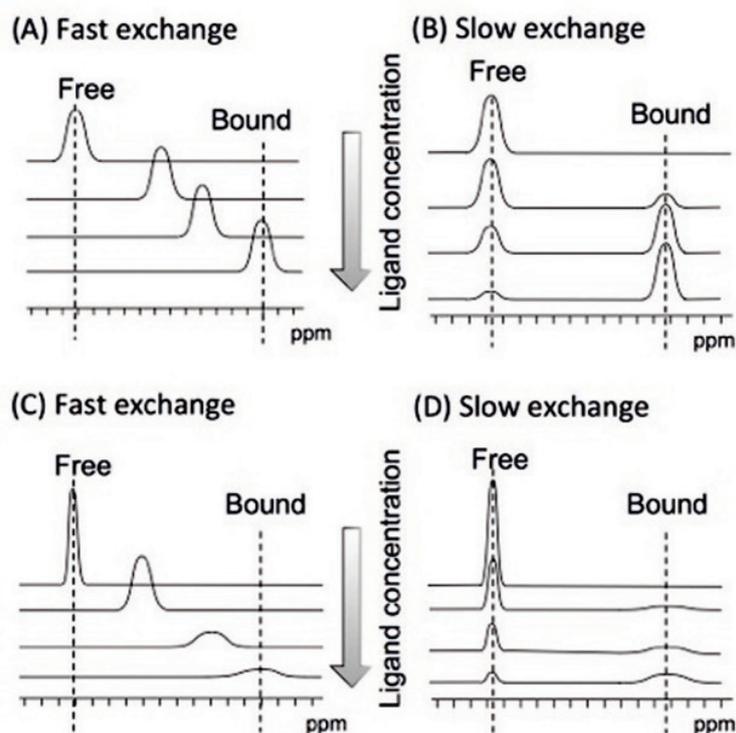


Figure 44 : Profil de titration par RMN typique d'une interaction protéine-ligand. Suivi de l'interaction par l'observation des signaux d'une petite protéine A) en échange rapide B) en échange lent avec le ligand. Suivi de l'interaction par l'observation des signaux du ligand C) en échange rapide D) en échange lent avec la protéine. On observe un élargissement important du signal dans les expériences suivies par l'observation des signaux du ligand [333].

En général, l'étude basée sur la détection du signal de la protéine nécessite un enrichissement isotopique (en  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  par exemple) de plusieurs milligrammes de la protéine recombinante. C'est pourquoi l'approche inverse se focalisant sur l'analyse du signal du ligand, qui est généralement une molécule beaucoup plus petite sera privilégiée. Le ligand peut par ailleurs être également la cible d'un marquage, notamment par le fluor-19.

En effet, ce noyau possède des propriétés de relaxation  $T_2$  très différentes entre la forme libre et la forme liée d'un ligand marqué : le temps de relaxation du fluor-19 est fortement diminué dans la forme liée du fait notamment de la forte anisotropie de déplacement chimique de ce noyau, comme décrit par Dalvit *et al.* [334]. Cela se traduit dans les expériences de titration par une diminution de l'intensité du signal du ligand à mesure que l'on ajoute la protéine (Figure 45).

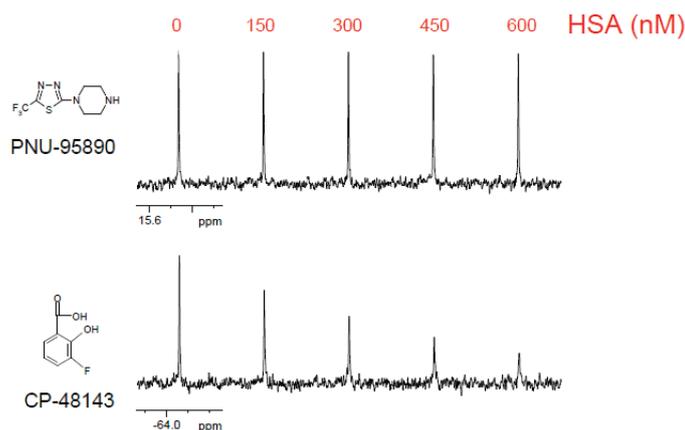


Figure 45 : Principe de base de la titration par RMN d'un ligand fluoré par une protéine. Suivi de l'évolution du signal d'une molécule fluorée qui se lie (CP-48143) et qui ne se lie pas (PNU-95890) à l'albumine [334].

Plusieurs paramètres varient en lien avec cette diminution du signal. Après avoir précisé la signification de chacun de ces paramètres, nous présentons dans les parties suivantes les techniques RMN à deux dimensions utilisant l'effet NOE puis celles se basant sur la dynamique des molécules à savoir les mesures de diffusion et de relaxation (pseudo-2D) [335-337].

## ii. La méthode NOESY et la différence de transfert de saturation

L'expérience COSY (COrrélation SpectroscopY) est très utilisée pour l'étude de la structure locale et se base sur l'existence de couplage J entre protons. En revanche, l'expérience NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) concerne le couplage dipolaire qui existe au niveau de chaque molécule et renseigne sur une proximité spatiale entre protons. Ce couplage dipolaire implique que les 2 spins concernés présentent une relaxation croisée. Seule la relaxation longitudinale (dans la direction de  $B_0$ ) est prise en compte pour la mesure. L'expérience met en jeu plusieurs séries d'impulsions pour obtenir une analyse en deux dimensions. Les taches de corrélation croisée indiquent l'existence de ces couplages entre les atomes concernés au sein de la molécule. Si on analyse ainsi le signal d'un ligand en présence d'une protéine à laquelle il se lie, on pourra détecter deux signaux différents s'il y a un échange assez lent entre les états lié et non lié. Il pourra alors se produire entre ces deux états, un transfert de saturation.

Ainsi, pour un ligand de liaison faible ( $K_d$  de  $10^{-8}$  à  $10^{-3}$  M), l'expérience RMN-STD (Saturation-Transfer Difference) consiste à soustraire un spectre dans lequel la protéine a été sélectivement saturée (spectre on-résonance) de celui obtenu sans saturation protéique (spectre off-résonance). Sur le spectre de différence, ne resteront que les signaux du ou des ligands ayant reçu un transfert de saturation de la protéine (via la diffusion de spin, par l'effet nucléaire Overhauser) (Figure

46). Ce transfert de saturation permet d'analyser les paramètres cinétiques de la formation du complexe protéine-ligand. Cette méthode est aussi très utilisée pour identifier un ligand dans un mélange [330, 335].

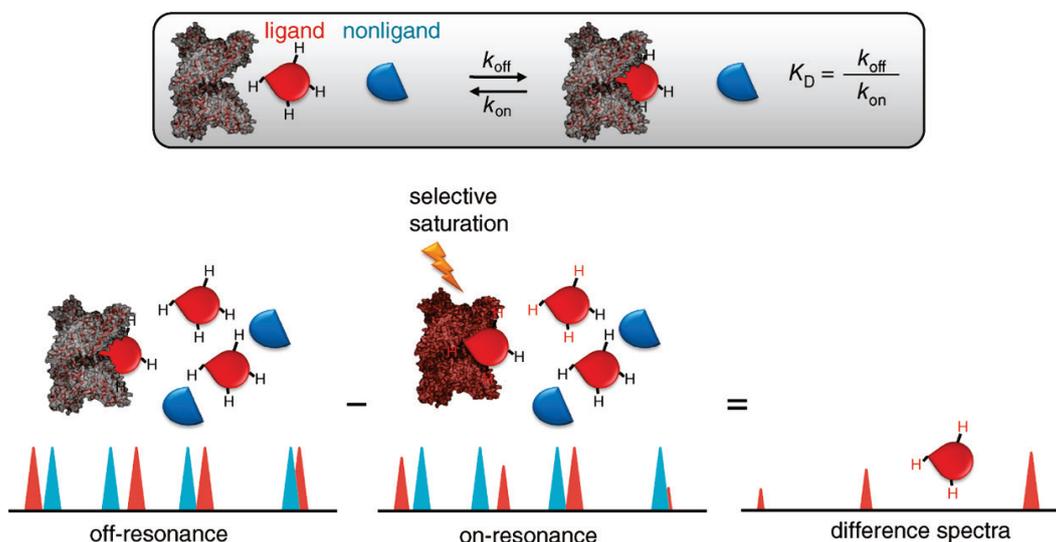


Figure 46 : Schéma de l'expérience RMN de différence de transfert de saturation. L'échange entre le ligand libre et lié permet le transfert d'aimantation intermoléculaire du récepteur (protéine) à la petite molécule liée (d'après [338]).

### iii. La diffusion

Les mesures de diffusion permettent de mesurer la translation des molécules dans l'échantillon au cours du temps grâce à un gradient de champ pulsé. On applique à l'échantillon un gradient de champ, c'est-à-dire que le champ effectif n'est pas homogène mais va varier linéairement le long de l'échantillon. Il existera donc un gradient de champ selon la localisation spatiale de chaque molécule. Après une impulsion à 180°, la deuxième impulsion de gradient induit un déphasage inversé à condition que la molécule soit restée localisée au même endroit. Lorsqu'il y a déplacement des molécules, on obtient donc un signal permettant la mesure de la diffusion moyenne sur l'échantillon. Les résultats se présentent par un diagramme bidimensionnel appelé DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) avec le déplacement chimique sur une dimension et le coefficient de diffusion sur l'autre. L'interaction peut être mesurée du fait que la diffusion du ligand est beaucoup plus rapide que celle de la protéine. Le ligand lié voit ainsi sa diffusion largement ralentie [330] (Figure 47).

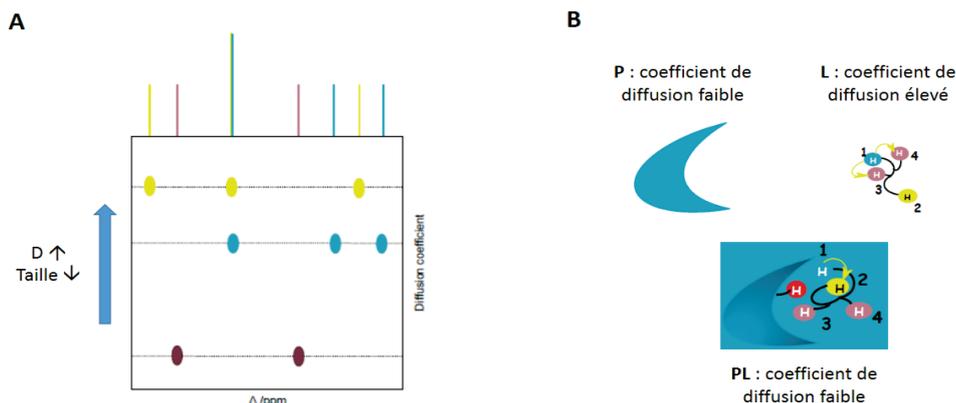


Figure 47 : DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)

A) Schéma illustrant la séparation de l'information RMN 1D dans une seconde dimension basée sur le coefficient de diffusion. B) Schéma illustrant la diminution du coefficient de diffusion d'un ligand lors de sa liaison à une protéine.

#### iv. La relaxation transversale et longitudinale

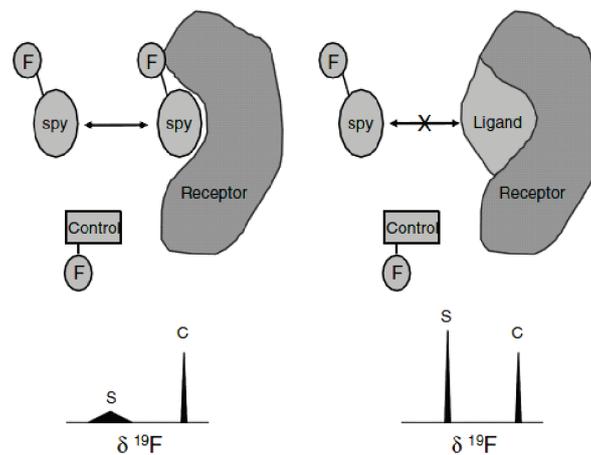
Les temps de relaxation longitudinale et transversale sont respectivement appelés  $T_1$  et  $T_2$ . Les vitesses de relaxation correspondante  $R_1$  et  $R_2$  en sont déduites ( $R_1=1/T_1$  et  $R_2=1/T_2$ ). En se focalisant sur le signal du ligand, on pourra alors observer un temps de relaxation globale plus court en présence de la protéine puisque le complexe protéine-ligand possède une vitesse de relaxation transversale plus élevée que le ligand seul. Le  $^{19}\text{F}$  est un élément de choix pour l'étude des interactions par les mesures de relaxation, étant donné son absence dans les molécules biologiques (marquage spécifique du ligand), ses propriétés gyromagnétiques qui lui confèrent une sensibilité similaire au  $^1\text{H}$  (sensibilité relative  $^{19}\text{F}/^1\text{H} = 0,83$ ) et enfin une plage de déplacement chimique plus large que le proton, permettant ainsi une meilleure sensibilité aux variations d'environnement électronique [337]. On s'intéressera ici particulièrement à la relaxation transversale du  $^{19}\text{F}$ , mesurée en utilisant la séquence CPMG (écho de spin ou séquences pulsées de Carr Purcell et Meiboom Gill). On présente ici deux méthodes : le FAXS (Fluorine chemical shift Anisotropy and eXchange for Screening) et la méthode du taux de décroissance du  $T_2$  par CPMG.

#### v. La méthode FAXS

La méthode FAXS a été proposée par l'équipe de Dalvit en 2002 [339]. Cette méthode se base sur le phénomène de compétition entre une « molécule espion » fluorée et un ligand pouvant tous deux se lier à la protéine cible. Le ligand vient déloger la « molécule espion » (spy en anglais) en la remplaçant sur le site de liaison de la protéine. De cette manière, la proportion de molécules espions libres augmente. Pour un même délai de relaxation, le signal du fluor augmente de par

sa vitesse de relaxation globale diminuée. En effet, la vitesse de relaxation transversale est une moyenne pondérée par les proportions de molécule espion sous forme libre et liée en équilibre. Une « molécule contrôle » qui ne se lie pas à la protéine est présente dans le milieu pour comparer son signal à celui de la « molécule espion » (*Figure 48 : Principe de la méthode FAXS*).

spy :molécule espion [340].) [339, 340]. Cette méthode a déjà été utilisée par exemple pour l'étude de ligands de l'albumine [334].



*Figure 48 : Principe de la méthode FAXS.  
spy :molécule espion [340].*

#### **vi. La méthode du taux de décroissance du T<sub>2</sub> par CPMG**

Le T<sub>2</sub> est un des paramètres les plus utilisés pour la mesure des variations induites par la liaison du ligand à la protéine. Ce paramètre peut également être le T<sub>1</sub> ou le déplacement chimique. On effectue un titrage de la protéine (à concentration constante) par le ligand à concentration croissante. Dans le cas de la mesure du T<sub>2</sub> (comme pour le T<sub>1</sub>), c'est plutôt la différence de vitesse ou temps de relaxation du ligand qui est calculée entre l'état d'équilibre libre/lié existant au point de titrage et l'état libre en absence de protéine. En effet, la vitesse de relaxation transversale du ligand augmente lorsque celui-ci est lié à la protéine. La valeur de R<sub>2</sub> obtenue est une moyenne pondérée entre les états libre et lié [341, 342].

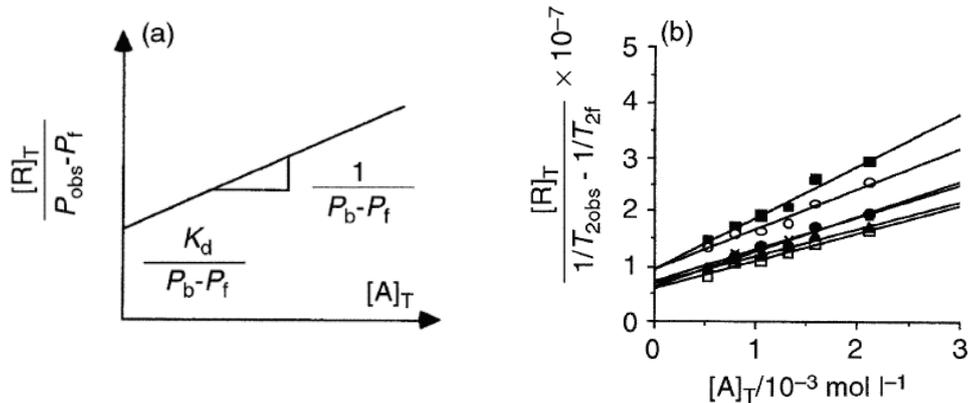
La méthode consiste à représenter sur un graphique le rapport  $[P]_T/\Delta R_2$  en fonction de  $[L]_T$ . Le K<sub>d</sub> correspond alors à l'opposé de la valeur de l'abscisse à l'origine.

[P]<sub>T</sub> : concentration totale en protéine

[L]<sub>T</sub> : concentration totale en ligand

$$\Delta R_2 = R_{2\text{obs}} - R_{2\text{free}} = 1/\Delta T_{2\text{obs}} - 1/\Delta T_{2\text{free}}$$

La figure suivante montre un exemple de titrage d'une protéine R par un ligand A par cette méthode (*Figure 49*) [341].



*Figure 49 : Analyse d'un titrage protéine-ligand par la mesure de  $T_2$ . (a) Représentation graphique d'un titrage d'une protéine R par un ligand A avec suivi de la variation d'un paramètre P ( $\Delta v$ ,  $\Delta\delta$ ,  $\Delta R_1$  ou  $\Delta R_2$ ) ; (b) exemple avec la mesure de la variation du  $R_2$  ( $1/T_2$ ) pour différentes concentrations en protéine [341].*

### 3. La microcalorimétrie : une méthode thermodynamique

#### a) Le principe de l'ITC (isothermal titration microcalorimetry)

La méthode de titration microcalorimétrique isotherme se base sur la mesure de la variation d'enthalpie de l'interaction protéine-ligand, c'est-à-dire la chaleur libérée ou absorbée lors du processus de liaison. Elle permet la détermination des paramètres thermodynamiques que sont les variations d'enthalpie  $\Delta H$ , d'entropie  $\Delta S$ , la capacité calorifique  $\Delta C_p$  et la variation d'enthalpie libre  $\Delta G$  de la liaison. Les constantes d'équilibre ( $K_a$  ou  $K_d$ ) et la stœchiométrie de l'interaction (nombre de sites  $n$ ) en sont déduites. La méthode consiste en un titrage de la protéine par le ligand ou inversement du ligand par la protéine. Le plus souvent, les transitions thermiques sont mesurées sous l'effet de l'injection du ligand dans la cellule contenant déjà la protéine. Dans le cas d'une protéine possédant plusieurs sites de liaison indépendants, la constante d'association obtenue est une constante globale, et la méthode nécessite un ajustement des données à un modèle d'interaction qui permet le calcul des constantes de liaison pour chaque site. La méthode RMN et l'ITC, permettent toutes deux d'étudier les interactions dans des gammes assez larges d'affinité ( $K_a$  entre  $10^3$  et  $10^{10}$ ). La principale limite en RMN intervient lorsque l'interaction se déroule sur une échelle de temps qui donne lieu à un échange intermédiaire entre les formes libres et liées. Le grand avantage de l'ITC est la possibilité d'étudier des protéines et ligands de toute taille,

dans leur forme native et sans passer par une étape de marquage. Tous types de molécules sont ainsi analysables, sans nécessité de posséder des propriétés intrinsèques telles que la fluorescence, l'absorbance, un contenu en isotopes particuliers etc. L'ITC peut également permettre de différencier les réactions de liaison dont le mécanisme est lié plutôt à l'enthalpie (formations de liaisons faibles) ou à l'entropie (déplacement de molécules d'eau au niveau du site de liaison) [322, 343].

### ***b) Détermination des paramètres thermodynamiques et de liaison par ITC***

L'appareil d'ITC comprend deux cellules identiques de la forme de pièces de monnaie. Une cellule est utilisée comme référence et est remplie d'eau et tandis que l'autre cellule est destinée à contenir l'échantillon qui contient soit la protéine soit le ligand (*Figure 50a*). Les deux cellules doivent être maintenues exactement à la même température. Les variations de chaleur dues à la réaction de liaison ayant lieu dans la cellule-échantillon sont détectées en mesurant la puissance différentielle (DP) nécessaire à la restauration d'une température exactement identique à la cellule de référence. Par exemple, si l'interaction est exothermique (libère de la chaleur), la puissance de chauffage nécessaire au maintien de la température sera inférieure à celle de la cellule de référence. C'est le phénomène inverse dans le cas d'une interaction endothermique (qui absorbe de la chaleur). Le deuxième partenaire d'interaction qui est le plus souvent le ligand, est ajouté dans la cellule au fur et à mesure du titrage grâce à une seringue rotative, en petites injections régulières de 0,5 à 2  $\mu$ l. Chaque injection induit un changement au niveau de la température, on observe alors un pic. On obtient ainsi après titrage complet, une série de pics. (*Figure 50b*). Ces pics sont intégrés pour générer une courbe de titrage qui correspond à la chaleur (kcal/mol de ligand) en fonction du ratio molaire du partenaire présent dans la seringue par rapport à celui présent dans la cellule (ligand/protéine). Un ajustement des données (*fitting* en anglais) avec des modèles préétablis permet d'en extraire les différents paramètres précédemment cités (*Figure 50c*).

La principale contrainte de cette technique réside dans la nécessité absolue de disposer des deux partenaires de liaison en solution dans un tampon strictement identique ainsi qu'une pureté suffisante permettant d'attribuer les variations d'enthalpie mesurées à l'interaction seule. En effet, le signal pourrait être masqué par celui dû à la disparité des tampons appelée « buffer mismatch ».

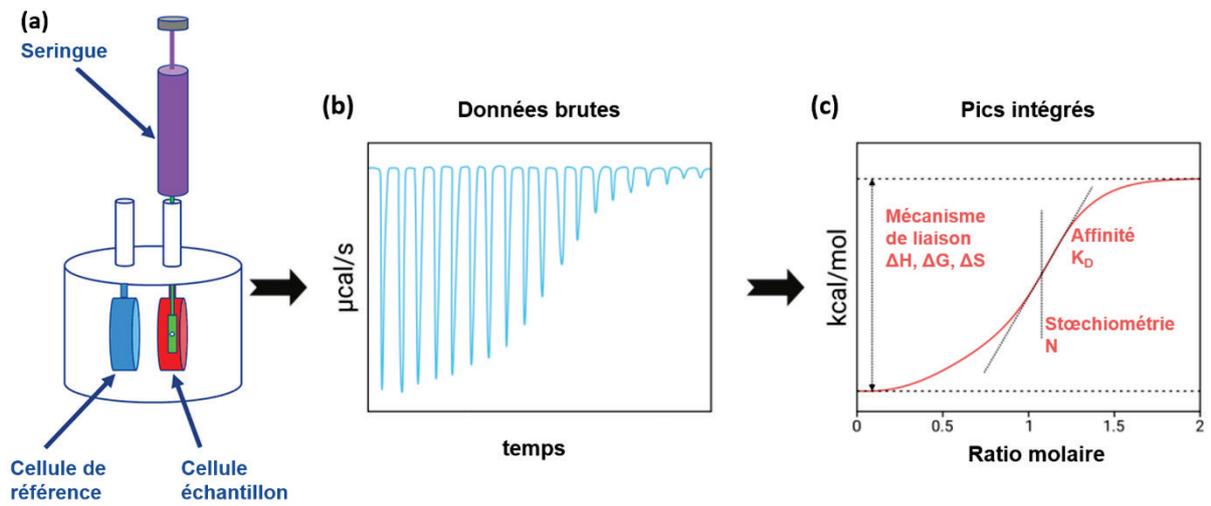


Figure 50 : Principe de l'appareil ITC et traitement des données.

Le ratio molaire est donné en fonction des valeurs en kcal/mol, le  $K_D$  est déduit de la pente de la tangente à la courbe au point ayant pour ordonnée la valeur moyenne entre le minimum et le maximum ; la stœchiométrie  $N$  est l'abscisse de ce même point, le  $\Delta H$  est la différence entre les valeurs maximale et minimale, et pour les autres paramètres, on applique la relation  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  ((adapté de [www.malvern.com](http://www.malvern.com))).

## **Objectifs**



Le diabète et l'athérosclérose touchent tous les pays du globe, notamment l'île de la Réunion. Avec près de 1100 décès par an en moyenne, les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité sur l'île, devant les cancers. Elles sont responsables de près d'un décès sur quatre dans le département [344]. Parmi les facteurs de risque cardiovasculaires les plus significatifs, on trouve principalement le diabète dont la prévalence à la Réunion est estimée à 9,8% (diabètes traités) soit deux fois supérieure à l'ensemble du territoire français (4,6%) [données 2013 du SNIIRAM-DCIR]. Le diabète est d'ailleurs le premier motif d'admission en ALD (affection de longue durée), juste devant les maladies cardiovasculaires [344]. Ces deux pathologies et plus particulièrement le diabète de type 2 sont fortement liées aux habitudes alimentaires et à la qualité de vie. En effet, de manière générale, l'état de santé des personnes en situation de précarité est moins bon que pour le reste de la population [345].

Dans ce contexte diabétique, il est important d'évaluer l'impact de l'hyperglycémie chronique et en particulier de la glycation résultant de cet état sur les protéines sanguines et comment ces modifications affectent le fonctionnement de l'organisme. Nous avons décidé de focaliser notre étude sur deux protéines plasmatiques relativement abondantes : l'albumine et l'Apolipoprotéine A1 dont la glycation est connue pour affecter leur fonction. Leurs fonctions antioxydantes et anti-inflammatoires ayant été largement étudiées, nous nous sommes intéressés à leur fonction de transport, c'est-à-dire la liaison à des molécules libres dans le sang. Nous avons, d'une part, choisi le liraglutide, un médicament de plus en plus utilisé pour le traitement du diabète et dont le transport et la distribution dans l'organisme dépendent de sa liaison à l'albumine. D'autre part, nous nous sommes concentrés sur l'ApoA1 en tant que constituant des HDL qui assurent le transport de plusieurs molécules. Parmi celles-ci, nous avons retenu des composés aux propriétés athéroprotectrices telles que l'alpha-1-anti-trypsine, la sphingosine-1-phosphate et les microARN.

L'objectif de ce travail est dans un premier temps d'étudier l'impact de la glycation de l'albumine sur sa liaison au liraglutide afin de mieux comprendre les variations de l'efficacité thérapeutique observées parmi les patients diabétiques. Dans un deuxième temps, la mise au point de la surexpression d'une l'ApoA1 recombinante humaine a pour but l'obtention de quantités suffisantes d'ApoA1 marquée ou non marquée. Nous cherchons ensuite à mettre en place un protocole d'étude d'interaction pour l'ApoA1 et ses partenaires de liaison afin d'évaluer les effets de la glycation sur ses capacités de liaison en utilisant deux approches méthodologiquement différentes : la spectrométrie RMN et la méthode ITC.



## **Résultats des travaux de recherche**



## I. Etude des effets de la glycation de l'albumine sur son interaction avec le liraglutide, un médicament de plus en plus utilisé dans le traitement du diabète

### *Introduction*

Depuis sa commercialisation en 2013, le liraglutide ou Victoza®, est de plus en plus prescrit, surtout en association avec la metformine. Cet analogue de GLP-1 active le récepteur au GLP-1. Il stimule ainsi la production d'insuline mais régule aussi négativement celle du glucagon et cela de façon glucose-dépendante. Ainsi, le succès du liraglutide résulte du faible risque d'hypoglycémie contrairement aux analogues de l'insuline, mais aussi de son rôle protecteur contre le surpoids et les maladies cardiovasculaires. Son action lente est liée à son oligomérisation, à sa résistance accrue à la dégradation par la peptidase DPP-4 mais surtout à son transport et sa distribution progressive par l'albumine à laquelle il se lie via son acide palmitique (Figure 51).

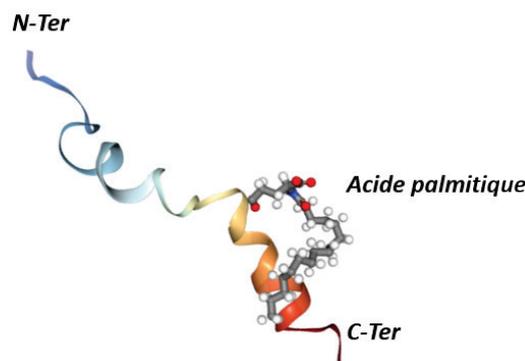


Figure 51 : Structure moléculaire du liraglutide (pdb 4apd, Ludvingsen et al. 2013).

La pathologie diabétique se traduit par une altération progressive de l'état général du patient. Ceci est lié en particulier au phénomène de glycation des protéines. La glycation de l'albumine exerce un effet délétère sur sa fonction antioxydante et anti-inflammatoire mais aussi sur ses propriétés de liaison impactant ainsi l'efficacité de certains médicaments liés à cette protéine (voir I.A.5. p43). De plus, des observations cliniques rapportent une difficulté à stabiliser la glycémie avec un traitement au détémir chez certains sujets diabétiques. L'une des hypothèses pouvant être émise pour expliquer ces observations cliniques est l'altération de la liaison du liraglutide à l'albumine glyquée de ces patients diabétiques.

Afin de déterminer l'impact de la glycation de l'albumine sur sa capacité à lier le liraglutide, nous avons utilisé la méthode de mesure de relaxation transversale par RMN (CPMG). Au préalable, le liraglutide a été marqué au fluor ( $^{19}\text{F}$ ) et l'albumine a été glyquée par le glucose ou le méthylglyoxal. L'étude des interactions entre le médicament et la protéine a été réalisée sur ces modèles de glycation *in vitro* et ensuite comparée à celle impliquant de l'albumine extraite de plasma de patients diabétiques.

### Résultats principaux

Cette étude nous a permis de mettre en évidence une diminution de l'affinité de l'albumine glyquée pour le liraglutide comparée aux contrôles, pour les deux modèles *in vitro* et *in vivo*. Une altération de la liaison a été constatée uniquement pour les albumines ayant des taux relativement élevés de glycation, c'est-à-dire les albumines glyquées *in vitro* par une dose importante de glucose (100 mM) ou par du méthylglyoxal (10 mM) (Figure 52) et les albumines glyquées *in vivo* issues de patients présentant un diabète mal contrôlé (%HbA1c élevé) ainsi qu'un degré de glycation de l'albumine très élevé. En effet les patients ont été séparés en 2 groupes se distinguant par leur taux de HbA1c et d'albumine glyquée (Figure 53).

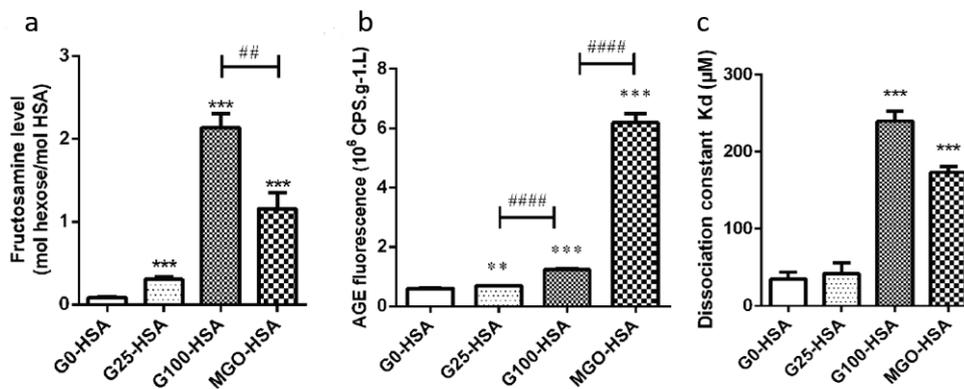


Figure 52 : Etude de l'albumine glyquée *in vitro*.

Les albumines glyquées présentent des taux de fructosamines augmentés (a), et des taux d'AGE supérieurs en particulier pour l'albumine glyquée au méthylglyoxal (b), seules les albumines glyquées de manière relativement importante présentent une altération de leur affinité pour le liraglutide se traduisant par des valeurs de Kd plus élevées (c).

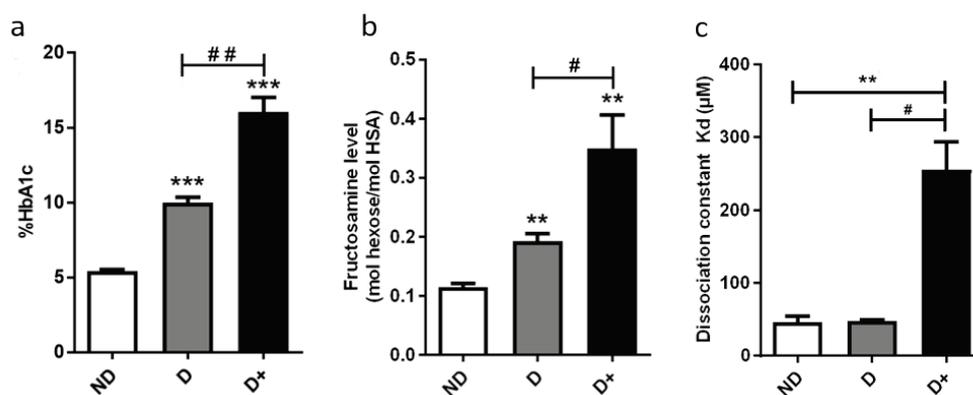


Figure 53 : Etude de l'albumine extraite de plasma de témoins et de patients diabétiques. Les patients diabétiques peuvent être répartis en 2 groupes distincts D et D+ de par leur taux de HbA1c (a) correspondant à des taux moyens d'albumine glyquée significativement différents (b), seuls les patients du groupe D+ attribués à un diabète mal contrôlé, présentent une affinité altérée de l'albumine pour le liraglutide (c).

Ces résultats ont été complétés par d'autres analyses, notamment une étude des sites de glycation par spectrométrie de masse. Cette étude a entre autres montré que parmi les résidus glyqués par le glucose et le méthylglyoxal, le résidu Lys<sup>525</sup> (K525), apparaît comme un site privilégié, connu pour être impliquée dans la liaison de l'albumine à l'acide palmitique.

### Conclusion

Nos résultats démontrent une altération de l'affinité de l'albumine pour le liraglutide *in vitro*, dépendante de la glycation, qui a été confirmée *in vivo*, selon le degré de glycation. Une analyse lipidomique a mis en évidence que cette altération n'est pas due au facteur de compétition des acides gras lié à l'albumine. En revanche, l'analyse peptidique de la protéine modifiée a montré que certains sites de liaison des acides gras sont altérés par la glycation. Nos résultats apportent donc des éléments intéressants permettant d'expliquer les observations cliniques concernant la baisse de l'efficacité de médicaments liant l'albumine chez les patients ayant un diabète mal régulé.

### Article

L'ensemble des résultats de cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal JBC (Journal of Biological Chemistry, *J Biol Chem.* 2018 Mar 30;293(13):4778-4791) acceptée en février 2018, incluse ci-après.





# Glycation of human serum albumin impairs binding to the glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide

Received for publication, September 5, 2017, and in revised form, January 17, 2018. Published, Papers in Press, February 2, 2018, DOI 10.1074/jbc.M117.815274

Angélique Gajahi Soudahome<sup>‡1</sup>, Aurélie Catan<sup>‡</sup>, Pierre Giraud<sup>‡</sup>, Sandrine Assouan Kouao<sup>‡</sup>, Alexis Guerin-Dubourg<sup>§</sup>, Xavier Debussche<sup>¶||</sup>, Nathalie Le Moullec<sup>¶||</sup>, Emmanuel Bourdon<sup>‡</sup>, Susana B. Bravo<sup>\*\*††</sup>, Beatriz Paradela-Dobarro<sup>\*\*††</sup>, Ezequiel Álvarez<sup>\*\*††</sup>, Olivier Meilhac<sup>‡§§</sup>, Philippe Rondeau<sup>‡2</sup>, and Joël Couprie<sup>‡3</sup>

From the <sup>‡</sup>Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète Athéromatose Thérapie Réunion Océan Indien (DéTROI), 97490 Saint-Denis de La Réunion, France, the <sup>§</sup>Services de Cardiologie et de Biologie, Centre Hospitalier Gabriel Martin, 97866 Saint-Paul, France, the <sup>¶</sup>Service d'Endocrinologie, Nutrition, et Diabétologie, CHU de La Réunion, 97400 Saint-Denis de La Réunion, France, <sup>||</sup>CIC1410 INSERM, 97448 Saint-Pierre, Réunion, France, the <sup>\*\*</sup>Proteomic Unit and Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Hospital Clínico Universitario de Santiago, 15706 Santiago de Compostela, Spain, <sup>††</sup>CIBERCV, Av. Monforte de Lemos, 3–5, Pabellón 11, Planta 0 28029 Madrid, Spain, and the <sup>§§</sup>Centre d'Investigation Clinique, CHU de La Réunion, 97448 Saint-Pierre, Réunion, France

Edited by Wolfgang Peti

The long-acting glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide has proven efficiency in the management of type 2 diabetes and also has beneficial effects on cardiovascular diseases. Liraglutide's protracted action highly depends on its capacity to bind to albumin via its palmitic acid part. However, in diabetes, albumin can undergo glycation, resulting in impaired drug binding. Our objective in this study was to assess the impact of human serum albumin (HSA) glycation on liraglutide affinity. Using fluorine labeling of the drug and <sup>19</sup>F NMR, we determined HSA affinity for liraglutide in two glycosylated albumin models. We either glycosylated HSA *in vitro* by incubation with glucose (G25- or G100-HSA) or methylglyoxal (MGO-HSA) or purified *in vivo* glycosylated HSA from the plasma of diabetic patients with poor glycemic control. Nonglycosylated commercial HSA (G0-HSA) and HSA purified from plasma of healthy individuals served as controls. We found that glycation decreases affinity for liraglutide by 7-fold for G100-HSA and by 5-fold for MGO-HSA compared with G0-HSA. A similarly reduced affinity was observed for HSA purified from diabetic individuals compared with HSA from healthy individuals. Our results reveal that glycation significantly impairs HSA affinity to liraglutide and confirm that glycation contributes to liraglutide's variable therapeutic efficiency, depending on diabetes stage. Because diabetes is a progressive disease, the effect of glycosylated albumin on liraglutide affinity found here is important to consider when diabetes is managed with this drug.

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 authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

This article contains Table S1 and Figs. S1–S3.

<sup>1</sup> Supported by a fellowship from the regional council of La Réunion et l'Europe.

<sup>2</sup> To whom correspondence may be addressed: UMR DéTROI INSERM 1188, Université de La Réunion Plateforme CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, France. E-mail: rophil@univ-reunion.fr.

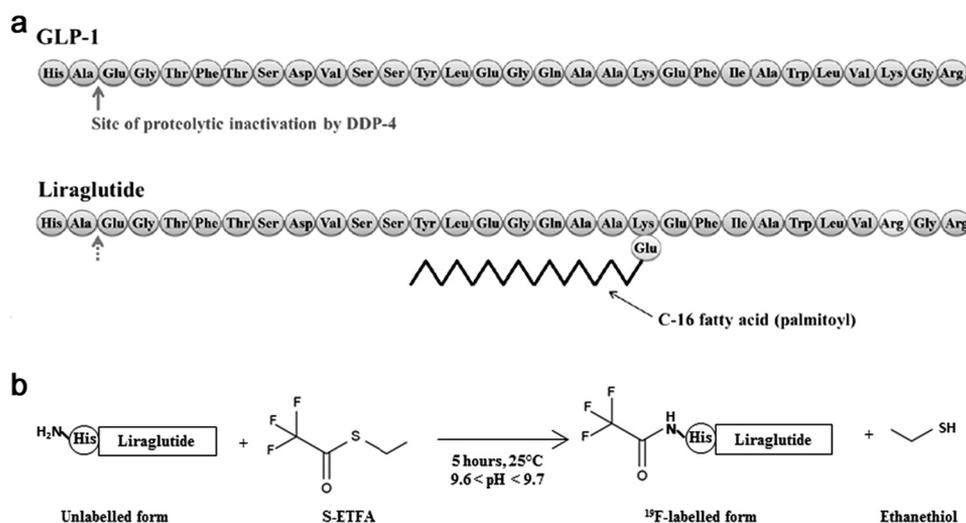
<sup>3</sup> To whom correspondence may be addressed: UMR DéTROI INSERM 1188, Université de La Réunion Plateforme CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, France. E-mail: joel.couprie@univ-reunion.fr.

Diabetes is a metabolic disease that is widespread throughout the world, affecting more than 415 million adults in 2015 (1). Diabetes mellitus is characterized by chronic hyperglycemia. Various treatments can be administered, including rapid and long-acting insulin analogue injections, which are used to counteract insulin production deficiency. These insulin analogues include lispro, glargine, or detemir. Detemir (Levemir®) is carried in the blood by reversible binding to human serum albumin (HSA)<sup>4</sup> through its myristic acid grafted to Lys<sup>B29</sup> (2). More recently, another long-acting drug, a glucagon-like peptide 1 analogue called liraglutide, was commercialized as Victoza® for the treatment of type 2 diabetes. Like detemir, liraglutide binds to HSA via a fatty acid chain. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is a 30-amino acid incretin hormone secreted by intestinal epithelial endocrine L-cells by the differential processing of proglucagon in response to post-prandial hyperglycemia (3).

Liraglutide shares 97% homology with human GLP-1, which binds to and activates the GLP-1 receptor. It differs from endogenous GLP-1 by a one-amino acid substitution (K34R) and by the addition of a palmitic acid grafted to Lys<sup>26</sup> via a glutamate linker (Fig. 1a). Its slow absorption is allowed due to its transport by albumin and also due to its auto-association into oligomers (4–6). Moreover, this GLP-1 analogue undergoes much slower degradation by the enzyme dipeptidyl peptidase-4 than endogenous GLP-1, resulting in a long plasma half-life of 11–15 h. Consequently, liraglutide requires only once-daily subcutaneous injection. Like native GLP-1, liraglutide triggers insulin secretion, inhibits postprandial glucagon secretion, retards gastric emptying, and enhances satiety by acting on the brain (7, 8).

Liraglutide is increasingly used for the treatment of type 2 diabetes due to its increased efficiency compared with other treatments in controlling and stabilizing glucose plasma level

<sup>4</sup> The abbreviations used are: HSA, human serum albumin; AGE, advanced glycation-end products; FFA, free fatty acids; GLP-1, glucagon-like peptide-1; MGO, methylglyoxal; S-ETFA, S-ethyltrifluoroacetate; cps, counts per second; D, diabetics; ND, non-diabetics.



**Figure 1. Liraglutide structure (a) and fluorine labeling reaction (b).**

and because of its capacity to reduce both cardiovascular risk and HbA1c (hemoglobin A1C) level (9–13).

Nonetheless, diabetes mellitus remains a progressive disease with gradual complications; therefore, treatment has to be closely adapted to patient state evolution. The action of liraglutide is highly dependent on its binding capacity to albumin and to its progressive delivery. This dependent therapeutic action of the drug linked to albumin affinity has already been reported for warfarin. Although a genetic factor has been identified in 30% of cases, the other causes of variability in the therapeutic efficiency of warfarin among patients remain unknown (14–16). In the context of diabetes, hyperglycemia induces albumin biochemical integrity alterations caused by a non-enzymatic process called glycation (17). It has been reported that glycated albumin has a decreased affinity for some fatty acids, such as *cis*-parinaric acid (18). Therefore, in patients with high glycation ratio evaluated according to HbA1c levels (higher than 7%), the action of liraglutide may be compromised.

For diabetic patients, the level of glycated albumin can be 2–3-fold higher compared with in healthy people (19, 20). This increased glycation rate of albumin could explain the difference in efficiency of fatty acid-grafted drugs observed in some patients suffering from advanced forms of diabetes (21). In this work,  $^{19}\text{F}$  NMR transverse relaxation time experiments were used to investigate how albumin glycation influences its binding properties to liraglutide. Fluorine NMR is one of the best suited techniques for probing protein-ligand interactions (22–27). This method requires either the use of a naturally fluorinated ligand or fluorine labeling of the protein (26), ligand, or spy molecules (24). Here, we used a strategy where the peptidic liraglutide ligand was first labeled with a fluorine probe by trifluoroacetylation of the unique N-terminal free amine group using S-ETFA reagent (Fig. 1b).

The affinity of albumin to liraglutide was assayed through both *in vitro* and *in vivo* glycation models: methylglyoxal- and glucose-induced glycated commercial human serum albumins were used as *in vitro* models, and albumins purified from the plasma of healthy and diabetic subjects were used as *in vivo* models. This study shows for the first time the impact of glyca-

tion on albumin-liraglutide binding and thereby raises the issue of treatment adaptation to glycation levels in diabetic patients.

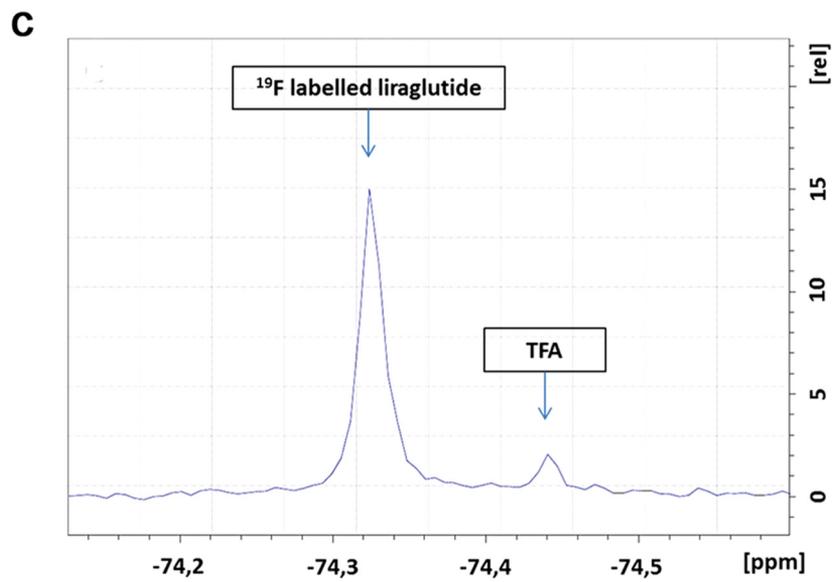
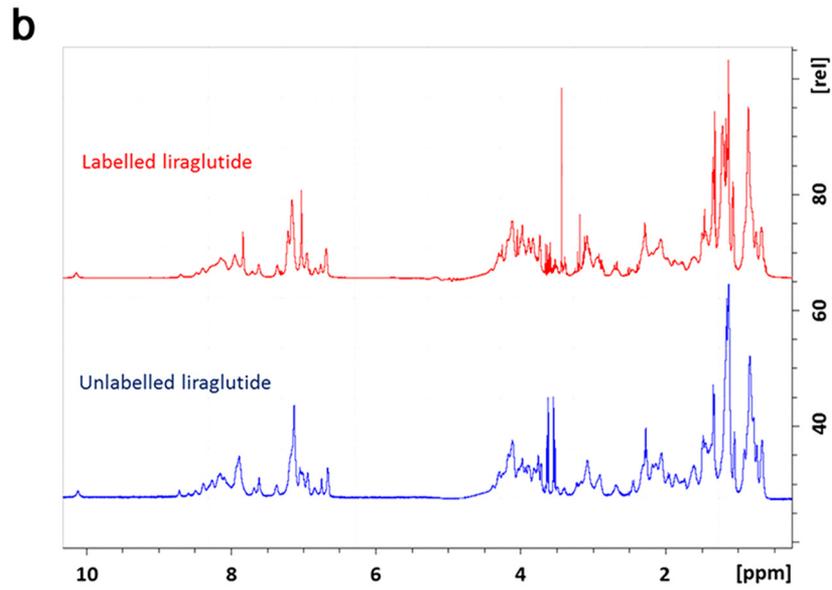
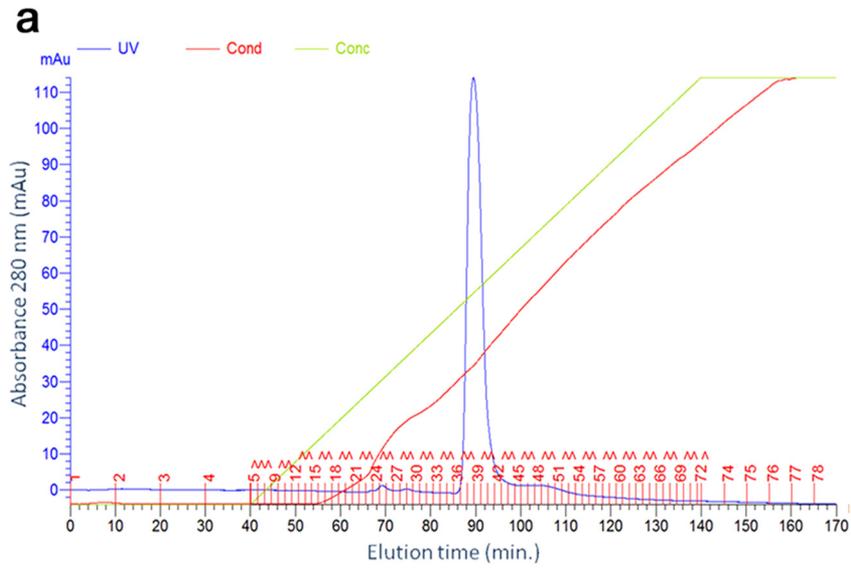
## Results

### Fluorine labeling, purification, and characterization of liraglutide

The peptidic drug liraglutide was labeled by a nucleophilic acyl substitution reaction between the unique N-terminal amine group of liraglutide and S-ETFA (Fig. 1b). During this reaction, the pH had to be carefully controlled (between 9.6 and 10.0), as the amine of liraglutide ( $\text{p}K_a \sim 9.5$ ) has to be deprotonated for the reaction to occur, whereas a too basic medium led to labeled product hydrolysis and potentially altered the protein structure. After fluorine labeling, the purity and biochemical integrity of liraglutide were checked. Anion-exchange chromatography profiles exhibited only one peak at 50% of the sodium chloride gradient, corresponding to the purified labeled liraglutide form (Fig. 2a). Liraglutide was labeled with an average final yield of 80% of the initial amount. 1D  $^1\text{H}$  NMR results confirmed that labeling did not affect liraglutide structure, as demonstrated by the overlaid spectra (Fig. 2b). Furthermore, 1D  $^{19}\text{F}$  NMR analysis showed that liraglutide was correctly labeled with a single peak at  $-74.333$  ppm. Labeled degradation product TFA gave a peak at  $-74.472$  ppm (Fig. 2c). Hydrolysis kinetics of labeled liraglutide was assessed by measuring the  $^{19}\text{F}$  NMR signal for liraglutide and trifluoroacetate over a 60-h duration. Thereby, a time limitation for the experiment was fixed at 6 h, corresponding to the beginning of the significant detectable hydrolysis of labeled liraglutide into liraglutide and trifluoroacetate (Fig. S1). To also confirm that the fluorine label does not alter the binding of liraglutide to albumin, isothermal titration calorimetry experiments were recorded on HSA titrated with either labeled or unlabeled liraglutide. Both labeled and unlabeled peptides yielded similar  $K_d$  values, in the micromolar range,<sup>5</sup> demonstrating that the labeling does not influence the drug binding to albumin.

<sup>5</sup> A. Gajahi Soudahome, P. Giraud, P. Rondeau, and J. Couprie, unpublished results.

# Albumin-liraglutide interaction



### Glucose and methylglyoxal induced different levels of glycation on albumin

After glycation with glucose (100 mM) or methylglyoxal, the commercial fatty acid-free albumin was analyzed by SDS-PAGE (12% acrylamide) and Coomassie Blue staining. Progressively increased molecular weight bands were observed for glycated G100-HSA and MGO-HSA relative to commercial non-glycated albumin (Fig. 3a). Data from mass spectrometry confirmed this observation quantitatively (Fig. 3b). Albumin molecular weights were increased by glucose glycation and even more by MGO treatment, relative to commercial fatty acid-free albumin (66,615 Da): G100-HSA (67314 Da) and MGO-HSA (68071 Da). This increase in weight with respect to non-glycated samples probably corresponds to the formation of AGE adducts on the native molecule of albumin.

These AGE adducts were further identified as described previously by mass shift determination of AGE-modified peptides resulting from the trypsin digestion of each albumin sample (28). Results from this identification are shown in Tables 1 and 2. More modification sites have been reported for G100-HSA (21) and MGO-HSA (26) compared with native albumin G0-HSA (14). Only four additional modification sites were common between both *in vitro* glycated HSA (Arg<sup>98</sup>, Arg<sup>145</sup>, Lys<sup>262</sup>, and Lys<sup>525</sup>), eight sites were specifically modified on G100-HSA, and 11 were only found for MGO-HSA. Among the glycated sites observed only on *in vitro* glycated albumins, four residues (Arg<sup>348</sup>, Lys<sup>402</sup>, Arg<sup>410</sup>, and Lys<sup>525</sup>) are known to be involved in the binding of palmitic acid (29).

According to the fructosamine assay, the albumin glycation level was about 3-fold higher for G25-HSA (equivalent of  $0.30 \pm 0.02$  mol of hexose/mol of HSA) and 25-fold higher for G100-HSA (equivalent of  $2.13 \pm 0.14$  mol of hexose/mol of HSA) compared with G0-HSA ( $0.08 \pm 0.01$  mol of hexose/mol of HSA). Interestingly, MGO-HSA ( $1.16 \pm 0.16$  mol of hexose/mol of HSA) was almost 2-fold less glycated than G100-HSA (Fig. 3c). In contrast, MGO-glycated HSA exhibited 5-fold higher AGE levels ( $6.2 \times 10^6$  cps g<sup>-1</sup> liter) compared with G100-HSA ( $1.2 \times 10^6$  cps g<sup>-1</sup> liter) (Fig. 3d). The glycated albumin obtained under typical hyperglycemia conditions (G25-HSA) had a lower level of AGE ( $0.7 \times 10^6$  cps g<sup>-1</sup> liter) than the other *in vitro* glycated albumin models, just slightly higher than G0-HSA ( $0.6 \times 10^6$  cps g<sup>-1</sup> liter).

### *In vitro* glycated albumin exhibits impaired affinity for liraglutide

The NMR <sup>19</sup>F transverse relaxation time  $T_2$  of labeled liraglutide at variable concentrations was measured at a fixed concentration of albumin, and the plot showing  $[\text{HSA}]_0/\Delta R_{2\text{obs}}$  with respect to trifluorinated liraglutide concentration  $[\text{Lira}^{19}\text{F}]$  shows a linear curve whose horizontal intercept corresponds to  $K_d$  (Fig. 4a). These plots exhibit a good linearity

with correlation coefficients ( $r^2$ ) >0.976 (mean  $0.979 \pm 0.016$ ). The dissociation constants  $K_d$  featured in Fig. 4b for albumin samples were calculated using these plots.

When albumin is glycated with physiopathological glucose concentration (25 mM), no significant alteration of liraglutide binding was observed, as attested by a dissociation constant for G25-HSA ( $42 \pm 12 \mu\text{M}$ ) quite similar to control G0-HSA ( $35 \pm 8 \mu\text{M}$ ). By contrast, albumin that was glycated following glucose incubation in supraphathological conditions (G100-HSA) exhibited an almost 7-fold higher dissociation constant ( $240 \pm 10 \mu\text{M}$ ). Methylglyoxal-glycated albumin affinity for liraglutide was also significantly affected with a  $K_d$  of  $173 \pm 6 \mu\text{M}$  (i.e. 5-fold higher than G0-HSA) (Fig. 4b). Unexpectedly, MGO-glycated HSA that underwent a more drastic glycation process compared with G100-HSA presented an almost equivalent impairment of its affinity to liraglutide. Indeed, as seen on SDS-PAGE, the MGO-HSA sample exhibited a higher-molecular weight band, confirmed by measurement of its exact molecular mass (Fig. 3a). All of these results, obtained by using *in vitro* glycation models, demonstrate that glycation at supraphathological conditions significantly impaired the albumin-liraglutide interactions. To ascertain the relevance of these observations, we investigated this albumin-liraglutide interaction using *in vivo* glycated albumin purified from plasma.

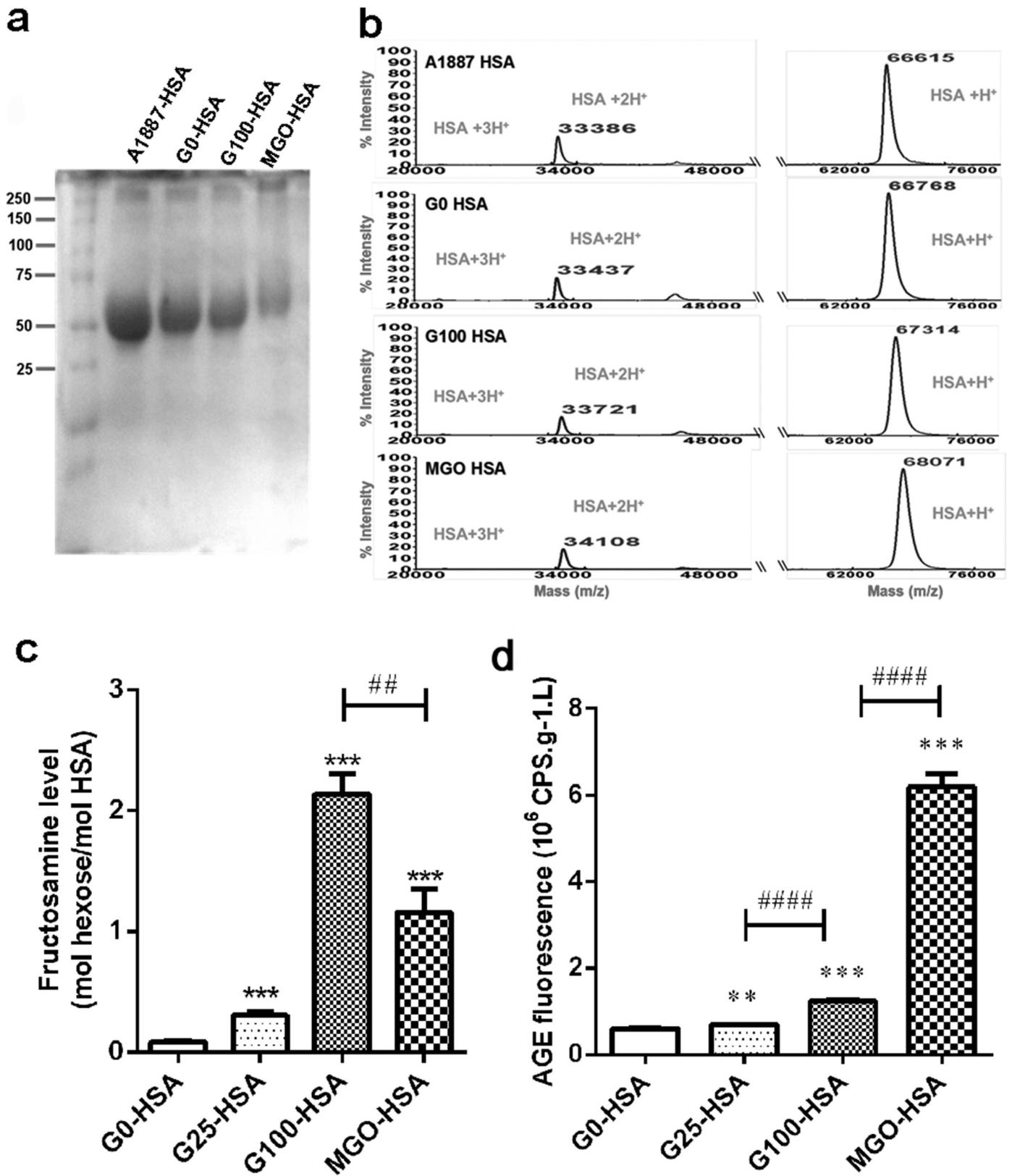
### HbA1c plasma levels of diabetic patients correctly matched with the level of glycation in purified albumin samples

Human albumin samples were isolated from the plasma of both healthy subjects and diabetic patients using a differential ammonium sulfate (AS) method based on the difference in HSA solubility with other plasmatic proteins. As shown in Fig. 5a, the SDS-PAGE pattern showed the major band at around 66 kDa for all purified albumin samples. This pattern attests to the high purity of our human albumin preparations, which were obtained with high yields (above 85%, calculated by densitometry) (Fig. 5a).

Human plasma samples used for this study correspond to diabetic patients with a mean HbA1c level of  $13.4 \pm 3.3\%$ . As clinical observations of drug inefficiency concerned advanced or poorly controlled diabetic patients, our plasma samples were divided into two groups: moderate uncontrolled diabetic patients named group D ( $9\% < \text{HbA1c} < 11\%$  and with a mean of  $10.0 \pm 0.5\%$  HbA1c) and highly uncontrolled diabetic patients named group D+ ( $13\% < \text{HbA1c} < 18\%$  and with a mean of  $16.0 \pm 1.7\%$  HbA1c) (Fig. 5b). The HbA1c percentage for each diabetic patient and healthy subject is given in Table S1.

The fructosamine assay showed that albumin purified from diabetic groups D and D+ were 1.7- and 3-fold more glycated, respectively, than albumin purified from non-diabetics (ND) ( $0.19 \pm 0.02$  and  $0.35 \pm 0.10$  versus  $0.11 \pm 0.01$  mol of hexose/

**Figure 2. Labeled liraglutide analysis.** a, chromatography UV profile indicates that protein is present in fractions 36–42. UV, absorbance at 280 nm; Cond, conductivity; Conc, concentration of NaCl from 0 to 1 M in 50 mM borate buffer, pH 7.5. b, identical 1D <sup>1</sup>H spectra for unlabeled and labeled liraglutide show evidence for no significant structural alteration of the protein due to labeling process (top red spectrum, labeled and ultra-filtrated liraglutide; bottom blue spectrum, unlabeled and dialyzed liraglutide). c, 1D <sup>19</sup>F spectrum of purified labeled liraglutide presents a main peak at  $-74.333$  ppm extending between  $-74.302$  and  $-74.369$  ppm and a degradation peak at  $-74.472$  ppm corresponding to TFA.



**Figure 3. In vitro glycated albumin characterization.** *a*, SDS-PAGE analysis of commercial (A1887)-HSA and G0-, G100-, and MGO-HSA. *b*, mass-to-charge ratio (m/z) versus the percentage intensity plot for A1887-, G0-, G100-, and MGO-HSA. *c*, fructosamine levels of G0-, G25-, G100-, and MGO-HSA. All data are expressed as means  $\pm$  S.D. (error bars) of three independent experiments. \*\*\*, unpaired *t* test compared with G0-HSA. G100-HSA,  $p < 0.0001$ ; MGO-HSA,  $p = 0.007$ . ##, unpaired *t* test comparison between G100- and MGO-HSA,  $p = 0.003$ . *d*, AGE fluorescence measurement on G0-, G25-, G100-, and MGO-HSA. \*\*, unpaired *t* test compared with G0-HSA:  $p < 0.01$ ; \*\*\*, unpaired *t* test compared with G0-HSA:  $p < 0.001$ ; ####, unpaired *t* test comparison:  $p < 0.0001$ .

**Table 1****Glycation-modified peptides identified in native HSA (G0-HSA) by MALDI-TOF-MS peptide mapping**

Tryptic peptides of G0-HSA were analyzed by MALDI-TOF-MS. By comparing with theoretical digestion of unmodified serum albumin, the presence of glycation adducts on albumin was identified after determining the tryptic peptide ions with mass values, which were only present in the samples. Then modifications present in these peptides were characterized by comparing the mass shift with a list of shift mass deviations caused by different glycation adducts. Modified residues are indicated in bold. Residues located at the N terminus or C terminus of the cleaved peptide in undigested HSA are in parentheses.

Position of sequence	Modified residue	Peptide sequence	Peptide mass	Modification	Measured mass	Modification
1–10	Lys <sup>4</sup>	(R)DAHKSEVAHR(F)	1,149.58	162.05	1,311.63	Fructosyl-lysine
99–114	Lys <sup>106</sup>	(R)NECFLQHKDDNP(L)	1,996.93	72.02	2,068.95	N <sup>6</sup> -Carboxyethyl-lysine
99–114	Lys <sup>106</sup>	(R)NECFLQHKDDNP(L)	1,996.93	126.03	2,122.96	Fructosyl-lysine-2H <sub>2</sub> O
175–186	Lys <sup>181</sup>	(K)AACLLPKLDEL(D)	1,398.78	126.03	1,524.81	Fructosyl-lysine-2H <sub>2</sub> O
198–205	Lys <sup>199</sup>	(R)LKCASLQK(F)	947.53	108.02	1,055.56	Pyrraline
219–224	Arg <sup>222</sup>	(R)LSQRFPK(A)	875.51	80.03	955.54	Argpyrimidine
219–224	Arg <sup>222</sup>	(R)LSQRFPK(A)	875.51	142.03	1,017.54	Imidazolone B
263–276	Lys <sup>274</sup>	(K)YICENQDSISSK(L)(E)	1,684.82	58.01	1,742.83	N <sup>6</sup> -Carboxymethyl-lysine/Pentosidine <sup>a</sup>
324–337	Arg <sup>336</sup>	(K)DVFLGMFLYEYARR(H)	1,779.89	142.03	1,921.92	Imidazolone B
349–359	Lys <sup>351</sup>	(R)LAKEYETTLK(C)	1,296.70	72.02	1,368.73	N <sup>6</sup> -Carboxyethyl-lysine
414–428	Lys <sup>414</sup>	(K)KVPQVSTPTLVEVSR(N)	1,639.94	58.01	1,697.94	N <sup>6</sup> -Carboxymethyl-lysine/Pentosidine <sup>a</sup>
473–484	Lys <sup>475</sup>	(R)VTKCCTESLVNR(R)	1,466.71	58.01	1,524.71	N <sup>6</sup> -Carboxymethyl-lysine/Pentosidine <sup>a</sup>
539–545	Lys <sup>541</sup>	(K)ATKEQLK(A)	817.48	58.01	875.48	N <sup>6</sup> -Carboxymethyl-lysine/Pentosidine <sup>a</sup>
542–557	Lys <sup>545</sup>	(K)EQLKAVMDDFAAFVEK(C)	1,856.91	58.01	1,914.92	N <sup>6</sup> -Carboxymethyl-lysine/Pentosidine <sup>a</sup>
542–557	Lys <sup>545</sup>	(K)EQLKAVMDDFAAFVEK(C)	1,840.92	126.03	1,966.95	Fructosyl-lysine-2H <sub>2</sub> O
546–560	Lys <sup>557</sup>	(K)AVMDDFAAFVEKCK(A)	1,790.79	108.02	1,898.81	Pyrraline
565–574	Lys <sup>573</sup>	(K)ETCFEEGKK(L)	1,198.54	252.11	1,450.65	Crossline

<sup>a</sup> Both modifications are possible on lysine, and they are indistinguishable by the mass.

mol of HSA for ND) (Fig. 5c) (the fructosamine levels for each diabetic patient and healthy subject are reported in Fig. S2). In parallel, albumin purified from diabetic patients displayed an increase in fluorescent AGE levels, although it did not reach statistical significance (Fig. 5e;  $p = 0.06$  for D versus ND;  $p = 0.12$  for D+ versus ND).

In addition, albumin samples from diabetic patients and non-diabetic individuals showed a significant and positive correlation between Hb1A<sub>C</sub>, fructosamine, and AGE levels. As shown in Fig. 5d, a strong correlation ( $r = 0.926$ ,  $p < 0.0001$ ) between Hb1A<sub>C</sub> and fructosamine parameters was established. Similarly, a significant correlation ( $r = 0.762$ ,  $p = 0.0104$ ) was obtained between Hb1A<sub>C</sub> and AGE levels (Fig. 5f).

Total free fatty acid (FFA) levels bound to HSA were also determined by GC/MS (Fig. 5g). Albumin purified from diabetic groups D and D+ displayed a tendency to higher FFA levels than albumin purified from ND ( $16.15 \pm 13.00$  and  $13.04 \pm 5.03$  versus  $8.38 \pm 3.36$  nmol/mg HSA for ND) with a large variability between individuals. No statistical difference was observed between both diabetic groups, and no significant correlation could be established ( $r = 0.115$ ,  $p = 0.735$ ) between FFA and fructosamine levels (Fig. 5h).

After determination of the glycation level of plasma-extracted albumin samples, their interaction with liraglutide was assessed by the same method used for *in vitro* glycated commercial albumin.

### HSA from highly uncontrolled diabetic patients exhibits an impairment of binding to liraglutide

HSA from non-diabetic subjects displayed a liraglutide dissociation constant of  $48 \pm 13 \mu\text{M}$ , which appears to be quite similar to the value obtained for commercial HSA. As seen in Fig. 6, a marked difference was observed between groups of diabetic patients in terms of  $K_d$  values (the  $K_d$  value of albumin is reported for each diabetic patient and healthy subject in Fig. S3). Indeed, albumin samples from moderately uncontrolled diabetic patients (D group) were found to have an affinity for liraglutide ( $48 \pm 2 \mu\text{M}$ ), similar to control HSA, whereas a

significant increase in  $K_d$  values was measured for albumin samples of the D+ group ( $224 \pm 60 \mu\text{M}$ ) (Fig. 6). Globally, the affinity of HSA for liraglutide was found to be reduced by almost 5-fold for patients with highly uncontrolled diabetes only. These results are consistent with those obtained with *in vitro* models of albumin and attest to the impairment of albumin affinity for liraglutide in the situation of glycation. Finally, these results suggest that a high level of glycation is required to significantly impair the binding of albumin to liraglutide.

### Discussion

Liraglutide is a recent promising treatment for type 2 diabetes mellitus with a number of benefits relative to existing drugs, especially regarding cardiovascular risk improvement, as described earlier (9–13). The main strategy for the protracted action of liraglutide over the day mainly relies on its transport and progressive release by albumin. Unfortunately, some diabetic patients fail to respond correctly to certain treatments. In particular, this was noticed in clinical observations that glycemia was hardly maintained at acceptable levels for patients treated with long-acting albumin-transported drugs, such as insulin detemir (Levemir®).<sup>6</sup>

Our study aimed to better understand the link between plasmatoc oxidative damages and alterations in the treatment efficiency, which remains highly dependent on diabetes evolution and therapeutic adaptation. Notably, GLP-1 analogues are recommended in the “therapeutic climbing” generally in association with a biotherapy or insulin, when first-line oral anti-diabetics, such as metformin or sulfonylureas, are not efficient enough to reduce the HbA1c level to the therapeutic target (8).

Chronic hyperglycemia, which characterizes diabetes, is the main factor of protein alteration by glycation that is known to be implicated in diabetes aggravation, such as renal failure and

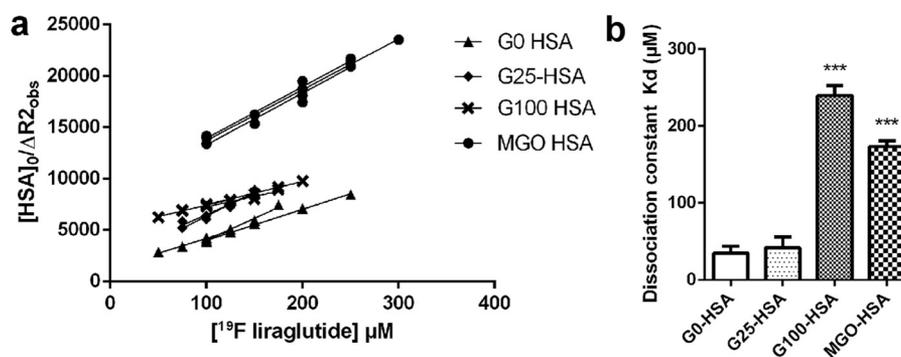
<sup>6</sup> X. Debussche, unpublished data.

**Table 2**  
**Glycation-modified peptides identified in glucose-glycated HSA (G100-HSA) and methylglyoxal-glycated HSA (MGO-HSA) by MALDI-TOF-MS peptide mapping**

Tryptic peptides of G100-HSA and MGO-HSA were analyzed by MALDI-TOF-MS. By comparing with theoretical digestion of unmodified serum albumin, the presence of glycation adducts on glycated albumin was identified after determining the tryptic peptide ions with mass values, which were only present in the glycated samples. Then modifications present in these peptides were characterized by comparing the mass shift with a list of shift mass deviations caused by different glycation adducts. Modified residues are indicated in bold. Residues located at the N terminus or C terminus of the cleaved peptide in undigested HSA are in parentheses.

Position of sequence	Modified residue	Peptide sequence	Peptide mass	Modification	Measured mass	Modification
<b>G100-HSA</b>						
1-10	Lys <sup>4</sup>	(R)DAHKSEVAHR(F)	1,149.58	162.05	1,311.63	Fructosyl-lysine
82-98	Lys <sup>93</sup>	(R)ETYGEMADCCAKQEPER(N)	2,073.83	252.11	2,325.94	Crossline
94-106	Arg <sup>98</sup>	(K)QEPERNEFCFLQHK(D)	1,714.80	142.03	1,856.82	Imidazolone B
99-114	Lys <sup>106</sup>	(R)NFCFLQHKDDNPNLR(L)	1,996.93	144.04	2,140.97	Fructosyl-lysine-H <sub>2</sub> O
145-159	Arg <sup>145</sup>	(R)RHPFYAPELFFAK(R)	1,899.00	270.07	2,169.07	1-Alkyl-2-formyl-3,4-glycosyl-pyrrole
175-186	Lys <sup>181</sup>	(K)AACLPLKLDLRL(D)	1,398.78	126.03	1,524.81	Fructosyl-lysine-2H <sub>2</sub> O
219-224	Arg <sup>222</sup>	(R)LSQREP(K)	875.51	80.03	955.54	Argpyrimidine
219-224	Arg <sup>222</sup>	(R)LSQREP(K)	875.51	142.03	1,017.54	Imidazolone B
258-274	Lys <sup>262</sup>	(R)ADLAKYICENQDSISSK(L)	1,941.92	126.03	2,067.95	Fructosyl-lysine-2H <sub>2</sub> O
263-276	Lys <sup>274</sup>	(K)YICENQDSISSK(L)	1,684.82	58.01	1,742.83	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyl-lysine/Pentosidine*
318-336	Lys <sup>323</sup>	(K)NYAEAKDVELGMFLYAYAR(R)	2,316.10	126.03	2,442.13	Fructosyl-lysine-2H <sub>2</sub> O
324-337	Arg <sup>336</sup>	(K)DVFLGMFLYAYARR(H)	1,779.89	142.03	1,921.92	Imidazolone B
337-348	Arg <sup>337</sup>	(R)RHPDYSVLLRL(L)	1,467.84	270.07	1,737.92	1-Alkyl-2-formyl-3,4-glycosyl-pyrrole
338-351	Arg <sup>348</sup>	(R)HPDYSVLLRLRLAK(T)	1,623.96	80.03	1,703.98	Argpyrimidine
349-359	Lys <sup>351</sup>	(R)LAKTYTELLEK(C)	1,296.70	72.02	1,368.73	N <sup>ε</sup> -Carboxyethyl-lysine
390-410	Lys <sup>402</sup>	(K)QNELFELGEYKFNALLVR(Y)	2,599.30	58.01	2,657.30	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyl-lysine/Pentosidine*
445-466	Arg <sup>445</sup>	(K)RMPCAEDYLVSVLNQLCVLHEK(T)	2,690.31	54.01	2,744.32	N <sup>ε</sup> -(5-Hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)ornithine
473-484	Lys <sup>475</sup>	(R)VTIKCCTESLVR(R)	1,466.71	58.01	1,524.71	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyl-lysine/Pentosidine*
501-521	Lys <sup>519</sup>	(K)EENAEITFHADICTLSEKER(Q)	2,545.17	144.04	2,689.21	Fructosyl-lysine-H <sub>2</sub> O
525-534	Lys <sup>525</sup>	(K)KQIALVELVK(H)	1,128.70	252.11	1,380.81	Crossline
539-545	Lys <sup>541</sup>	(K)ATKEQLK(A)	817.48	58.01	875.48	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyl-lysine/Pentosidine*
561-573	Lys <sup>564</sup>	(K)ADDKETCFAEEGK(K)	1,499.63	162.05	1,661.68	Fructosyl-lysine
<b>MGO-HSA</b>						
5-12	Arg <sup>10</sup>	(K)SEVAHREFK(D)	973.52	270.07	1,243.60	1-Alkyl-2-formyl-3,4-glycosyl-pyrrole
94-106	Arg <sup>98</sup>	(K)QEPERNEFCFLQHK(D)	1,714.80	39.99	1,754.79	N <sup>ε</sup> -(5-Hydro-4-imidazolone-2-yl)ornithine
138-145	Arg <sup>144</sup>	(K)YLEYARR(H)	1,083.59	54.01	1,137.61	N <sup>ε</sup> -(5-Hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)ornithine
145-159	Arg <sup>145</sup>	(R)RHPFYAPELFFAK(R)	1,899.00	54.01	1,953.01	N <sup>ε</sup> -(5-Hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)ornithine
146-160	Lys <sup>159</sup>	(R)RHPFYAPELFFAKR(Y)	1,899.00	72.02	1,971.02	N <sup>ε</sup> -Carboxyethyl-lysine
175-186	Lys <sup>181</sup>	(K)AACLPLKLDLRL(D)	1,398.78	126.03	1,524.81	Fructosyl-lysine-2H <sub>2</sub> O
182-190	Arg <sup>186</sup>	(R)LDLDELDEGK(A)	1,074.54	54.01	1,128.55	N <sup>ε</sup> -(5-Hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)ornithine
198-205	Lys <sup>199</sup>	(R)LKCSAQK(F)	947.53	108.02	1,055.56	Pyrraline
206-212	Arg <sup>209</sup>	(K)FGERAFK(A)	854.45	54.01	908.46	N <sup>ε</sup> -(5-Hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)ornithine
206-212	Arg <sup>209</sup>	(K)FGERAFK(A)	854.45	80.03	934.48	Argpyrimidine
213-222	Arg <sup>218</sup>	(K)AWAVARLSQRF	1,157.65	54.01	1,211.66	N <sup>ε</sup> -(5-Hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)ornithine
219-225	Arg <sup>222</sup>	(R)LSQREP(K)	875.51	80.03	955.54	Argpyrimidine
234-257	Lys <sup>240</sup>	(K)LVTDLTKVHTECCHGDLLECADDR(A)	2,857.29	126.03	2,983.32	Fructosyl-lysine-2H <sub>2</sub> O
258-274	Lys <sup>262</sup>	(R)ADLAKYICENQDSISSK(L)	1,941.92	72.02	2,013.94	N <sup>ε</sup> -Carboxyethyl-lysine
258-274	Lys <sup>262</sup>	(R)ADLAKYICENQDSISSK(L)	1,941.92	126.03	2,067.95	Fructosyl-lysine-2H <sub>2</sub> O
263-276	Lys <sup>274</sup>	(K)YICENQDSISSK(L)	1,684.82	58.01	1,742.83	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyl-lysine/Pentosidine*
349-359	Lys <sup>351</sup>	(R)LAKTYTELLEK(C)	1,296.70	72.02	1,368.73	N <sup>ε</sup> -Carboxyethyl-lysine
352-372	Lys <sup>359</sup>	(K)YETLLEKCCAAADPHECYAK(V)	2,518.07	108.02	2,626.09	Pyrraline
403-413	Arg <sup>410</sup>	(K)FQNALLVRYTK(K)	1,352.77	54.01	1,406.78	N <sup>ε</sup> -(5-Hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)ornithine
414-428	Lys <sup>414</sup>	(K)KVPQVSTPLVEVSR(N)	1,639.94	58.01	1,697.94	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyl-lysine/Pentosidine*
437-444	Lys <sup>439</sup>	(K)CCCKHPEAK(R)	1,029.46	108.02	1,137.48	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyl-lysine/Pentosidine*
473-484	Lys <sup>475</sup>	(R)VTIKCCTESLVR(R)	1,466.71	58.01	1,524.71	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyl-lysine/Pentosidine*
525-534	Lys <sup>525</sup>	(K)KQIALVELVK(H)	1,128.70	1,380.81	1,380.81	Crossline
535-541	Lys <sup>536</sup>	(K)HKPKATK(E)	809.50	162.05	971.55	Fructosyl-lysine
539-545	Lys <sup>541</sup>	(K)ATKEQLK(A)	817.48	58.01	875.48	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyl-lysine/Pentosidine*
546-560	Lys <sup>557</sup>	(K)AVMDDFAAFVEKCK(A)	1,806.79	162.05	1,968.84	Fructosyl-lysine
565-574	Lys <sup>573</sup>	(K)ETCFAEEGK(L)	1,198.54	252.11	1,450.65	Crossline

\* Both modifications are possible on lysine, and they are indistinguishable by the mass.



**Figure 4. NMR experiments for *in vitro* glycated albumin interaction with liraglutide.** *a*,  $[HSA]_0/\Delta R_{2,obs}$  is plotted as a function of liraglutide concentration. A linear regression is calculated, and  $K_d$  is obtained from the vertical intercept. G0-HSA,  $K_d = 35 \pm 8 \mu M$ ,  $n = 3$ ,  $r^2 = 0.989 \pm 0.009$ ; G25-HSA,  $K_d = 40 \pm 12 \mu M$ ,  $n = 3$ ,  $r^2 = 0.955 \pm 0.037$ ; G100-HSA,  $K_d = 240 \pm 10 \mu M$ ,  $n = 3$ ,  $r^2 = 0.974 \pm 0.028$ ; MGO-HSA,  $K_d = 173 \pm 7 \mu M$ ,  $n = 3$ ,  $r^2 = 0.976 \pm 0.014$ . *b*, dissociation constant comparison for non-glycated and *in vitro* glycated commercial albumin. All data are expressed as means  $\pm$  S.D. (error bars) of three independent experiments. \*\*\*, unpaired *t* test compared with G0-HSA;  $p < 0.0001$ .

atherosclerosis (30). Glycation particularly alters structural and functional properties of albumin (31), including the protein affinity for therapeutic drugs (32). For instance, the affinities of many drugs, including warfarin or ketoprofen, were found to be affected by albumin glycation, resulting in the variability of therapeutic efficacy for advanced diabetic patients (for warfarin) (32, 33). Other studies reported an altered albumin affinity for several sulfonylurea drugs commonly used in the treatment of type 2 diabetes (*i.e.* acetohexamide, tolbutamide, and gliclazide) after glycation (34). In parallel, several studies showed that albumin glycation resulted in an impaired affinity for fatty acids, such as lipoic, oleic, linoleic, lauric, and caproic acids (35, 36).

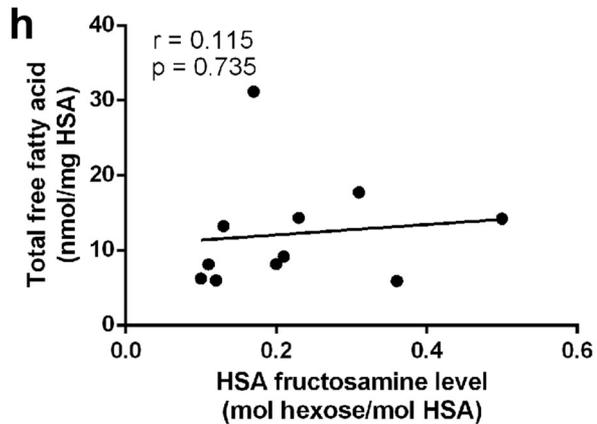
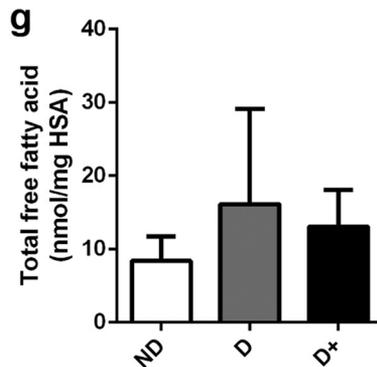
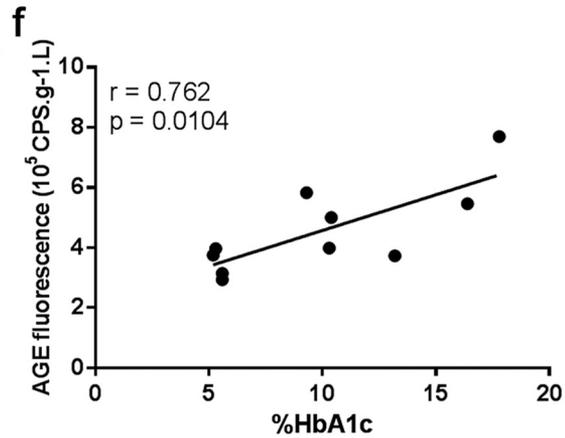
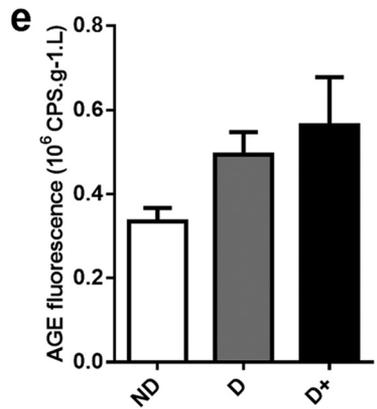
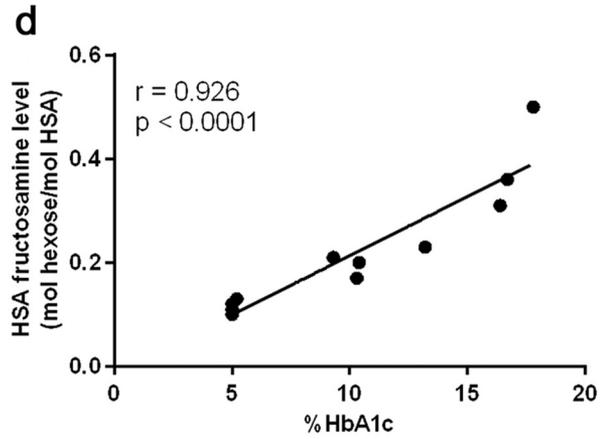
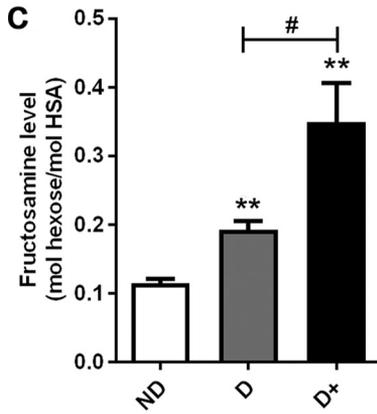
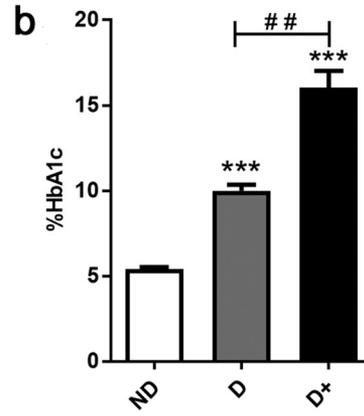
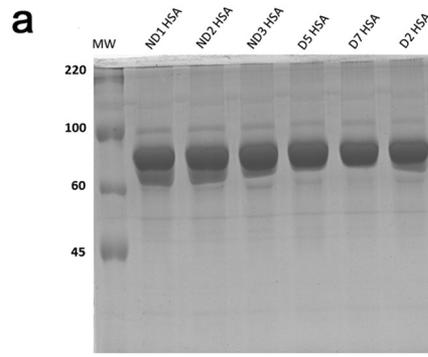
In the present study, we showed for the first time that glycation alters the affinity of albumin for liraglutide. <sup>19</sup>F NMR is one of the best validated techniques for monitoring ligand-protein interactions (22–27). This method has already been used to study the binding of various drugs to albumin, either using naturally fluorinated drugs or by competition with fluorinated spy molecules (24, 37–42). Although a labeling step was required for liraglutide, the <sup>19</sup>F NMR relaxation time method presents the advantage of specifically targeting the labeled peptide drug signal. Moreover, it requires a small amount of protein, as there is an excess of ligand. The N-terminal amine group was targeted for trifluoroacetylation because it leads to a single substitution on the liraglutide peptide. Moreover, this position is located in an unstructured part of liraglutide far from the palmitoyl fatty acid ( $d > 40 \text{ \AA}$  on the X-ray structure: Protein Data Bank entry 4APD) and does not influence the binding to albumin, as confirmed by isothermal titration calorimetry measurements (data not shown). Most previous studies on liraglutide and other fatty acid-grafted GLP1 analogues focused on the measure of their binding to the GLP-1 receptor and rarely on their interaction with albumin (43–45). Recently, a  $K_d$  value of about  $150 \mu M$  for albumin-liraglutide binding was estimated by fitting data from small-angle X-ray scattering and static light scattering methods (46). This latter value is in good agreement with our results obtained by NMR, which present the advantage of giving a direct and accurate measure of the affinity between liraglutide and human serum albumin. Indeed, the measured  $K_d$  values obtained for liraglutide in our study (between  $35$  and  $240 \mu M$ ) indicate a weak binding to human serum albumin. Similarly,

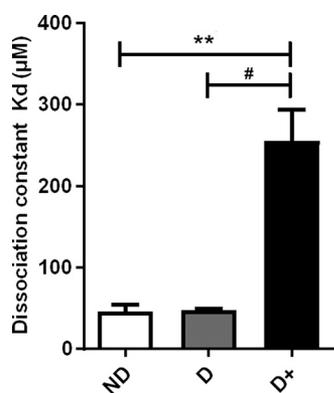
for detemir, which also binds to albumin via a fatty acid chain, a  $K_a$  value of  $2.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  was reported, corresponding to a dissociation constant in the micromolar range (47). These values are much lower than those reported for the binding of free palmitate or fatty acid C16 to albumin, which has an approximate  $K_a$  of  $14.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , corresponding to a dissociation constant in the nanomolar range (48). Thus, fatty acid-grafted peptides (detemir and liraglutide) bind weakly to albumin compared with free fatty acids. This may be the consequence of a restricted access to a number of fatty acid-binding sites on albumin due to steric hindrance by the peptide.

In our study, *in vitro* glucose- or methylglyoxal-glycated commercial albumins appear to mimic the *in vivo* glycation effects, leading to similar alterations of its binding properties. Indeed,  $K_d$  values were comparable between G100-HSA or MGO-HSA and HSA from highly uncontrolled diabetic patients. On the other hand, quite similar  $K_d$  values were obtained for G0-HSA, G25-HSA, and non-diabetic HSA or HSA from moderately uncontrolled diabetic patients.

*In vitro* glycation with  $25 \text{ mM}$  glucose is commonly used for mimicking diabetes conditions. By contrast, *in vitro* glycation with  $100 \text{ mM}$  glucose or methylglyoxal appeared to be more drastic conditions than *in vivo* glycation; this was confirmed by fructosamine measurements and mass spectrometry analysis. Methylglyoxal is mainly formed as a by-product of glycolysis, and its concentration is higher in diabetic patients, reaching  $1 \mu M$  in blood or plasma relative to  $0.55 \mu M$  for controls (49); this plays a role in the exacerbation of protein glycation (50). As confirmed in the present study, MGO-HSA contained more AGE products compared with G100-HSA. Indeed, methylglyoxal is  $20,000$ -fold more reactive than glucose and affects arginine side chains rather than lysines (51), as confirmed by the characterization and location of AGE modifications in albumin molecules. Methylglyoxal is known to induce an important irreversible formation of AGE in glycated proteins (52). Although both *in vitro* G100- and MGO-glycated HSA models display different biochemical modifications, their binding constants for liraglutide appear quite similar. On the contrary, the G25-HSA model affinity for liraglutide was not affected by the glycation, suggesting that a moderate

# Albumin-liraglutide interaction





**Figure 6. NMR results for plasma-extracted albumin interaction with liraglutide.** Shown are albumin-liraglutide  $K_d$  values for non-diabetics (ND), diabetics below 11% HbA1c (D), and diabetics above 11% HbA1c (D+). \*\*, unpaired  $t$  test comparison between ND and D+ groups;  $p = 0.0017$ . #, unpaired  $t$  test comparison between D and D+ groups;  $p = 0.0057$ . Error bars, S.D.

biochemical modification of the protein is not sufficient to alter its drug-binding capacity.

In the same manner, the glycation level strongly influenced the binding for *in vivo* HSA models. Indeed, for healthy subjects and diabetic patients with an HbA1c level up to 10%, the affinity for liraglutide was similar. A decreased affinity was measured for highly uncontrolled diabetic patients only (HbA1c > 13%). This observation suggests that albumin glycation should not affect the therapeutic actions of liraglutide until an advanced stage of chronic hyperglycemia, higher than 300 mg/dl. The altered affinity to albumin could lead to higher free active liraglutide in serum, with altered kinetics and duration of action, which could explain a lower efficacy and unsustained metabolic effects over 24 h, but also a greater susceptibility to gastrointestinal side effects of the drug due to higher peaks of free GLP1 RA concentrations.

Drug binding to albumin has been extensively characterized. The two most common drug-binding sites of albumin are located in the hydrophobic cavities of subdomains IIA and IIIA, known as Sudlow's sites I and II, respectively (53). Non-esterified medium- and long-chain fatty acids, such as myristic and palmitic acid, can bind to seven sites on HSA, three of which are located on Sudlow's drug-binding sites I and II (54, 55). In particular, the albumin region from residues 377–582, including part of domain II and the entire domain III, was found to be the primary binding site for long-chain fatty acids (56), and, more precisely, the key roles of Arg<sup>410</sup> (Sudlow's site II) and Lys<sup>525</sup> (domain IIIB) for fatty acid binding have been reported (57). In our study, both residues were found to be glycosylated in MGO-HSA, whereas only Lys<sup>525</sup> was modified in G100-HSA (Table 2). The effect of glycation on affinity depends on the extent of glycation and is site-dependent (31). Lys<sup>525</sup> is the main site for

both *in vivo* (58) and *in vitro* albumin glycation (18). These results suggest that the modification of this residue may explain the observed reduced affinity of *in vitro* glycosylated HSA for liraglutide. Additionally, Arg<sup>348</sup> (Sudlow's site II) and Lys<sup>402</sup> (domain IIIB) residues, which are involved in fatty acid binding, were also glycosylated *in vitro* for G100-HSA and may contribute to a reduction in the affinity of albumin for the drug. These data indicate that glycation reduces albumin affinity for fatty acid-grafted drugs.

Another factor that could influence binding in the *in vivo* albumin models and contribute to the observed variability between individuals is competition between fatty acids and liraglutide for albumin binding. Such effects at physiological concentrations have been demonstrated on non-glycosylated and glycosylated HSA interactions with sulfonylurea drugs (31).

Indeed, diabetic patients have higher plasma fatty acid concentration than healthy subjects. This is especially observed in obese patients with increased insulin resistance (59). In our study, total FFA levels bound to HSA appeared to be higher in diabetic patients but without reaching statistical significance. Furthermore, no relevant difference was observed between D and D+ groups, suggesting that FFA levels do not significantly contribute to the impairment of liraglutide binding to HSA.

In advanced diabetic cases, a 50% higher drug dosage is usually required (60), with poorly known effects on health. Dose-dependent detrimental effects of liraglutide have been reported, such as the induction of a high risk of pancreatic and thyroid cancer in rats (61–63). Our present work showing impaired liraglutide binding in diabetics indicates the need for further research to prevent glycation-mediated alterations of albumin-drug binding capacity. For example, amino acid or fatty acid length modifications in the liraglutide molecule could modulate its affinity for albumin and afford resilience to glycation-induced modifications at specific binding sites. Indeed, this strategy has been explored successfully by researchers from Novo Nordisk, who recently developed a GLP-1 analogue called semaglutide (64). This peptide contains a substitution of an alanine residue (Ala<sup>8</sup>) by a 2-aminoisobutyric acid for stabilization against dipeptidyl peptidase-4 degradation and a stearic acid instead of a palmitic acid on the same lysine residue (Lys<sup>26</sup>). Its longer-chain fatty acid confers a higher affinity for albumin to semaglutide. It would be interesting to test the hypothesis that the higher affinity of semaglutide for albumin could be less susceptible to alterations by glycation for highly uncontrolled diabetic patients. Optimization of GLP-1 analogues under glycation conditions is an interesting alternative to potentially dangerous dose escalation.

**Figure 5. Plasma-extracted albumin analysis.** a, SDS-PAGE analysis of albumin sample purified from plasma of patients divided into three groups (ND, D, and D+). b, HbA1c levels (%) of patients divided into three groups (ND, D, and D+). \*\*\*, unpaired  $t$  test compared with HSA from ND;  $p < 0.00010$  for D and D+. ##, unpaired  $t$  test comparison between D and D+;  $p = 0.0041$ . c, fructosamine levels of purified albumin from healthy (ND) and diabetic (D and D+) patients. \*\*, unpaired  $t$  test compared with HSA from ND;  $p = 0.0016$  and  $0.0062$ , respectively, for D and D+ groups. #, unpaired  $t$  test comparison between D and D+ groups;  $p = 0.0277$ . d, correlation between percentage HbA1c and albumin fructosamine levels. e, AGE fluorescence measurement on HSA from ND, D, and D+ groups ( $n = 3$ ); unpaired  $t$  test compared with HSA from ND;  $p = 0.0621$  and  $0.1282$ , respectively, for D and D+ groups. f, correlation between percentage HbA1c and albumin-AGE levels. g, levels of FFA bound to purified albumin from healthy (ND) and diabetic (D and D+) patients. h, correlation between levels of FFA bound to purified albumin and albumin fructosamine levels. Error bars, S.D.

## Albumin-liraglutide interaction

### Experimental procedures

#### Liraglutide fluorine labeling and purification

For liraglutide fluorine labeling, the pH of 1.5 ml of a 6 mg/ml commercial liraglutide pen (Victoza®, Novo Nordisk A/S) was adjusted from the initial value of about 8.3 to 9.6 using 0.01 M NaOH. Every hour, 10  $\mu$ l of 97% *S*-ETFA (Aldrich, 177474) was added to liraglutide for 5 h at room temperature. A total of 50  $\mu$ l of *S*-ETFA was used for each labeling, corresponding to a substrate/protein ratio of 110. The pH was maintained between 9.6 and 10 throughout the reaction to allow the proper reaction to occur. After the labeling step, the reaction mixture was first purified by triple dialysis (Spectra/Por® 2,000 D MWCO cut-off) against 50 mM borate buffer, pH 7.5. Then labeled liraglutide was centrifuged at 12,000  $\times$  *g* for 15 min and purified by anion-exchange chromatography on a 5-ml Hi-Trap Q column (GE Healthcare) coupled with AKTA Primeplus apparatus (1-ml/min flow). A 100-ml NaCl gradient from 0.01 to 1 M was then applied to elute the proteins. Elution fractions were further washed and concentrated using a centrifugal filter device (20 mM Vivaspine, molecular weight cut-off 3,000). Purified liraglutide concentration was assessed by measuring UV absorbance at 280 nm using the Beer–Lambert law with the molar extinction coefficient  $\epsilon$ : 1.99 liter  $g^{-1}$   $cm^{-1}$  (5). Purified labeled liraglutide was aliquoted and frozen in liquid nitrogen and then stored at  $-80^\circ C$ .

#### In vitro glycation of albumin

Albumin glycation was performed as described previously (65). Fatty acid-free human serum albumin (Sigma, A1887) solutions were prepared in PBS (pH 7.4) at a concentration of 40 g/liter. HSA solution was incubated at 37  $^\circ C$  with either 10 mM methylglyoxal for 48 h (MGO-HSA) or glucose (25 mM or 100 mM) for 3 weeks (G25-HSA and G100-HSA) or without glucose (G0-HSA).

Two of our *in vitro* glycation preparations constitute common glycated albumin models and use supraphysiological concentrations of glucose (100 mM) or methylglyoxal (10 mM). The third model, which uses a pathological concentration of glucose (25 mM), mimics diabetic conditions. The solutions were then dialyzed four times against PBS, filtered through a 0.22- $\mu$ m Millipore filter, and concentrated using Amicon Ultra-0.5 centrifugal filter devices (3K, Millipore). The final concentration of albumin samples was determined using UV absorbance ( $\epsilon = 34,445 M^{-1} cm^{-1}$ ) and a Bradford assay. Glycated albumin samples were stored at  $-20^\circ C$ . Commercial delipidated (or fatty acid-free) HSA was used to circumvent eventual competitive effect due to fatty acids that could remain bound to albumin after extraction from human serum.

#### Albumin extraction from human sera by ammonium sulfate precipitation

Human plasma samples from diabetic patients were obtained from the Centre Hospitalier Gabriel Martin (Saint-Paul, La Réunion). The procedure and the collection of human materials were approved by the local governmental French Ethical Committee and conformed to the standards set by the Declaration of Helsinki. Control blood samples from healthy individuals were

taken from non-diabetic volunteers. An average of about 2 ml of plasma was retrieved from a whole-blood sample of 5 ml after two successive centrifugations (2,000  $\times$  *g* for 10 min and then 2,500 *g* for 15 min). The supernatant was collected and stored at 80  $^\circ C$ .

A differential ammonium sulfate precipitation two-step protocol described by Mandia's team (66) and modified in our laboratory (67) was used to extract HSA from the plasma. The first step consisted of adding 54% AS to a plasma sample using a saturated 100% AS solution (540 g/liter; pH adjusted to 7.4 with  $NH_4OH$ ). After stirring for 1 h at 4  $^\circ C$ , the whole solution was centrifuged (5,000  $\times$  *g* for 10 min), and the precipitate was discarded. Saturated AS solution was further added to the supernatant under stirring to reach 70% of AS where HSA precipitates. The pellet was collected after centrifugation (10,000  $\times$  *g* for 30 min) and resuspended in 0.1 M sodium phosphate. HSA solution was then washed three times and concentrated by ultrafiltration (Amicon 3K, Millipore). The final concentration of purified albumin was determined using UV absorbance ( $\epsilon = 34,445 M^{-1} cm^{-1}$ ), and samples were stored at  $-80^\circ C$ .

#### Fructosamine assay on human serum albumin

To assess the albumin glycation rate, the fructosamine assay developed by Johnson *et al.* (68) was performed on HSA samples. 1-Deoxy-1-morpholino-D-fructose was used as a fructosamine reference for the standard range. Then 100  $\mu$ l of nitro blue tetrazolium was added to 100  $\mu$ l of sample or commercial glycated albumin range (Sigma A8301, mean of 2.2 mol of hexose/mol of HSA) on 96-well plates. Samples were incubated at 37  $^\circ C$ , and absorbance was measured over time at 540 nm using a FLUOstar Omega microplate reader (BMG LABTECH). Kinetic curves were plotted, and slopes (arbitrary units/min) were calculated using the Omega software. Fructosamine concentrations in samples were expressed as mol of hexose eq/mol of albumin.

#### AGE fluorescence measurement

To assess AGE-peptide levels in glycated commercial albumin, fluorescence measurements were made in a 96-well plate with excitation at 370 nm and emission at 440 nm measured on 100- $\mu$ l samples using a FLUOstar Omega microplate reader. Fluorescent AGE levels were expressed in arbitrary units.

#### Free fatty acid level determination on purified human serum albumin

Free fatty acid level was determined on purified albumin isolated from diabetic and non-diabetic plasma by capillary GC-MS on the ICANalytics lipidomic platform (Paris, France). Purified albumin samples (40  $\mu$ l) were preliminarily supplemented with an internal standard mixture of three deuterated fatty acids in 500  $\mu$ l of methanol and 275  $\mu$ l of 0.1 N HCl. FFAs were successively extracted twice using 1.5 ml of isooctane and derivatized for GC/MS analysis using 50  $\mu$ l of pentafluorobenzyl bromide (10% in acetonitrile) and 50  $\mu$ l of 10% diisopropylamine (10% in acetonitrile). Analysis of FFAs in HSA was performed using an ISQ™ LT single quadrupole GC-MS system (Thermo Fisher Scientific). Separation of FFAs

was performed on a FAST 10 m × 0.1 mm, 0.2- $\mu$ m BPX70 capillary column. The injector temperature was 250 °C, and the samples were injected using the splitless injection mode. Quantification was performed on a single quadrupole using chemical ionization with methane.

### Mass spectroscopy and peptide characterization

The glycation of serum albumin was analyzed by MALDI-TOF-MS for mass shift determination and for AGE-modified peptide exploration, as described previously (69).

### NMR analysis of purified <sup>19</sup>F-labeled liraglutide with albumin

Purified protein solution was analyzed by 1D <sup>1</sup>H and <sup>19</sup>F NMR to check for the presence of correctly folded and <sup>19</sup>F-labeled liraglutide. A final volume of 500  $\mu$ l of liraglutide in 50 mM borate buffer, pH 7.5, was used, to which 50  $\mu$ l of deuterium oxide (D<sub>2</sub>O) was added. No <sup>1</sup>H or <sup>19</sup>F reference was used in order to avoid possible influence on the binding. 1D <sup>1</sup>H experiments were performed using water suppression with gradients (128 scans, relaxation delay of 2 s). Fluorinated liraglutide hydrolysis kinetics leading to unlabeled liraglutide and TFA was followed by recording 1D <sup>19</sup>F NMR spectra at 25 °C on a 100  $\mu$ M sample in 50 mM borate buffer, pH 7.5, for 60 h (512 scans, relaxation delay of 7 s, and a transmitter frequency of 564.690823 MHz). All NMR experiments were recorded on a 600-MHz Bruker Avance III spectrometer equipped with a triple resonance <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-<sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C TCI cryoprobe. NMR spectra were processed and analyzed with Topspin version 2.1.6 software (Bruker).

### Transversal relaxation rate analysis for albumin-liraglutide binding *K<sub>d</sub>* determination

To study liraglutide-albumin interaction, transversal relaxation time *T*<sub>2</sub> (or corresponding rate *R*<sub>2</sub> = 1/*T*<sub>2</sub>) was measured by a pseudo-2D <sup>19</sup>F CPMG (Carr–Purcell–Meiboom–Gill) pulse program consisting of acquiring signal with increasing relaxation delays (1, 5 10, 20, 30, 50, 70, 100, 150, and 200 ms). The parameters used for the <sup>19</sup>F CPMG experiments were the following: a temperature of 25 °C, 512 scans, a relaxation delay of 3.5 s, and a transmitter frequency of 564.690823 MHz. A specific concentration of HSA (10, 20, or 30  $\mu$ M) was added to a range of labeled liraglutide from 50 to 300  $\mu$ M. For each titration point, the transversal relaxation time *T*<sub>2</sub> (*T*<sub>2</sub> = 1/*R*<sub>2</sub>) was calculated with the *T*<sub>2</sub> determination menu from Topspin. From these *T*<sub>2</sub> values, dissociation constants were calculated by the method developed by the team of J.-P. Girault (70); [*P*]<sub>0</sub>/Δ*R*<sub>2obs</sub> values were plotted as a function of liraglutide concentration to obtain a *K<sub>d</sub>* value from the horizontal intercept. [*P*]<sub>0</sub> corresponds to total albumin concentration ([HSA]<sub>0</sub>) and Δ*R*<sub>2obs</sub> is the difference between *R*<sub>2</sub> values, in the presence and in the absence of albumin (1/*T*<sub>2obs</sub> – 1/*T*<sub>2free</sub>). Higher *K<sub>d</sub>* values reflect a lower affinity. All titrations were recorded in triplicate.

### Statistical analysis

The data are expressed as the means ± S.D. from a minimum of three experiments. Statistical significances were determined using one-way analysis of variance (followed by Student's *t* test)

for multiple comparisons; a *p* value of <0.05 was considered as significant.

*Author contributions*—A.G. researched data, wrote, and reviewed the manuscript. P.G. researched data and reviewed the manuscript. A.C. researched data and reviewed the manuscript. S.A.K. researched data. A.G.D. contributed discussion and reviewed the manuscript. X.D. had the original idea, contributed discussion, and reviewed the manuscript. N.L.M. reviewed the manuscript. E.B. reviewed the manuscript. S.B. researched data and reviewed the manuscript. B.P.D. researched data and reviewed the manuscript. E.A. researched data, contributed discussion, and reviewed the manuscript. O.M. reviewed the manuscript. P.R. coordinated the study; researched data; and wrote, reviewed, and edited the manuscript. J.C. had the original idea; conceived and coordinated the study; researched data; and wrote, reviewed, and edited the manuscript.

*Acknowledgment*—We thank Dr. Emmanuel Bourdon for manuscript editing.

### References

- International Diabetes Federation (2015) International Diabetes Federation diabetes atlas, 5th Ed., International Diabetes Federation, Brussels, Belgium
- Whittingham, J. L., Havelund, S., and Jonassen, I. (1997) Crystal structure of a prolonged-acting insulin with albumin-binding properties. *Biochemistry* **36**, 2826–2831 [CrossRef Medline](#)
- Bode, B. (2012) An overview of the pharmacokinetics, efficacy and safety of liraglutide. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **97**, 27–42 [CrossRef Medline](#)
- Steensgaard, D. B., Thomsen, J. K., Olsen, H. B., and Knudsen, L. B. (2008) The molecular basis for the delayed absorption of the once-daily human GLP-1 analogue, liraglutide. *Diabetes* **57**, A164
- Wang, Y., Lomakin, A., Kanai, S., Alex, R., and Benedek, G. B. (2015) Transformation of oligomers of lipidated peptide induced by change in pH. *Mol. Pharm.* **12**, 411–419 [CrossRef Medline](#)
- Frederiksen, T. M., Sønderby, P., Ryberg, L. A., Harris, P., Bukrinski, J. T., Scharff-Poulsen, A. M., Elf-Lind, M. N., and Peters, G. H. (2015) Oligomerization of a glucagon-like peptide 1 analog: bridging experiment and simulations. *Biophys. J.* **109**, 1202–1213 [CrossRef Medline](#)
- Gupta, V. (2013) Glucagon-like peptide-1 analogues: an overview. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **17**, 413–421 [CrossRef Medline](#)
- Ryan, G. J., Foster, K. T., and Jobe, L. J. (2011) Review of the therapeutic uses of liraglutide. *Clin. Ther.* **33**, 793–811 [CrossRef Medline](#)
- Mezquita Raya, P., and Reyes García, R. (2014) Is treatment with liraglutide efficient? *Endocrinol. Nutr.* **61**, 202–208 [CrossRef Medline](#)
- Iacobellis, G., Mohseni, M., Bianco, S. D., and Banga, P. K. (2017) Liraglutide causes large and rapid epicardial fat reduction. *Obesity* **25**, 311–316 [CrossRef Medline](#)
- Bouchi, R., Nakano, Y., Fukuda, T., Takeuchi, T., Murakami, M., Minami, I., Izumiya, H., Hashimoto, K., Yoshimoto, T., and Ogawa, Y. (2017) Reduction of visceral fat by liraglutide is associated with ameliorations of hepatic steatosis, albuminuria, and micro-inflammation in type 2 diabetic patients with insulin treatment: a randomized control trial. *Endocr. J.* **64**, 269–281 [Medline](#)
- Biggaard, L. S., Bosteen, M. H., Fink, L. N., Sørensen, C. M., Rosendahl, A., Mogensen, C. K., Rasmussen, S. E., Rolin, B., Nielsen, L. B., and Pedersen, T. X. (2016) Liraglutide reduces both atherosclerosis and kidney inflammation in moderately uremic LDLr<sup>-/-</sup> mice. *PLoS One* **11**, e0168396 [CrossRef Medline](#)
- Peters, K. R. (2013) Liraglutide for the treatment of type 2 diabetes: a clinical update. *Am. J. Ther.* **20**, 178–188 [CrossRef Medline](#)
- Abou-Zied, O. K. (2015) Understanding the physical and chemical nature of the warfarin drug binding site in human serum albumin: experimental

- and theoretical studies. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 1800–1816 [CrossRef Medline](#)
15. Cho, H. J., Sohn, K. H., Park, H. M., Lee, K. H., Choi, B., Kim, S., Kim, J. S., On, Y. K., Chun, M. R., Kim, H. J., Kim, J. W., and Lee, S. Y. (2007) Factors affecting the interindividual variability of warfarin dose requirement in adult Korean patients. *Pharmacogenomics* **8**, 329–337 [CrossRef Medline](#)
  16. Jonas, D. E., and McLeod, H. L. (2009) Genetic and clinical factors relating to warfarin dosing. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 375–386 [CrossRef Medline](#)
  17. Rondeau, P., and Bourdon, E. (2011) The glycation of albumin: structural and functional impacts. *Biochimie* **93**, 645–658 [CrossRef Medline](#)
  18. Shaklai, N., Garlick, R. L., and Bunn, H. F. (1984) Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J. Biol. Chem.* **259**, 3812–3817 [Medline](#)
  19. Bai, X., Wang, Z., Huang, C., Wang, Z., and Chi, L. (2012) Investigation of non-enzymatic glycosylation of human serum albumin using ion trap time of flight mass spectrometry. *Molecules* **17**, 8782–8794 [CrossRef Medline](#)
  20. Fanali, G., di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., and Ascenzi, P. (2012) Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol. Aspects Med.* **33**, 209–290 [CrossRef Medline](#)
  21. Song, S. O., Hwang, Y. C., Ahn, K. J., Cha, B. S., Song, Y. D., Lee, D. W., and Lee, B. W. (2015) Clinical characteristics of patients responding to once-daily basal insulin therapy in Korean subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Ther.* **6**, 547–558 [CrossRef Medline](#)
  22. Jenkins, B. G. (1991) Detection of site-specific binding and co-binding of ligands to macromolecules using  $^{19}\text{F}$  NMR. *Life Sci.* **48**, 1227–1240 [CrossRef Medline](#)
  23. Jenkins, B. G., and Lauffer, R. B. (1990) Detection of site-specific binding and co-binding of ligands to human serum albumin using  $^{19}\text{F}$  NMR. *Mol. Pharmacol.* **37**, 111–118 [Medline](#)
  24. Dalvit, C., Fagerness, P. E., Hadden, D. T. A., Sarver, R. W., and Stockman, B. J. (2003) Fluorine-NMR experiments for high-throughput screening: theoretical aspects, practical considerations, and range of applicability. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7696–7703 [CrossRef Medline](#)
  25. Gerig, J. T. (2001) Fluorine NMR, University of California, Santa Barbara, CA
  26. Arntson, K. E., and Pomerantz, W. C. (2016) Protein-observed fluorine NMR: a bioorthogonal approach for small molecule discovery. *J. Med. Chem.* **59**, 5158–5171 [CrossRef Medline](#)
  27. Fielding, L. (2003) NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. *Curr. Top. Med. Chem.* **3**, 39–53 [CrossRef Medline](#)
  28. Pathe, J., Girard, D., Catan, A., Boyer, F., Dobi, A., Planesse, C., Diotel, N., Guerin-Dubourg, A., Baret, P., Bravo, S. B., Paradelo-Dobarro, B., Alvarez, E., Essop, M. F., Meilhac, O., Bourdon, E., and Rondeau, P. (2017) Diabetes-induced hepatic oxidative stress: a new pathogenic role for glycated albumin. *Free Radic. Biol. Med.* **102**, 133–148 [CrossRef Medline](#)
  29. Bhattacharya, A. A., Grüne, T., and Curry, S. (2000) Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J. Mol. Biol.* **303**, 721–732 [CrossRef Medline](#)
  30. Vlassara, H., and Bucala, R. (1996) Recent progress in advanced glycation and diabetic vascular disease: role of advanced glycation end product receptors. *Diabetes* **45**, S65–S66 [CrossRef Medline](#)
  31. Anguizola, J., Matsuda, R., Barnaby, O. S., Hoy, K. S., Wa, C., DeBolt, E., Koke, M., and Hage, D. S. (2013) Review: glycation of human serum albumin. *Clin. Chim. Acta* **425**, 64–76 [CrossRef Medline](#)
  32. 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 [CrossRef Medline](#)
  33. Mera, K., Fujiwara, Y., Otogiri, M., Sakata, N., and Nagai, R. (2008) Immunological detection of  $\text{N}^{\omega}$ -(carboxymethyl)arginine by a specific antibody. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1126**, 155–157 [CrossRef Medline](#)
  34. 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 [Medline](#)
  35. Suji, G., Khedkar, S. A., Singh, S. K., Kishore, N., Coutinho, E. C., Bhor, V. M., and Sivakami, S. (2008) Binding of lipoic acid induces conformational change and appearance of a new binding site in methylglyoxal modified serum albumin. *Protein J.* **27**, 205–214 [CrossRef Medline](#)
  36. Yamazaki, E., Inagaki, M., Kurita, O., and Inoue, T. (2005) Kinetics of fatty acid binding ability of glycated human serum albumin. *J. Biosci.* **30**, 475–481 [CrossRef Medline](#)
  37. Cao, B., Endsley, S., and Andersen, N. H. (2003)  $^{19}\text{F}$  NMR studies of tryptophan/serum albumin binding. *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 69–75 [CrossRef Medline](#)
  38. Digilio, G., Tuccinardi, T., Casalini, F., Cassino, C., Dias, D. M., Gerales, C. F., Catanzaro, V., Maiocchi, A., and Rossello, A. (2014) Study of the binding interaction between fluorinated matrix metalloproteinase inhibitors and human serum albumin. *Eur. J. Med. Chem.* **79**, 13–23 [CrossRef Medline](#)
  39. Kitamura, K., Omran, A. A., Takegami, S., Tanaka, R., and Kitade, T. (2007)  $^{19}\text{F}$  NMR spectroscopic characterization of the interaction of niflumic acid with human serum albumin. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 2843–2848 [CrossRef Medline](#)
  40. Shikii, K., Sakurai, S., Utsumi, H., Seki, H., and Tashiro, M. (2004) Application of the  $^{19}\text{F}$  NMR technique to observe binding of the general anesthetic halothane to human serum albumin. *Anal. Sci.* **20**, 1475–1477 [CrossRef Medline](#)
  41. Wu, D., Yan, J., Sun, P., Xu, K., Li, S., Yang, H., and Li, H. (2016) Comparative analysis of the interaction of capecitabine and gefitinib with human serum albumin using  $^{19}\text{F}$  nuclear magnetic resonance-based approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **129**, 15–20 [CrossRef Medline](#)
  42. Zhuang, J., Yang, D. P., Nikas, S. P., Zhao, J., Guo, J., and Makriyannis, A. (2013) The interaction of fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors with an anandamide carrier protein using  $^{19}\text{F}$ -NMR. *AAPS J.* **15**, 477–482 [CrossRef Medline](#)
  43. Knudsen, L. B., Nielsen, P. F., Huusfeldt, P. O., Johansen, N. L., Madsen, K., Pedersen, F. Z., Thøgersen, H., Wilken, M., and Agersø, H. (2000) Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *J. Med. Chem.* **43**, 1664–1669 [CrossRef Medline](#)
  44. Li, Y., Wang, Y., Wei, Q., Zheng, X., Tang, L., Kong, D., and Gong, M. (2015) Variant fatty acid-like molecules Conjugation, novel approaches for extending the stability of therapeutic peptides. *Sci. Rep.* **5**, 18039 [Medline](#)
  45. Madsen, K., Knudsen, L. B., Agersø, H., Nielsen, P. F., Thøgersen, H., Wilken, M., and Johansen, N. L. (2007) Structure-activity and protraction relationship of long-acting glucagon-like peptide-1 derivatives: importance of fatty acid length, polarity, and bulkiness. *J. Med. Chem.* **50**, 6126–6132 [CrossRef Medline](#)
  46. Sønderby, P., Harris, P., and Peters, G. H. J. (2016) Solution behaviour of human serum albumin and GLP-1 variants. Ph.D. thesis, DTU Chemistry, Kongens Lyngby, Denmark
  47. Kurtzhals, P., Havelund, S., Jonassen, I., Kiehr, B., Larsen, U. D., Ribel, U., and Markussen, J. (1995) Albumin binding of insulins acylated with fatty acids: characterization of the ligand-protein interaction and correlation between binding affinity and timing of the insulin effect *in vivo*. *Biochem. J.* **312**, 725–731 [CrossRef Medline](#)
  48. Peters, T., Jr. (1995) *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Elsevier, Amsterdam
  49. Kong, X., Ma, M. Z., Huang, K., Qin, L., Zhang, H. M., Yang, Z., Li, X. Y., and Su, Q. (2014) Increased plasma levels of the methylglyoxal in patients with newly diagnosed type 2 diabetes 2. *J. Diabetes* **6**, 535–540 [CrossRef Medline](#)
  50. Maessen, D. E., Stehouwer, C. D., and Schalkwijk, C. G. (2015) The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin. Sci.* **128**, 839–861 [CrossRef Medline](#)
  51. Thornalley, P. J. (2005) Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1043**, 111–117 [CrossRef Medline](#)
  52. Cantero, A. V., Portero-Otín, M., Ayala, V., Auge, N., Sanson, M., Elbaz, M., Thiers, J. C., Pamplona, R., Salvayre, R., and Nègre-Salvayre, A. (2007) Methylglyoxal induces advanced glycation end product (AGEs) formation and dysfunction of PDGF receptor- $\beta$ : implications for diabetic atherosclerosis. *FASEB J.* **21**, 3096–3106 [CrossRef Medline](#)

53. Rehman, M. T., Shamsi, H., and Khan, A. U. (2014) Insight into the binding mechanism of imipenem to human serum albumin by spectroscopic and computational approaches. *Mol. Pharm.* **11**, 1785–1797 [CrossRef](#) [Medline](#)
54. Anguizola, J., Debolt, E., Suresh, D., and Hage, D. S. (2016) Chromatographic analysis of the effects of fatty acids and glycation on binding by probes for Sudlow sites I and II to human serum albumin. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **1021**, 175–181 [CrossRef](#) [Medline](#)
55. Petitpas, I., Bhattacharya, A. A., Twine, S., East, M., and Curry, S. (2001) Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I. *J. Biol. Chem.* **276**, 22804–22809 [CrossRef](#) [Medline](#)
56. Berde, C. B., Hudson, B. S., Simoni, R. D., and Sklar, L. A. (1979) Human serum albumin: spectroscopic studies of binding and proximity relationships for fatty acids and bilirubin. *J. Biol. Chem.* **254**, 391–400 [Medline](#)
57. Simard, J. R., Zunszain, P. A., Ha, C. E., Yang, J. S., Bhagavan, N. V., Petitpas, I., Curry, S., and Hamilton, J. A. (2005) Locating high-affinity fatty acid-binding sites on albumin by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 17958–17963 [CrossRef](#) [Medline](#)
58. Garlick, R. L., and Mazer, J. S. (1983) The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo. *J. Biol. Chem.* **258**, 6142–6146 [Medline](#)
59. Savage, D. B., Petersen, K. F., and Shulman, G. I. (2007) Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol. Rev.* **87**, 507–520 [CrossRef](#) [Medline](#)
60. Peterson, G. E., and Pollom, R. D. (2010) Liraglutide in clinical practice: dosing, safety and efficacy. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.* 35–43 [Medline](#)
61. Bjerre Knudsen, L., Madsen, L. W., Andersen, S., Almholt, K., de Boer, A. S., Drucker, D. J., Gotfredsen, C., Egerod, F. L., Hegelund, A. C., Jacobsen, H., Jacobsen, S. D., Moses, A. C., Mølck, A. M., Nielsen, H. S., Nowak, J., *et al.* (2010) Glucagon-like peptide-1 receptor agonists activate rodent thyroid C-cells causing calcitonin release and C-cell proliferation. *Endocrinology* **151**, 1473–1486 [CrossRef](#) [Medline](#)
62. Alves, C., Batel-Marques, F., and Macedo, A. F. (2012) A meta-analysis of serious adverse events reported with exenatide and liraglutide: acute pancreatitis and cancer. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **98**, 271–284 [CrossRef](#) [Medline](#)
63. Chalmer, T., Almdal, T. P., Vilsbøll, T., and Knop, F. K. (2015) Adverse drug reactions associated with the use of liraglutide in patients with type 2 diabetes: focus on pancreatitis and pancreas cancer. *Expert Opin. Drug Saf.* **14**, 171–180 [CrossRef](#) [Medline](#)
64. Lau, J., Bloch, P., Schäffer, L., Pettersson, I., Spetzler, J., Kofoed, J., Madsen, K., Knudsen, L. B., McGuire, J., Steensgaard, D. B., Strauss, H. M., Gram, D. X., Knudsen, S. M., Nielsen, F. S., Thygesen, P., *et al.* (2015) Discovery of the once-weekly glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue semaglutide. *J. Med. Chem.* **58**, 7370–7380 [CrossRef](#) [Medline](#)
65. Rondeau, P., Singh, N. R., Caillens, H., Tallet, F., and Bourdon, E. (2008) Oxidative stresses induced by glycoxidized human or bovine serum albumin on human monocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 799–812 [CrossRef](#) [Medline](#)
66. Jovanović, V. B., Penezić-Romanjuk, A. Z., Pavičević, I. D., Aćimović, J. M., and Mandić, L. M. (2013) Improving the reliability of human serum albumin-thiol group determination. *Anal. Biochem.* **439**, 17–22 [CrossRef](#) [Medline](#)
67. Baraka-Vidot, J., Denemont, I., Ali Mcolo, Z., Bourdon, E., and Rondeau, P. (2015) Ammonium sulfate precipitation but not delipidation is a good method for human albumin preparation for biological studies. *Int. J. Diabetes Clin. Diagn.* **2**, 109
68. 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. *Clin. Chim. Acta* **127**, 87–95 [CrossRef](#) [Medline](#)
69. Paradela-Dobarro, B., Rodiño-Janeiro, B. K., Alonso, J., Raposeiras-Roubín, S., González-Peteiro, M., González-Juanatey, J. R., and Álvarez, E. (2016) Key structural and functional differences between early and advanced glycation products. *J. Mol. Endocrinol.* **56**, 23–37 [Medline](#)
70. Verdier, L., Gharbi-Benarous, J., Bertho, G., Evrard-Todeschi, N., Mauvais, P., and Girault, J.-P. (2000) Dissociation–equilibrium constant and bound conformation for weak antibiotic binding interaction with different bacterial ribosomes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **12**, 2363–2371

## ***Expérimentations associées à l'étude de la liaison albumine-liraglutide***

Les résultats valorisés dans l'article publié ont été obtenus par la technique RMN se basant sur la mesure du temps de relaxation transversal  $T_2$ . Avant d'aboutir à l'utilisation de cette méthode, nous avons commencé par d'autres approches, telles que la fluorescence, la dialyse à l'équilibre ou l'analyse d'autres paramètres RMN et enfin l'ITC. Un autre médicament, le détémir, analogue de l'insuline se liant également à l'albumine via un acide gras, a fait l'objet de notre étude initiale et a permis la mise au point des principales expérimentations qui nous ont amené à orienter notre projet vers l'étude du liraglutide. Ces démarches de recherches sont présentées dans la partie suivante.

### **1. Etude préliminaire sur l'insuline détémir et le liraglutide**

Le détémir, analogue de l'insuline, est le premier médicament sur lequel nous avons porté notre intérêt et qui a fait l'objet des premières études d'interaction avec l'albumine (par la méthode de quenching de fluorescence) ainsi que pour l'optimisation du protocole de marquage au fluor ( $^{19}\text{F}$ ).

#### ***a) Le quenching de fluorescence***

**Objectif :** La technique de quenching de fluorescence avait été initialement utilisée pour l'étude de l'interaction de l'insuline détémir avec l'albumine via l'acide myristique.

**Méthode :** Une titration de l'albumine à une concentration définie (50  $\mu\text{M}$ ) en présence de concentrations croissantes de détémir (de 0 à 400  $\mu\text{M}$ ) est effectuée. L'émission de fluorescence du complexe (détémir-albumine) est mesurée entre 250 et 500 nm (à une excitation de 280 nm). Afin de s'affranchir de l'émission de fluorescence intrinsèque du détémir en lien avec ses résidus tyrosine et ne garder que le signal provenant de l'albumine, les spectres de la gamme de détémir seul sont soustraits de ceux obtenus pour la titration.

**Résultats et interprétation :** Avec l'ajout de concentration croissante en ligand (le détémir), on observe une diminution de l'émission de fluorescence à 340 nm (fluorescence du Trp), mais aussi de l'émission de fluorescence à 280 nm qui correspond au pic de Rayleigh. Cette diminution du pic de Rayleigh suggère que le détémir absorbe dans une certaine proportion le faisceau d'excitation incident à 280 nm. La diminution observée de la fluorescence à 340 nm peut alors être due à la fois à l'absorption d'une partie du faisceau incident par le ligand et à une interaction

potentielle de celui-ci avec la protéine (Figure 54). Par conséquent, il apparaît donc difficile de déterminer la contribution de l'interaction entre la protéine et son ligand dans cette diminution de fluorescence.

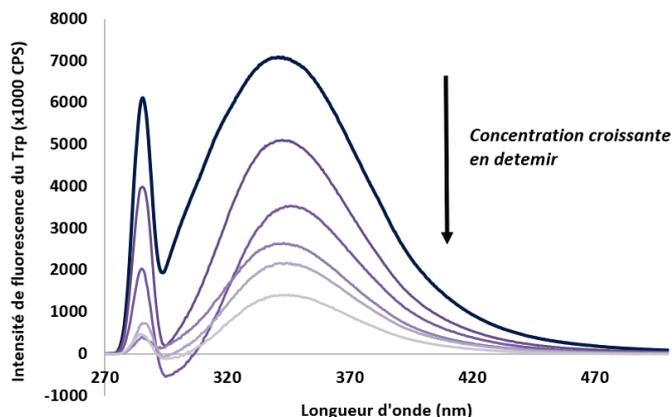


Figure 54 : Spectres d'émission de fluorescence de l'albumine humaine. Albumine (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{excit}} = 280 \text{ nm}$ ), en absence de détémir (courbe épaisse), et en présence de quantités croissantes de détémir (de 0 à 400  $\mu\text{M}$ ) (courbes en clair après soustraction du signal du détémir seul afin d'observer uniquement la contribution de l'albumine) le pic à 280 nm est le pic de Rayleigh, celui à 340 nm est le pic de fluorescence.

**Conclusion :** Cette technique, bien que pouvant être améliorée pour l'étude de l'interaction albumine – détémir en adaptant par exemple les concentrations ou les paramètres d'excitation, n'est pas applicable à l'étude d'interaction avec le liraglutide car ce dernier contient un résidu Trp dont le signal de fluorescence ne pourrait pas être distingué de celui de l'albumine.

#### **b) Le marquage du détémir et du liraglutide au $^{19}\text{F}$**

**Objectif :** Afin de pouvoir détecter le signal du ligand de manière spécifique par RMN, une étape de marquage au fluor ( $^{19}\text{F}$ ) est réalisée. Le détémir est utilisé pour l'optimisation du protocole de marquage qui sera ensuite adapté pour le liraglutide.

**Méthode :** La réaction de marquage utilisée avec le réactif S-éthyl-trifluorothioacétate (S-ETFA) correspond à une trifluoroacétylation sur les extrémités N-terminales des protéines. Un total de 50  $\mu\text{l}$  de réactif est ajouté progressivement à 1,5 ml de médicament brut (Levemir® ou Victoza®). La mise au point du protocole de marquage a initialement été réalisée sur le détémir (marquage réalisé sur le médicament brut ou préalablement dialysée, temps d'incubation et pH) ainsi que la détermination du tampon le plus adapté. Le détail du protocole finalement utilisé pour le liraglutide est décrit dans l'article. Les produits marqués sont ensuite analysés en RMN 1D du  $^{19}\text{F}$ , en utilisant les mêmes paramètres que ceux décrits dans l'article (à une température

de 25 °C avec 512 scans, un délai de relaxation de 7s et à une fréquence de 564,690823 MHz pour le Fluor-19).

**Résultats et interprétation :** Les spectres RMN  $^{19}\text{F}$  du liraglutide et du détémir marqués avec le S-ETFA présentent des signaux à -74,3 ppm et à -74,57 ppm respectivement. Le TFA (trifluoroacétate) correspond au produit d'hydrolyse du ligand fluoré et donne un signal à -74,43 ppm (Figure 55). Le détémir possède deux sites de marquages (les extrémités des deux chaînes de l'insuline) contrairement au liraglutide qui est monomérique. Ainsi l'intensité du signal du détémir est environ deux fois plus élevée que celle du liraglutide à concentration égale. Cependant, les deux groupements trifluorés du détémir apparaissent équivalents en RMN du  $^{19}\text{F}$ , c'est-à-dire qu'on ne distingue qu'un seul pic sur le spectre.

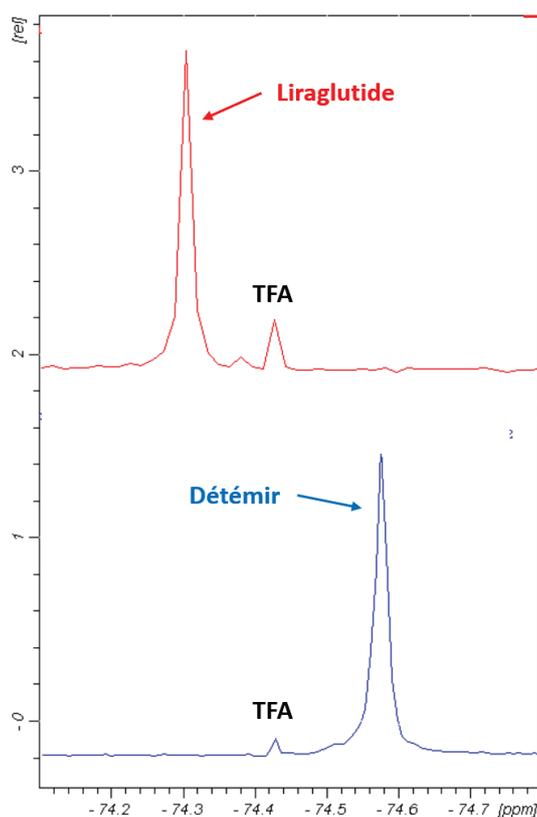


Figure 55 : Spectres RMN du  $^{19}\text{F}$  du liraglutide et du détémir.  
Signal  $^{19}\text{F}$  du liraglutide à -74,30 ppm (échelle d'intensité 1,7) et du détémir à -74,57 ppm (échelle d'intensité 1),  
le signal du produit d'hydrolyse du marquage, le TFA (trifluoroacétate) apparaît à -74,43 ppm.

Le liraglutide présente l'avantage technique de donner un seul type de produit marqué, et une dégradation plus homogène. Le détémir possède une structure plus sensible aux variations du milieu et précipite de manière importante lors de la réaction de marquage. Ce phénomène est moins marqué pour le liraglutide qui résiste mieux à cette étape. Des tests d'étude d'interaction

ont été réalisés par RMN avec le détémir avec des difficultés d'interprétation probablement dues à la présence d'un équilibre d'association-dissociation du détémir. Avec le liraglutide, plusieurs difficultés sont ainsi écartées. De surcroît, le détémir s'avérait de moins en moins prescrit au profit du liraglutide qui par conséquent, intéressait d'avantage les cliniciens. En conséquence, nous avons décidé de poursuivre nos travaux en nous focalisant plus particulièrement sur le liraglutide comme ligand d'étude.

De nouveaux essais ont permis d'optimiser le protocole de marquage existant, pour le liraglutide. Les conditions optimales de marquage ont été obtenues en maintenant le pH entre 9,6 et 9,7 durant toute la durée du marquage et en mélangeant les 10 µl de S-ETFA à 90 µl de tampon borate 100 mM (pH 10) juste avant l'ajout au milieu réactionnel afin d'éviter la création de microenvironnements acides susceptibles de déstabiliser la structure protéique.

**Conclusion :** L'optimisation du protocole de marquage du liraglutide au fluor est la première étape qui a ensuite permis la mise au point de la méthode d'étude des interactions par RMN du  $^{19}\text{F}$ . La suite de l'étude porte donc essentiellement sur le liraglutide, le détémir est parfois utilisé à titre de comparaison.

## 2. Recherche d'un témoin négatif n'interagissant pas avec les ligands d'étude

**Objectif :** Une protéine n'interagissant pas avec les ligands d'étude (essentiellement le liraglutide) a été recherchée dans un premier temps afin d'être utilisée comme témoin négatif pour l'étude des interactions par RMN. L'absence d'interaction équivaut dans notre cas à une absence de modification du signal en RMN  $^{19}\text{F}$  du liraglutide marqué.

**Méthode :** Les paramètres RMN utilisés ici pour les expériences 1D en  $^{19}\text{F}$  sont les mêmes que ceux indiqués dans l'article (température de 25 °C avec 512 scans, un délai de relaxation de 7s et à une fréquence de 564,690823 MHz pour le Fluor-19). Les protéines sont utilisées à une concentration de 50 µM chacune. Le signal RMN du liraglutide ou du détémir est mesuré seul puis en mélange équimolaire avec la protéine testée. La variation du signal fluor du médicament marqué indique une interaction probable avec la protéine présente.

## Résultats et interprétation :

### a) Le lysozyme et l'avidine induisent la précipitation du liraglutide

Des tests réalisés avec le lysozyme et l'avidine en mélange équimolaire, ont montré que le liraglutide précipite en présence de chacune de ces protéines (protéines préalablement préparées dans le même tampon borate). Cette précipitation est directement détectée par une observation visuelle et se traduit par la disparition du signal fluor du liraglutide comme mis en évidence sur les spectres RMN du  $^{19}\text{F}$  (Figure 56).

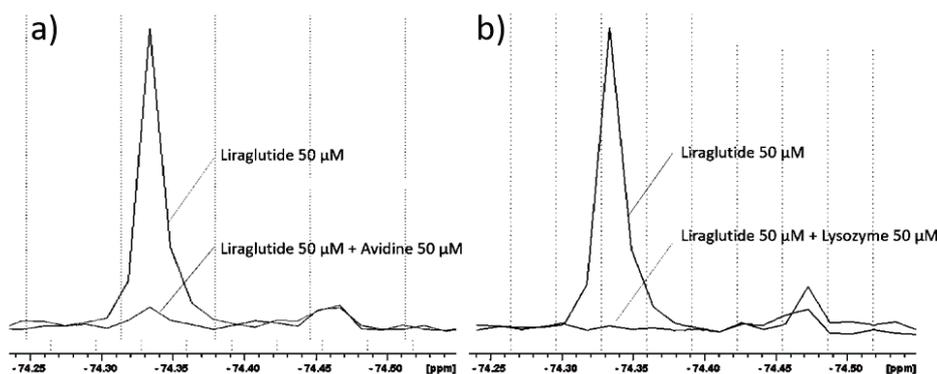


Figure 56 : Analyse RMN de l'interaction du liraglutide avec l'avidine et le lysozyme. Spectre RMN du  $^{19}\text{F}$  du liraglutide marqué seul ou en mélange avec l'avidine (a) ou le lysozyme (b) (tampon borate). Une disparition du signal due à la précipitation lors du mélange est observée dans les deux cas.

### b) La $\beta$ -lactoglobuline A n'interagit pas avec le détémir mais avec le liraglutide

Le mélange équimolaire avec la  $\beta$ -lactoglobuline A induit des modifications dans le signal fluor du liraglutide mais pas dans celui du détémir (Figure 57). La  $\beta$ -lactoglobuline A semble donc interagir avec le liraglutide.

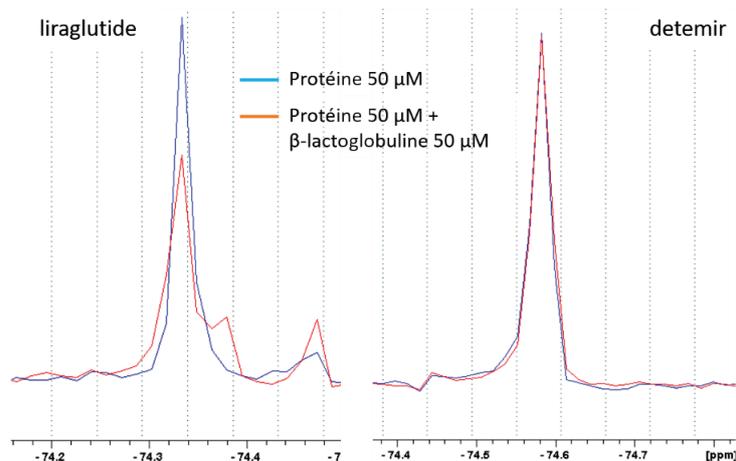


Figure 57 : Analyse de l'interaction du liraglutide et du détémir avec la  $\beta$ -lactoglobuline A. Spectres RMN  $^{19}\text{F}$  du liraglutide et du détémir, seuls ou en mélange avec la  $\beta$ -lactoglobuline A.

**Conclusion :** Un témoin négatif valide (la  $\beta$ -lactoglobuline A) a été identifié pour le détémir, démontrant qu'en absence d'interaction, le signal du ligand fluoré n'est pas affecté par la présence d'une protéine. De manière surprenante, toutes les protéines testées interfèrent avec le liraglutide, entraînant notamment sa précipitation. Ce phénomène n'a cependant pas été observé au cours de l'étude d'interaction entre le liraglutide et l'HSA.

### 3. Autres approches expérimentales utilisées pour l'étude d'interaction

Plusieurs autres méthodologies ont été utilisés pour étudier l'interaction de l'albumine avec le liraglutide comme la dialyse à l'équilibre, la méthode FAXS (RMN) ou l'ITC.

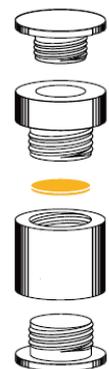
#### a) La dialyse à l'équilibre

##### i. Expérimentations sur le liraglutide

**Objectif :** La dialyse à l'équilibre a été utilisée pour l'étude de l'interaction de l'albumine avec le liraglutide. Cette méthode ne nécessite pas de marquage et permet une mesure d'affinité en déterminant les concentrations en ligands libres et liés à l'état d'équilibre de part et d'autre d'une membrane semi-perméable.

**Méthode :** Un dispositif comportant 2 compartiments identiques séparés par une membrane de dialyse de 15 kDa (Micro-Equilibrium DIALYZER™ (25-500 $\mu$ l) Harvard apparatus). Le liraglutide (3751 Da), placé dans un des compartiments peut à priori traverser librement la membrane, contrairement à l'albumine, de taille moléculaire trop importante (66 kDa) qui reste dans l'autre compartiment. Lorsque l'équilibre est atteint, après une incubation sous agitation durant au moins 2 heures, la différence de concentration en liraglutide par rapport à l'état initial est déterminée par mesure d'absorbance à 280 nm ( $\epsilon = 1,99 \text{ g}^{-1} \cdot \text{l}$ ). Pour des concentrations faibles en dessous de 10  $\mu$ M, les teneurs en liraglutide sont évaluées par fluorescence du tryptophane (excitation à 280 nm et émission à 340 nm).

2-Chamber System



[www.nestgrp.com](http://www.nestgrp.com)

**Résultats et interprétation :** Les premiers tests avec le liraglutide seul (sans HSA) ont montré que le médicament ne traversait pas la membrane de dialyse. Nous avons en parallèle testé plusieurs autres molécules pour vérifier le bon fonctionnement du dispositif de dialyse : une petite molécule, la vitamine B12 comme contrôle positif (masse molaire < 15 kDa) ; une grosse protéine, la papaïne (P4762 SIGMA) comme contrôle négatif (masse molaire > 15kDa) ; l'Aprotinine (28403841E GE Healthcare kit) comme molécule de masse intermédiaire.

Le tableau suivant indique les pourcentages de chaque composé testé, présents dans le compartiment 1 (compartiment initial) et le compartiment 2 après 6 heures d'incubation à 25°C.

Composé testé	Compartiment 1	Compartiment 2
Vitamine B12 (1,36 kDa)	50,7 %	49,3 %
Papaïne (21 kDa)	76 %	24 %
Aprotinine (6,5 kDa)	78 %	12 %
Liraglutide 100 µM (3,751 kDa)	100 %	0 %

*Tableau 4 : Résultats de la dialyse à l'équilibre pour différents composés. Proportion à l'état final des composés testés dans chaque compartiment après la dialyse à l'équilibre (membrane de dialyse de 15 kDa MW CUT OFF).*

La vitamine B12 s'équilibre correctement de part et d'autre de la membrane (50.7% / 49.3%), attestant du bon fonctionnement du système de dialyse. Par contre, la papaïne traverse partiellement la membrane (76% / 24%). Ce qui peut s'expliquer probablement par un seuil de coupure de la membrane (15 kDa) trop proche de la masse moléculaire de la papaïne.

Etonnamment, l'aprotinine, protéine de faible masse moléculaire, ne s'est pas équilibrée comme pouvait le laisser supposer sa petite taille (78% / 12%). Cette absence d'équilibre, s'explique par une oligomérisation de la protéine en solution [346]. Enfin, le liraglutide semble ne pas traverser la membrane (100% / 0%). L'équilibre des concentrations ne s'établit ainsi réellement que pour de très petites molécules qui n'ont pas tendance à s'oligomériser, comme la vitamine B12.

Les données de la littérature avaient déjà mis en évidence les propriétés d'oligomérisation du liraglutide. La taille de ces oligomères varie selon les conditions du milieu, en particulier du pH. En effet, les unités de liraglutide s'associent en dodécamères (pH < 7), en octamères et heptamères (pH > 7) ou en hexamères (pH 8) [347, 348]. Nos expériences ont été réalisées à un pH voisin de 8 correspondant au pH initial du médicament dans son conditionnement en stylo ([www.novonordisk.com](http://www.novonordisk.com)). Nous avons au départ émis l'hypothèse qu'il existait un équilibre entre monomères et oligomères dans une solution de liraglutide et que cet équilibre permettait un passage de molécules de part et d'autre de la membrane de dialyse. Nos expériences suggèrent cependant que le liraglutide apparaît peu stable sous forme monomérique, et existe en solution presque exclusivement sous forme oligomérique.

Des concentrations décroissantes de liraglutide ont ensuite été utilisées afin de déterminer si la dilution pouvait dissocier plus facilement les oligomères et influencer l'état d'équilibre final de la dialyse. Les dialyseurs sont incubés sous agitation pendant 24h, temps relativement long, considéré comme suffisant pour atteindre l'équilibre. Nous avons ainsi observé que plus les

concentrations initiales sont faibles, plus on s'approche de l'équilibre des concentrations entre les deux compartiments à la fin de la dialyse. Le liraglutide à 50  $\mu\text{M}$  donne un équilibre à environ 10% tandis qu'à 50 nM cet équilibre atteint 90% (Figure 58). Cependant, cette dernière concentration apparaît trop faible pour être utilisée dans l'étude de l'interaction avec l'albumine.

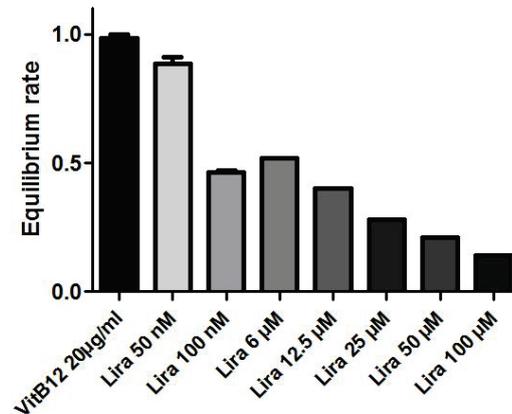


Figure 58 : Dialyse à l'équilibre pour le liraglutide.  
Taux d'équilibre dans les dialyseurs pour différentes concentrations en liraglutide. Le taux d'équilibre est le rapport de la concentration mesurée dans le compartiment 2 par la concentration théorique.

Une autre solution a été envisagée en augmentant la taille du seuil de coupure (cutOff) de la membrane de dialyse jusqu'à 50 kDa, taille limite permettant de maintenir l'albumine dans un seul compartiment. Cette membrane n'a cependant pas permis d'obtenir l'équilibre des concentrations, l'agrégation des molécules de liraglutide étant difficilement maîtrisable. D'autres paramètres tels que l'effet de la température, du tampon, de la teneur en sel, et du pH sur l'équilibre final ont été évalués mais aucune des conditions testées n'a donné de résultat satisfaisant pour l'amélioration du protocole de dialyse à l'équilibre.

**Conclusion :** En raison des phénomènes d'oligomérisation du liraglutide, la méthode de la dialyse à l'équilibre ne semble pas adaptée pour ce peptide et a été finalement abandonnée. Toutefois, des analyses complémentaires ont été réalisées sur le liraglutide afin de déterminer son état d'oligomérisation.

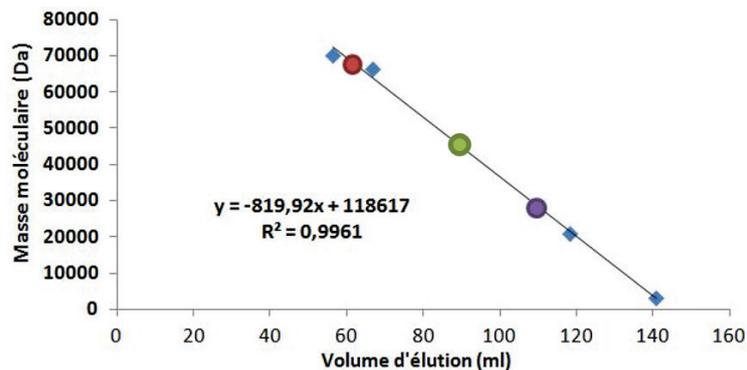
## ii. Etude de l'état d'oligomérisation du liraglutide

**Objectif :** Afin de mieux comprendre et d'interpréter les résultats obtenus lors de la dialyse à l'équilibre, nous avons déterminé les masses apparentes du liraglutide en utilisant deux méthodes différentes : la chromatographie d'exclusion (ou gel filtration) et la diffusion dynamique de la lumière DLS (dynamic light scattering).

## – La chromatographie d'exclusion

**Méthode :** Cette méthode permet la séparation des molécules d'un mélange selon leur taille en les faisant passer à travers une colonne remplie d'une résine comportant des pores de différentes tailles. Les molécules les plus grosses sont éluées en premier. Dans le domaine de fractionnement de la colonne, le volume de rétention est proportionnel à la masse moléculaire. En utilisant des molécules standards de masse moléculaire connue qui permettent le tracé d'une droite d'étalonnage, on peut alors estimer la taille d'une molécule d'après son volume d'éluion ( $V_e$ ). Les résines Sephacryl S-100 (1000 à 100 000 Da), Toyopearl HW-55 (1000 à 700 000 Da) et Superdex G-75 (3000-70 000 Da) ont été testées. Les deux premières résines, n'ont pas permis d'obtenir une courbe d'étalonnage assez précise, étant donné leur large domaine de fractionnement. La chromatographie a été finalement réalisée sur la colonne précoulée Superdex G-75 (3000-70 000 Da) à un débit de 1 ml/min. Afin d'éviter les interactions non spécifiques des protéines standards avec la résine, 250 mM de NaCl est ajouté au tampon borate 50 mM, pH 7,5. Les standards utilisés sont : le Bleu de Dextran (volume mort : 2000 kDa), la BSA (66,4 kDa), la papaïne (21 kDa) et la vitamine B12 (volume d'éluion maximal : 3 kDa).

**Résultats et interprétation :** La droite d'étalonnage de la chromatographie d'exclusion réalisée à partir des standards ainsi que la position du liraglutide pour les différentes conditions est présenté sur la *Figure 59* permet d'obtenir les correspondances entre volumes d'éluion et masse moléculaire apparent pour le liraglutide (*Tableau 5*).



*Figure 59 : Analyse des résultats de la chromatographie d'exclusion pour le liraglutide. (Colonne Superdex G-75). Le volume d'éluion du liraglutide pour différentes conditions est indiqué par les points rouge ( $V_e=64,5$  ml pour  $200 \mu\text{M}$ ), violet ( $V_e=110$  ml pour  $200 \mu\text{M}$  avec NaCl 250 mM) et vert ( $V_e=89$  ml pour  $1\text{mM}$ ).*

Conditions :	sans NaCl	avec NaCl 250 mM
Volume d'élution liraglutide 200 µM	110 ml => 68 kDa = 18 monomères	64,5 ml => 30 kDa = 8 monomères
Volume d'élution liraglutide 1 mM	(ND)	89 ml => 45 kDa = 12 monomères

Tableau 5 : Analyse des résultats de la chromatographie d'exclusion du liraglutide. Volumes d'élutions et masses moléculaires correspondantes sur colonne Superdex G-75 à 1 ml/min pour le liraglutide en tampon borate 50 mM pH 7,5.

La chromatographie d'exclusion du liraglutide (500 µl à 200 µM) est réalisée avec et sans NaCl dans le tampon borate. Chaque profil présente un pic unique avec des  $V_e$  de 110 ml et 64,5 ml respectivement. L'analyse de ces résultats montre qu'en absence de NaCl dans le tampon, le liraglutide présente une masse moléculaire apparente voisine de 68 kDa, correspondant probablement à des agrégats de 18 monomères ou de 3 hexamères. En revanche, en présence de NaCl, le liraglutide formerait plutôt des octamères (masse moléculaire estimée de 30 kDa). Il semble donc que le NaCl favorise la dissociation des agrégats. En augmentant la quantité de liraglutide en présence de NaCl (500 µl à 1 mM), on obtient un résultat différent : un  $V_e$  de 89 ml correspondant à une masse moléculaire apparente de 45 kDa, correspondant potentiellement à une forme dodécamérique.

**Conclusion :** L'analyse par chromatographie montre que le liraglutide se retrouve principalement sous forme d'oligomères. L'assemblage varie entre des formes octamérique et dodécamérique selon les conditions. Il semble que des formes agrégées soient favorisées en absence de sel. L'ensemble de ces résultats montrent que la présence de NaCl ainsi que la concentration en protéine modifient l'état d'oligomérisation du liraglutide.

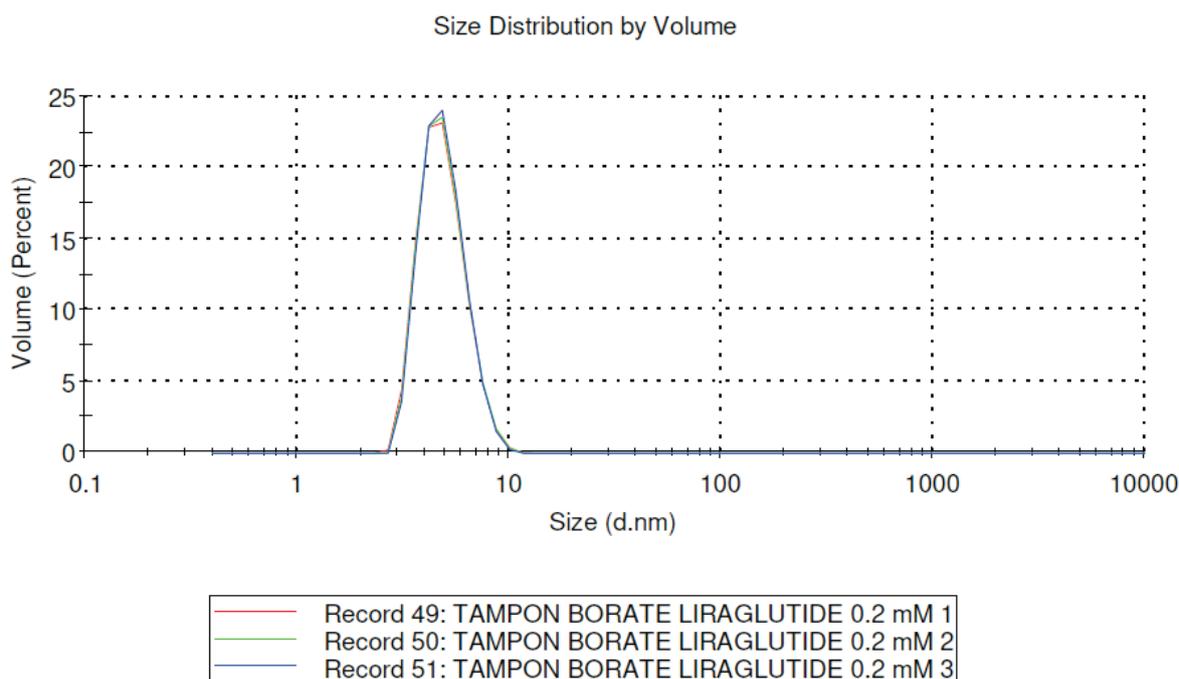
#### – La diffusion dynamique de la lumière

**Méthode :** La diffusion dynamique de la lumière est une technique spectroscopique permettant d'estimer la taille des particules grâce à la mesure du diamètre hydrodynamique. Elle se base sur la diffusion de la lumière laser due au mouvement brownien des particules. Elle permet aussi de déterminer la distribution de la taille des molécules présentes dans un mélange, entre 0,5 nm et 6 µm. Pour des protéines globulaires, une correspondance avec la masse moléculaire peut être établie en utilisant la formule suivante :

$$R_G^3 = \frac{M[\eta]}{\phi'}$$

$R_G$  est le rayon de giration,  $M$  est la masse moléculaire de la particule,  $[\eta]$  est la viscosité intrinsèque en  $\text{cm}^3/\text{g}$  et la constante  $\Phi' = 3,1 \cdot 10^{24}$ . Le rayon hydrodynamique  $R_H \times 0.774 \approx R_G$ .

**Résultats et interprétation :** Le spectre DLS du liraglutide présente un pic principal correspondant à un diamètre hydrodynamique moyen de  $5,4 (\pm 0,4)$  nm (*Figure 60*) et dont l'analyse donne une masse approximative est de 31,5 kDa, ce qui indique la présence d'une forme octamérique du liraglutide en solution. L'absence sur le spectre DLS de la forme agrégée de 68 kDa de la protéine, qui avait été observée en gel filtration (en absence de NaCl) pourrait s'expliquer par différentes hypothèses : d'une part, la filtration de l'échantillon préalablement à la mesure par DLS a pu éliminer d'éventuels agrégats. D'autre part, l'interaction de la protéine avec la résine en gel filtration s'effectue sur une échelle de temps différente de la mesure par DLS. En effet, contrairement à la DLS, l'analyse par la méthode chromatographique est effectuée sur une plus longue durée plus longue au cours de laquelle peuvent se produire des phénomènes d'association et de dissociation.



*Figure 60 : Spectre DLS du liraglutide.  
Le liraglutide à  $200 \mu\text{M}$  en tampon borate ( $50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7,5$ ) (triplicata)*

**Conclusion :** L'analyse par DLS indique une forme principalement octamérique du liraglutide en tampon borate. En comparaison avec l'analyse par chromatographie d'exclusion, il semble que la concentration en protéines et en sel module l'état d'oligomérisation du liraglutide mais que celui soit relativement homogène pour une condition donnée.

## ***b) Autres méthodes basées sur la RMN pour l'étude de l'interaction***

**Objectif :** L'étude des interactions par la technique RMN peut se baser sur différentes approches qui permettent d'évaluer la variation d'un paramètre donné entre le signal de la forme libre de la molécule détectée (ici le ligand) et celui de sa forme liée (complexe protéine-ligand). L'objectif est de déterminer la méthode et le paramètre le mieux adapté afin d'étudier l'interaction albumine-liraglutide et de déterminer des constantes de liaison. L'objectif final étant l'évaluation de l'effet de la glycation de l'albumine sur cette interaction, il convient de pouvoir estimer et comparer les affinités albumine-liraglutide de manière relativement précise.

### ***i. Détermination des IC50 en titrage classique***

**Méthode :** Le titrage classique en RMN du fluor est le premier protocole que nous avons appliqué. Le paramètre mesuré est dans ce cas l'intensité du signal de la molécule marquée, qui diminue lors de la liaison à la protéine. Cette diminution d'intensité est essentiellement due à la diminution importante du temps de relaxation T2 dans la forme liée (liée à la contribution de l'anisotropie de déplacement chimique élevée du fluor-19) et à l'échange entre les formes liée et non liée [334].

La titration classique par RMN 1D du  $^{19}\text{F}$ , consiste en la mesure du signal fluor du liraglutide marqué à une concentration fixe de 100  $\mu\text{M}$ , en présence de concentrations croissantes d'albumine de 0 à 300  $\mu\text{M}$ . Les titrations sont réalisés avec l'albumine délipidée (FA Free) commerciale non glyquée (HSA G0), glyquée avec 100 mM de glucose pendant 3 semaines (HSA G100), glyquée avec 10 mM de méthylglyoxal sur 48h (HSA MGO), et l'albumine non délipidée commerciale (HSA G0).

Pour chaque titration, nous avons déterminé des valeurs d'IC50 (concentration inhibitrice à 50% du maximum), c'est-à-dire les concentrations en HSA correspondant à la moitié de la diminution de l'intensité maximale du signal  $^{19}\text{F}$  du ligand. Ces valeurs sont rapportées à la concentration en liraglutide et sont donc exprimées en IC50 relative. Bien que l'affinité et l'IC50 soit liés, les formules existantes ne sont applicables qu'au cas des inhibiteurs enzymatiques (lorsque l'on mesure les produits formés par une réaction catalytique).

**Résultats et interprétation :** Le signal du liraglutide est diminué en présence d'albumine, ce qui indique que nous avons bien une interaction de ces deux molécules (*Figure 61*).

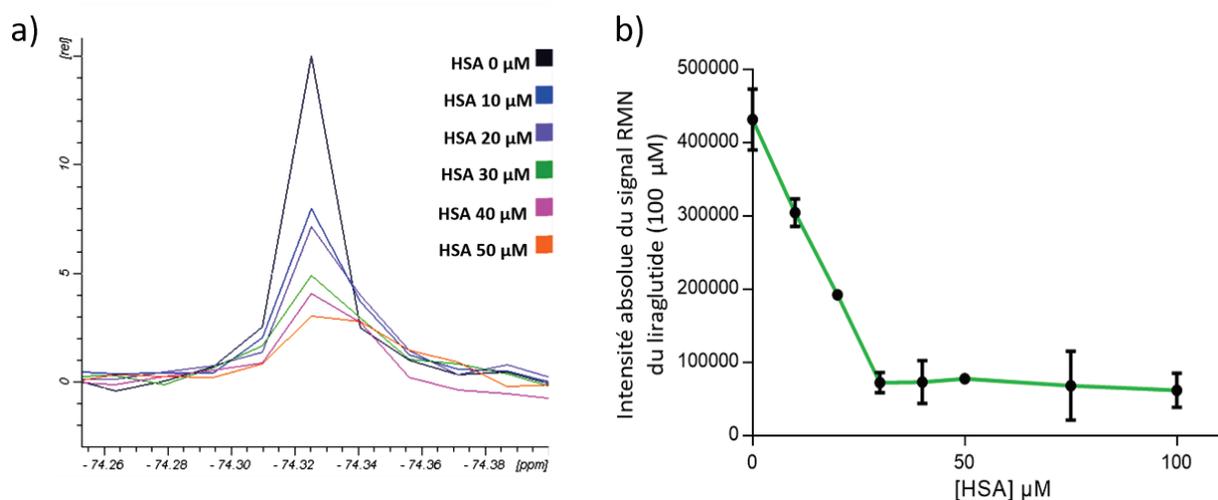


Figure 61 : Titration du liraglutide marquée au <sup>19</sup>F avec l'albumine humaine G0 délipidée.  
 (a) Spectre du liraglutide marqué au <sup>19</sup>F en présence de concentrations croissantes d'albumine  
 (b) Courbe de l'intensité du signal <sup>19</sup>F du liraglutide en fonction de la concentration en albumine (n=2).

La valeur d'IC50 relative est significativement plus élevée pour la HSA G100 ( $0,243 \pm 0,017$ ) et apparaît considérablement augmentée pour la HSA MGO ( $1,623 \pm 0,005$ ) comparée à l'albumine témoin G0 ( $0,153 \pm 0,039$ ). Cette valeur est légèrement plus faible pour l'albumine délipidée ( $0,205 \pm 0,045$ ). (Figure 62).

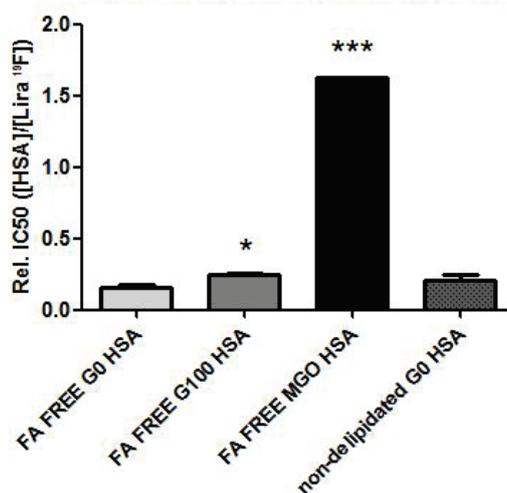


Figure 62 : Analyse de l'interaction albumine-liraglutide par titration en RMN.  
 Effet de la glycation sur les valeurs d'IC50 relative pour le titrage du liraglutide à 100 μM par l'albumine humaine délipidée glyquée (G100 et MGO) et non glyquée (G0) et l'albumine non-délipidée. \* Test de Student non apparié, comparaison avec la première colonne, p-value=0,039, n=3 ; \*\*\* Test de Student non apparié, comparaison aux colonnes 1 et 2 individuellement p-value<0,0001, n=3.

Plus la valeur de l'IC50 est élevée, plus la quantité d'albumine nécessaire pour lier le liraglutide est importante et donc plus l'affinité est faible. Ces résultats indiquent donc, de façon qualitative,

une diminution de l'affinité de l'albumine pour le liraglutide lorsque celle-ci est glyquée, cette altération étant beaucoup plus marquée dans le cas d'une glycation par le méthylglyoxal.

On peut par ailleurs remarquer que la délipidation de l'albumine semble légèrement augmenter l'affinité mais la différence n'est pas significative. Cependant, ce dernier résultat est cohérent avec l'hypothèse d'une compétition entre les acides gras et le détémir pour la liaison sur certains sites de l'albumine.

**Conclusion :** Le titrage classique en RMN du  $^{19}\text{F}$ , bien que non exploitable pour une mesure d'affinité ( $K_d$  ou  $K_a$ ), peut cependant fournir des données comparatives entre nos albumines glyquées et non glyquées. Ainsi, les mesures d'IC50 montrent une altération de la liaison albumine-liraglutide lorsque l'albumine est glyquée. D'un point de vue qualitatif, ces résultats sont en cohérence avec ceux obtenus par la méthode RMN utilisant le taux de décroissance du T2, présenté dans l'article (*J Biol Chem. 2018 Mar 30;293(13):4778-4791*). Toutefois, il apparaît une différence quantitative marquée entre G100 et MGO par rapport aux résultats publiés.

#### *ii. La compétition par RMN du $^{19}\text{F}$ : adaptation de la méthode FAXS*

**Méthode :** Une variante de la méthode FAXS développée par Claudio Dalvit et ses collaborateurs [339] a été appliquée à l'étude de l'interaction albumine-liraglutide en utilisant le liraglutide marqué comme molécule espion. L'albumine et le liraglutide sont mis en solution à des concentrations permettant un signal minimal du ligand, c'est-à-dire pour que le maximum de ligand soit sous forme liée. Une réapparition du signal fluor du liraglutide a lieu au fur et à mesure de l'ajout du ligand compétiteur qui déloge le ligand marqué déjà fixé à l'albumine (*Figure 63*). L'IC50 est défini comme la concentration en ligand non marquée induisant une augmentation du signal du ligand marquée de 50 % de la valeur maximale atteinte à la fin de l'expérience.

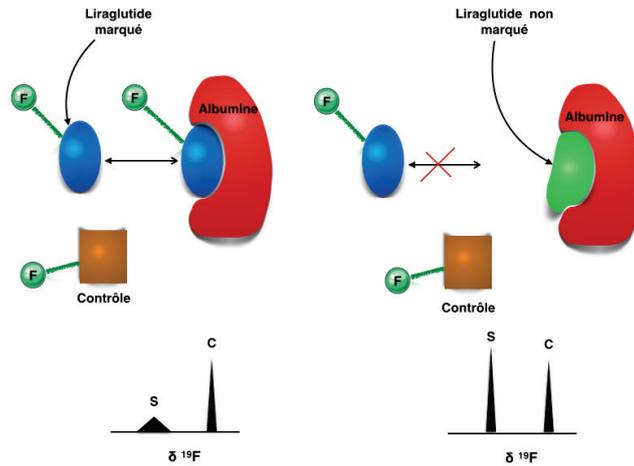


Figure 63 : Application de la méthode FAXS à l'étude de la liaison albumine-liraglutide (adapté de [334]).

**Résultats et interprétation :** Les courbes brutes et les IC50 obtenus pour le liraglutide sont présentés sur la Figure 64. L'évolution relative de l'intensité du signal fluor avec l'ajout du liraglutide non marqué est représentée pour l'albumine délipidée G0 et G100 ainsi que pour l'albumine non délipidée G0. On observe une augmentation progressive de l'intensité du signal  $^{19}\text{F}$  du liraglutide par rapport à la valeur initiale avec un plateau atteint pour l'ajout d'environ 500  $\mu\text{M}$  de liraglutide non marqué.

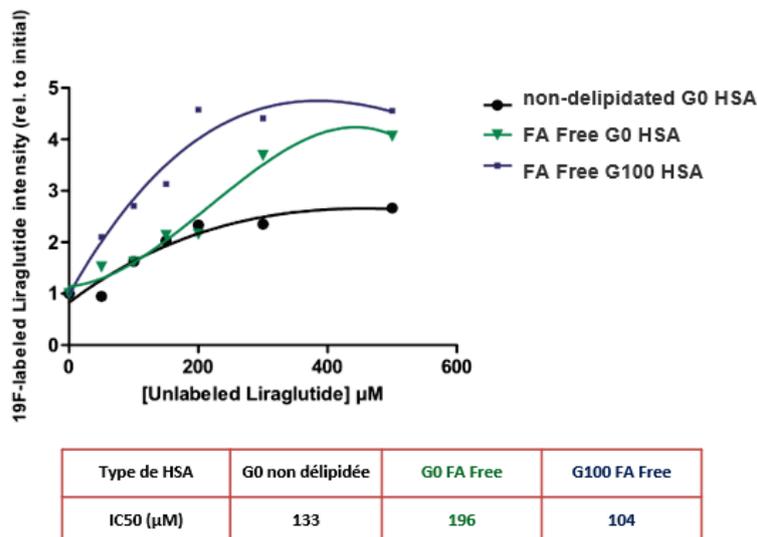


Figure 64 : Analyse de l'interaction albumine-liraglutide par compétition (FAXS).  
Courbes de compétition pour les albumines G0 et G100 avec le tableau des valeurs d'IC50 correspondantes (n=1).

Dans le cas d'une expérience de compétition, une augmentation de l'IC50 mesuré correspond à une augmentation de l'affinité. La comparaison des valeurs d'IC50 déduites de ces courbes

confirme les résultats du titrage classique précédent, montrant dans l'ordre une affinité décroissante pour les albumines G0 délipidée, G0 non délipidée et G100, confirmant un effet néfaste de la glycation mais également une influence de la présence d'acides gras sur la liaison de l'albumine au liraglutide.

L'utilisation de cette méthode n'a cependant pas permis de déterminer les constantes d'affinité et cela pour plusieurs raisons :

- 1) les molécules contrôles testées présentaient une variation d'intensité de signal importante en présence d'albumine (tel que le TFA, ayant une interaction probable avec l'albumine) ou une forte volatilité (trifluorométhane). L'intensité du signal de la molécule contrôle est nécessaire pour déterminer les variations du signal qui ne sont pas dues à l'interaction, et s'avère donc indispensable à la détermination des constantes d'affinité.
- 2) la méthode nécessite une approximation préalable de la constante d'affinité, les concentrations saturantes initiales en liraglutide et en albumine sont difficiles à déterminer et varient en fonction du degré de glycation de l'albumine.
- 3) la méthode est limitée dans le cas de l'existence de plusieurs sites de liaison.

**Conclusion :** Les méthodes de titration classique et de compétition donnent des valeurs d'IC50 apportant des résultats concordants et permettent une étude comparative. Elles montrent que la glycation induit une altération de l'affinité de l'albumine pour le liraglutide. Les acides gras semblent également diminuer cette affinité. En effet, la compétition entre le liraglutide et les acides gras sur certains des sites de liaison des acides gras est très probable, puisque le liraglutide se lie à l'albumine via son acide palmitique.

### *iii. Les mesures de diffusion, et de temps de relaxation*

**Méthode :** Deux autres méthodes se basant sur la mesure de paramètres en RMN du  $^{19}\text{F}$  ont été utilisées pour l'étude de l'interaction. La première se base sur la mesure des coefficients de diffusion (DOSY). La deuxième méthode est la mesure des temps de relaxation longitudinale  $T_1$  (séquence d'impulsion  $t_{1ir}$  ( $T_1$  Inversion-Recovery)) et temps de relaxation transversale  $T_2$  (séquence d'impulsion cpmg). Des concentrations croissantes d'HSA sont ajoutées au liraglutide marqué (100  $\mu\text{M}$ ) afin d'observer la variation des différents paramètres.

**Résultats et interprétation :** Le coefficient de diffusion du liraglutide à 100  $\mu\text{M}$  varie peu en présence d'HSA pour des concentrations inférieures à 20  $\mu\text{M}$  (Figure 65a). Il en est de même

pour le temps de relaxation longitudinale  $T_1$  qui apparaît relativement stable jusqu'à 6  $\mu\text{M}$  d'albumine (Figure 65b). En revanche, le temps de relaxation transversale  $T_2$  diminue d'une manière régulière lors de l'ajout d'HSA de 2 à 8  $\mu\text{M}$  (Figure 65b).

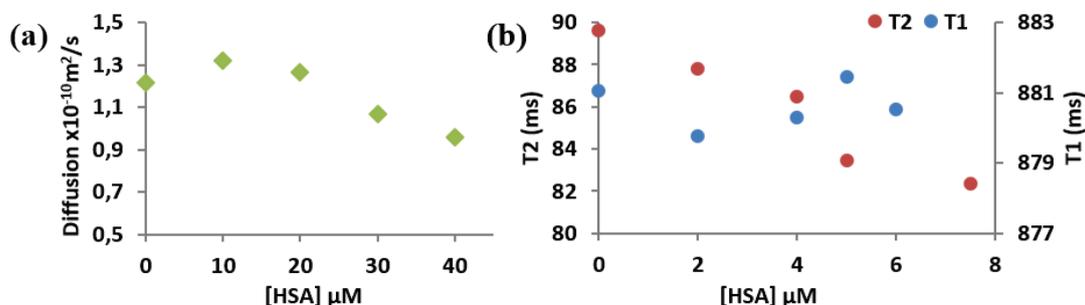


Figure 65 : Paramètres du signal RMN  $^{19}\text{F}$  du liraglutide en présence d'albumine. Variation du coefficient de diffusion (a) des temps de relaxation longitudinale et transversale (b) du liraglutide marquée à 100  $\mu\text{M}$  en RMN du  $^{19}\text{F}$  avec des concentrations croissantes d'HSA délipidée non glyquée.

La variation des coefficients de diffusion et des temps de relaxation  $T_1$  du liraglutide marqué en présence d'HSA n'est pas assez marquée pour une détermination précise des constantes d'affinité. Cela signifie que ces paramètres ne varient pas suffisamment entre la forme libre du liraglutide et sa forme liée à l'albumine. En revanche, les mesures de temps de relaxation transversale  $T_2$  par la méthode cpmg offrent une plage de variation permettant suivre clairement l'évolution de la titration. C'est donc le temps de relaxation transversale  $T_2$  qui a été retenue comme paramètre pour les mesures d'interaction.

**Conclusion :** Parmi les méthodes de mesure d'affinité basées sur la mesure par RMN de la diffusion ou de la relaxation du ligand, la méthode du taux de décroissance du  $T_2$  a été retenue et mise en œuvre telle que décrite par l'équipe de Verdier [341]. L'application de cette méthode pour le liraglutide marqué au  $^{19}\text{F}$  a permis l'obtention des résultats présentés dans l'article (*J Biol Chem.* 2018 Mar 30;293(13):4778-4791).

### c) La titration microcalorimétrique isotherme

**Objectif :** La méthode ITC a été utilisée dans le but de compléter nos résultats obtenus par RMN, en réalisant des mesures d'interaction entre le liraglutide marqué ou non marqué et l'albumine afin de confirmer que le marquage du liraglutide n'altère pas ses propriétés de liaison avec l'albumine (G0 délipidée).

**Méthode :** L'albumine humaine (80  $\mu\text{M}$ ) dans la cellule (250  $\mu\text{l}$ ) est titrée par 18 injections de 2  $\mu\text{l}$  (précédée d'une 1<sup>ère</sup> injection de 0,4  $\mu\text{l}$ ) de liraglutide marqué ou non marqué (205  $\mu\text{M}$ ) (seringue) avec des intervalles de 150 s, pour une durée totale de titration de 50 min.

**Résultats et interprétation :** Un exemple de résultat brut obtenu est présenté sur la figure suivante, pour une titration de 80  $\mu\text{M}$  d'HSA contrôle délipidée avec 205  $\mu\text{M}$  de liraglutide marqué (Figure 66).

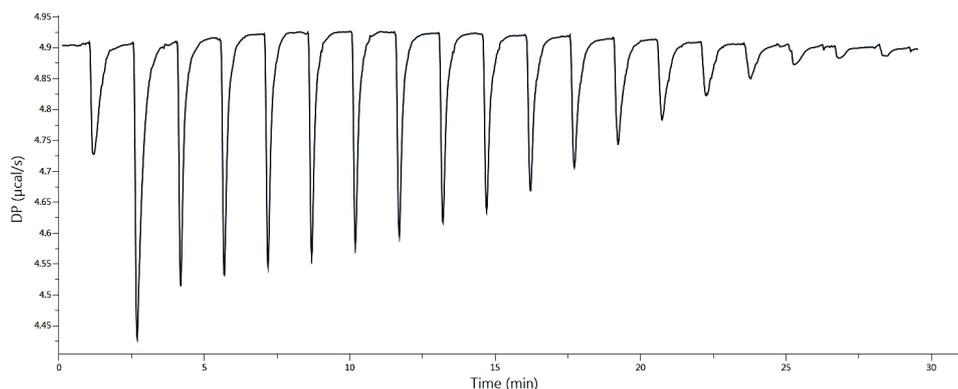


Figure 66 : Résultat d'ITC brut pour une titration albumine-liraglutide. 80  $\mu\text{M}$  d'HSA avec 205  $\mu\text{M}$  de liraglutide marqué (tampon borate 50 mM pH 7,5).

L'analyse des courbes de titration à l'aide du logiciel de modélisation (Malvern MicroCal PEAQ-ITC) a permis la détermination des valeurs de  $n$  et de  $K_d$  pour la liaison albumine-liraglutide. On obtient pour le liraglutide marqué et non marqué, des valeurs de  $K_d$  de l'ordre du micromolaire pour le site principal ( $n$  proche de 1) (Tableau 6).

	$K_d$ en $\mu\text{M}$	$N$
Liraglutide non marqué	$1,00 \pm 0,37$	$1,22 \pm 0,18$
Liraglutide marqué au $^{19}\text{F}$	$3,11 \pm 0,95$	$1,28 \pm 0,15$

Tableau 6 : Résultats d'ITC de l'analyse de l'interaction du liraglutide marqué ou non avec l'albumine ( $n=3$ ).

L'analyse par ITC ne montre aucune différence significative entre le liraglutide marqué et non marqué concernant l'interaction avec l'albumine contrôle.

**Conclusion :** L'étude d'interaction par ITC apporte la confirmation d'un point important : le marquage n'induit pas d'altération notable des propriétés de liaison du liraglutide à l'albumine. Une optimisation des conditions de l'expérience pourrait améliorer la précision de la mesure des valeurs de  $n$  et de  $K_d$  (choix du modèle d'ajustement, prise en compte de l'état d'oligomérisation du liraglutide, augmentation du nombre de points de titration ou modification des rapports des concentrations protéine/ligand).

## Discussion

L'ensemble des techniques d'étude d'interactions testées nous a permis de mettre en évidence les contraintes liées à la nature du ligand et à ses particularités telles que son oligomérisation ou sa fluorescence intrinsèque, mais également aux propriétés du complexe protéine-ligand qui doit être permettre la détection de la liaison via la mesure d'un paramètre variable tels que l'intensité ou le temps de relaxation (RMN) ou la chaleur de réaction (ITC) (Tableau 7).

Etude de l'interaction de l'albumine avec le liraglutide		
Technique	Méthode	Résultat obtenu
Fluorescence	<i>Quenching</i>	Détémir : méthode utilisable mais à optimiser Liraglutide : non utilisable car contient un résidu Trp
Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du <sup>19</sup> F sur le liraglutide marqué	<i>Intensité du signal (titration et compétition: FAXS)</i>	IC50 : analyse comparative entre HSA
	<i>Diffusion (titration)</i>	Paramètre variant peu entre formes libre et liée
	<i>T1 (titration)</i>	Paramètre variant peu entre formes libre et liée
	<i>T2 (titration)</i>	A permis un calcul d'affinité : Kd
Dialyse à l'équilibre		Equilibre non atteint dû à l'oligomérisation du liraglutide
Titration calorimétrique isotherme (ITC)		Valeurs de Kd calculées pour le liraglutide marqué et non marqué avec la HSA

Tableau 7 : Bilan des techniques utilisées pour l'étude de l'interaction albumine-liraglutide. Ensemble des expériences et des résultats obtenus pour l'étude d'interaction.

L'albumine est une protéine modèle parmi les plus étudiées pour les analyses d'interactions étant donné la multiplicité de ses ligands ainsi que son grand nombre de sites de liaison. Cependant, la mesure d'une valeur de  $K_d$  global pour un ligand permet d'évaluer son efficacité de fixation et de transport comme c'est le cas dans notre étude par RMN du <sup>19</sup>F. L'efficacité de la technique utilisée dépend du ligand étudié, qui est dans notre cas de nature polypeptidique contrairement à la plupart des petites molécules se liant à l'albumine couramment étudiées (acides gras libres, médicaments, petites molécules organiques). De ce fait, le signal de notre ligand est trop complexe pour être directement étudié par RMN du proton (par transfert de saturation STD par exemple) et nécessite donc un marquage (ici au fluor) pour le distinguer des signaux de la protéine d'intérêt. Certaines méthodes déjà utilisées pour l'étude de la liaison de ligands à l'albumine comme la fluorescence sont inutilisables dans le cas du liraglutide du fait de la présence dans sa séquence peptidique d'acides aminés émettant une fluorescence intrinsèque. La dialyse à l'équilibre s'est également avérée difficile à mettre en œuvre pour nos molécules d'intérêt, étant donné leurs propriétés d'oligomérisation. La RMN se présente en revanche comme une méthode proposant un large choix de noyaux détectables et de paramètres mesurables

pour l'étude de l'interaction protéine-ligand permettant ainsi d'adapter le protocole aux particularités des molécules étudiées.

Ainsi, la technique RMN du  $^{19}\text{F}$  a permis de mettre en évidence une altération de la liaison de l'albumine au liraglutide sur des modèles de glycation, *in vitro* et *in vivo*. Les résultats de ce travail apportent une compréhension supplémentaire concernant les conséquences de la glycation sur l'albumine, reflétant concrètement les conditions de la pathologie diabétique. Notamment, bien que l'effet de la glycation sur le rôle de transport de l'albumine ait déjà été étudiée pour quelques molécules (acides gras, warfarine, ibuprofène), il n'a en revanche été que peu caractérisé pour les médicaments utilisés spécifiquement pour le traitement du diabète. Par exemple, l'effet de la glycation de l'albumine sur la liaison aux sulfonyles n'a été étudiée que depuis 2010 par l'équipe de Basiaga, essentiellement par chromatographie d'affinité [349]. Leur travail a montré un effet de la glycation pouvant aller dans le sens de l'augmentation ou de la diminution de l'affinité de l'albumine pour le médicament. Cet effet s'est avéré être dépendant à la fois du type de molécule étudiée, des sites de liaison concernés, et du niveau de glycation de l'albumine [247, 350]. On comprend donc que le calcul de  $K_d$  global n'est qu'une mesure de la résultante des affinités de tous les sites de liaison de l'albumine, qui possèdent tous des affinités différentes et sur lesquels les effets de la glycation peuvent être variables. La méthode ITC présente l'avantage de permettre une estimation de l'affinité pour plusieurs sites de liaison et pourrait être optimisée en recherchant un modèle d'ajustement plus adapté au cas de l'albumine (avec plus de 3 sites de liaison). Comme cela est classiquement observé, les valeurs de  $K_d$  mesurées diffèrent selon la technique utilisée, puisque les conditions expérimentales ne sont pas identiques et les modèles d'ajustement des données influencent les valeurs obtenues. Certaines techniques apportent plutôt des données qualitatives telles que les valeurs d'IC50 obtenues par titration ou compétition en RMN du  $^{19}\text{F}$ . Cependant, chacune de ces méthodes permettent de comparer l'affinité entre plusieurs ligands ou états de glycation.

La glycation de l'albumine, en altérant ses propriétés structurales et fonctionnelles, est plusieurs fois montrée dans la littérature comme ayant un effet néfaste sur sa capacité de liaison à ses ligands, notamment certains médicaments, comme la warfarine ou le kétoprofène [260]. Cela a aussi été observé pour les sulfonyles, utilisées dans le traitement du diabète de type 2 (l'acétohexamide, la tolbutamide et la gliclazide) [351]. Néanmoins, un seul niveau de glycation avait alors été utilisé dans cette étude (albumine délipidée glyquée commerciale à 3,6 mol hexose/mol HSA). Les résultats obtenus pour le liraglutide montrent que l'altération de l'affinité

dépend du niveau de glycation, l'albumine gardant ainsi une certaine intégrité en termes de liaison au médicament jusqu'à un certain degré de modification. Bien qu'étant une cible privilégiée de la glycation, l'albumine serait donc, d'un point de vue fonctionnel, relativement peu sensible aux effets de la glycation. La diminution du taux d'albumine, généralement associée à un état pathologique, peut également avoir un impact supplémentaire sur l'efficacité du transport des médicaments. Notre étude souligne la nécessité de considérer le taux de glycation de l'albumine chez les patients dans la compréhension de la baisse de l'efficacité thérapeutique de certains médicaments. Des alternatives peuvent être alors proposées aux patients, telle qu'un traitement au sémaglutide, analogue du GLP-1 se liant à l'albumine via un acide stéarique avec une affinité plus élevée que celle du liraglutide, une durée de vie plus longue nécessitant seulement une injection hebdomadaire mais une affinité trois fois plus faible pour le récepteur au GLP-1. En effet, le défi consiste à trouver un compromis entre l'action prolongée du médicament (via son transport par l'albumine et la durée de vie) et sa capacité à lier et activer le récepteur du GLP-1 [115]. Il paraît cependant intéressant de déterminer l'effet de la glycation de l'albumine sur sa liaison au sémaglutide, afin d'évaluer si l'affinité du médicament reste élevée même pour des niveaux importants de glycation de l'albumine.

Toutes les protéines sanguines peuvent être des cibles de glycation, en particulier celles qui sont directement exposées au plasma, telles que les apolipoprotéines. La pathogénèse des maladies cardiovasculaires est fortement associée au profil des lipoprotéines mais elle est également liée au phénomène de glycation, qui affecte ces lipoprotéines. Les lipoprotéines antiathérogènes comme les HDL et sont également sujettes à la glycation puisque comme l'albumine, elles sont circulantes. La glycation concerne surtout ses protéines constitutives telles que l'ApoA1. Comme l'albumine, l'ApoA1 apparaît également davantage glyquée chez les patients diabétiques. Elle fait l'objet de la deuxième partie de ce travail dans laquelle nous avons essentiellement travaillé à la mise au point de la synthèse recombinante de l'ApoA1 pour un marquage aux isotopes stables  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$  afin de pouvoir utiliser la technique RMN. L'objectif final est l'étude des propriétés de liaison de l'ApoA1, seule ou sous forme de HDL, dans le but d'évaluer les effets de la glycation sur les interactions de l'ApoA1 avec ses ligands.

## **II. Production de l'Apolipoprotéine A1 recombinante pour l'étude de l'effet de la glycation sur l'interaction de sa forme libre ou de sa forme HDL avec des partenaires de liaisons.**

### ***Introduction***

L'ApoA1 est le principal constituant protéique des HDL (avec l'ApoA2 et l'ApoE). De son intégrité dépendent la formation et la fonctionnalité des HDL. En particulier, le rôle des HDL dans l'efflux de cholestérol et leurs propriétés anti-inflammatoires font de ces lipoprotéines des molécules athéroprotectrices et leur valent la désignation de « bon cholestérol ».

Le diabète est un facteur de risque indépendant de l'athérosclérose. Dans un contexte diabétique, l'ApoA1 est connue pour être davantage glyquée. Il paraît donc essentiel d'étudier les conséquences de ce phénomène de glycation sur les propriétés intrinsèques de l'ApoA1. La modification de l'ApoA1 par glycation affecte ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires contribuant ainsi à l'altération de ses capacités antiathérogènes [304-310]. De plus, les HDL contenant l'ApoA1 glyquée sont moins stables et apparaissent moins efficaces dans le transport inverse du cholestérol [272]. Concernant les interactions de l'ApoA1 avec ses ligands, peu d'études ont été réalisées sur l'impact de la glycation. Par contre, la glycation de l'ApoA1 la rend moins efficace à former des HDL en présence des phospholipides et diminue également sa capacité à activer la LCAT [272].

D'autres fonctions de l'ApoA1 pourraient également être affectées lorsque celle-ci est intégrée aux lipoprotéines. En effet, au sein des HDL, l'ApoA1 peut participer directement ou indirectement au rôle de transport pour des molécules telles que les microARN, la PON1, l' $\alpha$ 1AT, la S1P, la LCAT ou autres molécules participant également à leurs nombreuses fonctions (voir partie II.B.3.c).

### ***Objectifs***

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi de produire nous-même de l'ApoA1 recombinante afin de l'utiliser par la suite en spectroscopie RMN dans les études d'interaction. Cette première étape de production consiste en la surexpression de l'ApoA1 avec un marquage aux isotopes stables  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  afin qu'elle puisse être détectée spécifiquement par RMN pour une analyse en HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ou  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Cette production d'ApoA1 recombinante s'inscrit plus généralement dans un des axes d'étude de l'unité (Inserm U1188), qui est la thérapie HDL en utilisant des

HDLr comme vecteur de molécules bioactives. Cet axe de recherche nécessite une grande quantité d'ApoA1 fonctionnelle et implique donc une autonomie dans sa production.

Ensuite, pour évaluer l'effet de la glycation de l'ApoA1 sur la capacité de liaison au sein des HDL, nous avons sélectionné différents partenaires de liaison que sont l' $\alpha$ 1AT, la S1P et les microARN. Ces molécules se lient aux HDL et participent ainsi à ses fonctions athéroprotectrices [169, 297, 298]. A partir de l'ApoA1, des HDLr ont été synthétisés pour l'étude par RMN et par ITC. L'ITC est l'une des techniques d'étude des interactions les plus universelles mais présente ses propres avantages et limitations qui seront discutés dans cette partie.

### ***Résultats de la partie II :***

#### **1. Etude et limitations des méthodes de recombinaison classique et du système GATEWAY pour la synthèse de l'ApoA1 recombinante**

##### ***Objectifs :***

La première étape de cette partie est de mettre au point la production de l'ApoA1 recombinante marquée ou non marquée afin de synthétiser dans un second temps les HDL reconstitués pour la glycation et l'étude des interactions. Contrairement au marquage du liraglutide au fluor où un groupement est ajouté à la structure de base de la molécule, le marquage  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  consiste à produire une protéine de manière recombinante en présence d'isotopes stables de façon à ce que ceux-ci soient incorporés à la séquence protéique au cours de la synthèse par le ribosome. Dans un premier temps, un milieu de culture standard (LB) est utilisé pour la mise au point de la surexpression de la protéine recombinante avant de passer au milieu enrichi en isotopes destiné à la production de la protéine marquée.

##### ***Méthodes :***

Deux approches ont été utilisées pour produire l'ApoA1 recombinante (notée ApoA1r) : la première est une méthode classique dite de « recombinaison par digestion et ligation de plasmides » et la seconde est une technologie de clonage par recombinaison appelée GATEWAY, créée par la société Invitrogen en 1990. Dans les deux cas, le logiciel *Serial Cloner* a permis d'analyser les plasmides et de prédire les résultats attendus pour chaque étape.

Les protocoles communs sont présentés ici. Ensuite, les méthodes pour chaque technique de recombinaison seront décrites dans les parties correspondantes.

– *Préparation des bactéries compétentes*

Les bactéries *Escherichia coli* Top10 et *Clearcoli* utilisées respectivement pour l'amplification de plasmide et pour la production de protéines, sont rendues compétentes en perméabilisant leur membrane. Dans un premier temps, des précultures de ces bactéries en milieu LB (Luria Broth – bouillon lysogène) sont diluées au 1/100<sup>ème</sup> dans 50 ml SOB (bouillon super optimal) et incubées à 37°C (200 rpm, 2h), jusqu'à atteindre une DO<sub>600nm</sub> de la suspension bactérienne entre 0,2 et 0,3. Après refroidissement sur glace pendant 10 min, les bactéries sont centrifugées (5 min, 4000 rpm, 4°C). Le culot est repris dans 16 ml de tampon RF1 à pH 7,5. Après 15 min sur glace, on centrifuge à nouveau. Le culot est resuspendu dans 4 ml de tampon RF2 à pH 6,8. Les tampons RF1 et RF2 contiennent du CaCl<sub>2</sub> facilitant l'ouverture des pores membranaires lors du choc thermique. Après 15 min sur glace, les bactéries compétentes sont aliquotées et conservées à -80°C.

– *Transformation des bactéries compétentes pour l'amplification du plasmide recombinant*

On met en contact 50 µl de bactéries compétentes et environ 100 ng de plasmide durant 30 min dans la glace. Un choc thermique permettant au plasmide de pénétrer dans les bactéries, est alors appliqué à l'échantillon (30 sec à 42°C suivi de 2 min dans la glace). Puis, 250 µl de milieu SOC (SOB avec répression catabolique) préchauffé à 42°C sont ajoutés dans le tube. Le tout est incubé 45-60 min (37°C, 250 rpm) puis étalé sur boîte LB-agar avec un antibiotique de sélection, ici l'ampicilline. Un clone est sélectionné et mis en culture en milieu LB liquide, contenant de l'ampicilline (100 µg/ml final), antibiotique correspondant au gène de résistance contenu dans le plasmide transformé. La culture est ensuite incubée sur la nuit à 37°C à 250 rpm.

– *Dosage de l'ADN purifié*

Les bandes d'intérêt sont extraites du gel en utilisant le kit commercial « QIAquick extraction » (QIAGEN) et conservé à -20°C. Les plasmides purifiés sont dosés par mesure d'absorbance à 260nm en appliquant l'équation de la loi Beer-Lambert :  $C_m = (A.e) / l$  avec  $C_m$  = concentration massique d'acide nucléique en ng/µl ; A = absorbance à 260 nm ; e = coefficient d'extinction massique soit ~50 ng.cm/µl pour l'ADN double brin ; l = trajet optique en cm.

### a) La méthode classique par recombinaison de plasmides

#### Matériel et méthode :

La séquence codante de l'ApoA1 est extraite du plasmide pPIC9K -ApoA1 (10 000 nt) par l'utilisation du couple d'enzymes EcoRI et BamHI. Ce plasmide correspond à un vecteur de levure *Pichia pastoris* pour insertion multicopies et expression de protéines secrétées. Le vecteur d'expression bactérien (pGEX-2T - 4948 nt) est également digéré par ce couple d'enzymes. Après digestion (37°C, 1h), un gel d'agarose à 1,2% a permis de purifier les fragments nécessaires pour ligation. L'étape de ligation par la T4 DNA ligase (16°C sur la nuit, vecteur/insert = 1/3) permet d'obtenir le plasmide recombinant noté pGEX-ApoA1 (Figure 67).

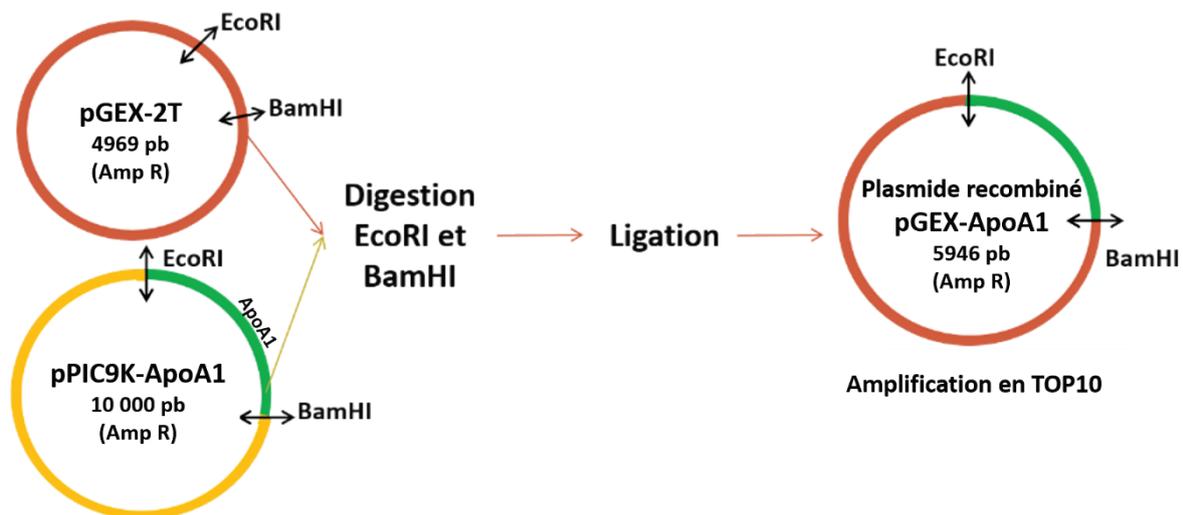


Figure 67 : Principe de la technique classique de clonage utilisée pour l'ApoA1.

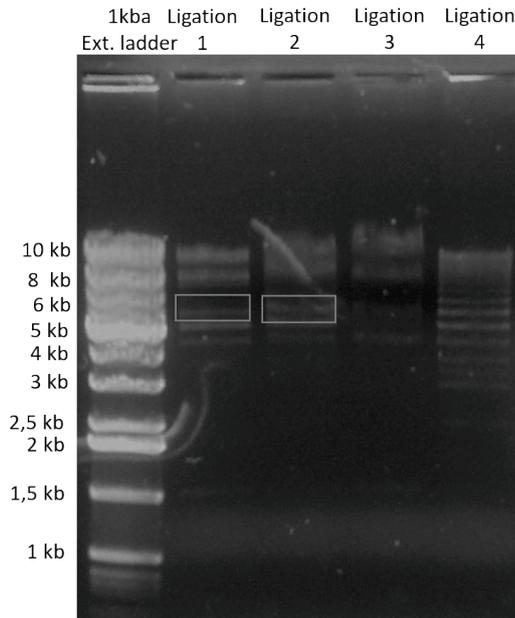
- Le protocole a été testé sur 4 préparations différentes du même plasmide pPIC9K-ApoA1. La ligation est vérifiée par une migration sur gel d'agarose 0,8% en TBE (Tris-borate-EDTA).
- Les cultures de bactéries Top10 transformées avec pGEX-ApoA1 sont centrifugées. Les plasmides amplifiés sont isolés et purifiés à l'aide du kit « QIAGEN Plasmid Midiprep ». Les extractions sont ensuite dosées et analysées sur gel d'agarose 0,8% après digestion.

#### Résultats et interprétation :

##### i. Vérification de la ligation sur gel d'agarose

Après une migration sur gel d'agarose plusieurs bandes correspondant probablement à différentes conformations (relâché, linéaire et superenroulé) du pGEX-ApoA1 (7047 pb) ont été obtenues

pour les différents produits de ligation. Les bandes entre 5 et 8 kDa ont été retenues pour l'étape de transformation (*Figure 68*). Après extraction du gel, le dosage du plasmide purifié donne une valeur de 14 ng/μl.



*Figure 68 : Analyse des produits de ligation pGEX-ApoA1. Gel d'agarose 0,8%. Les bandes d'intérêt sont encadrées.*

## **ii. Extraction du plasmide amplifié et analyse sur gel des produits de digestion**

Le plasmide extrait n'a pas donné les deux bandes attendues (3521 pb et 2425 pb) sur le gel après digestion par l'enzyme *NarI* (gel non présenté). Des tests, réalisés ultérieurement, ont mis en évidence l'inactivité de l'ampicilline utilisée. La présence d'ADN dosée dans les produits issus des Midiprep (entre 200 et 250 ng/μl) suggère que le plasmide n'a probablement pas été correctement conservé du fait de la disparition de cette pression de sélection. Face à ce problème et avant de confirmer l'hypothèse énoncée concernant l'antibiotique, nous avons utilisé la seconde technique appelé « GATEWAY™ Cloning System ».

### **b) La technologie de clonage GATEWAY**

#### **Matériel et méthode :**

Le système de clonage GATEWAY (Invitrogen) est une méthode de biologie moléculaire permettant le transfert de fragments d'ADN entre différents vecteurs en conservant le bon ORF (open reading frame ou cadre de lecture ouvert) grâce à des séquences et enzymes spécifiques.

Elle permet ainsi de s'affranchir des difficultés et erreurs pouvant être associées à la recherche d'enzymes de restriction adéquates pour chaque plasmide.

Cette technique consiste à produire un plasmide recombinant en insérant la séquence d'intérêt préalablement amplifiée par deux PCR (Polymerase Chain Reaction) successives, dans un plasmide donneur (réaction BP) qui sera ensuite recombiné avec un plasmide de destination (réaction LR) pour former le clone d'expression destiné à la transfection dans des bactéries pour la synthèse de la protéine recombinante (*Figure 69*).

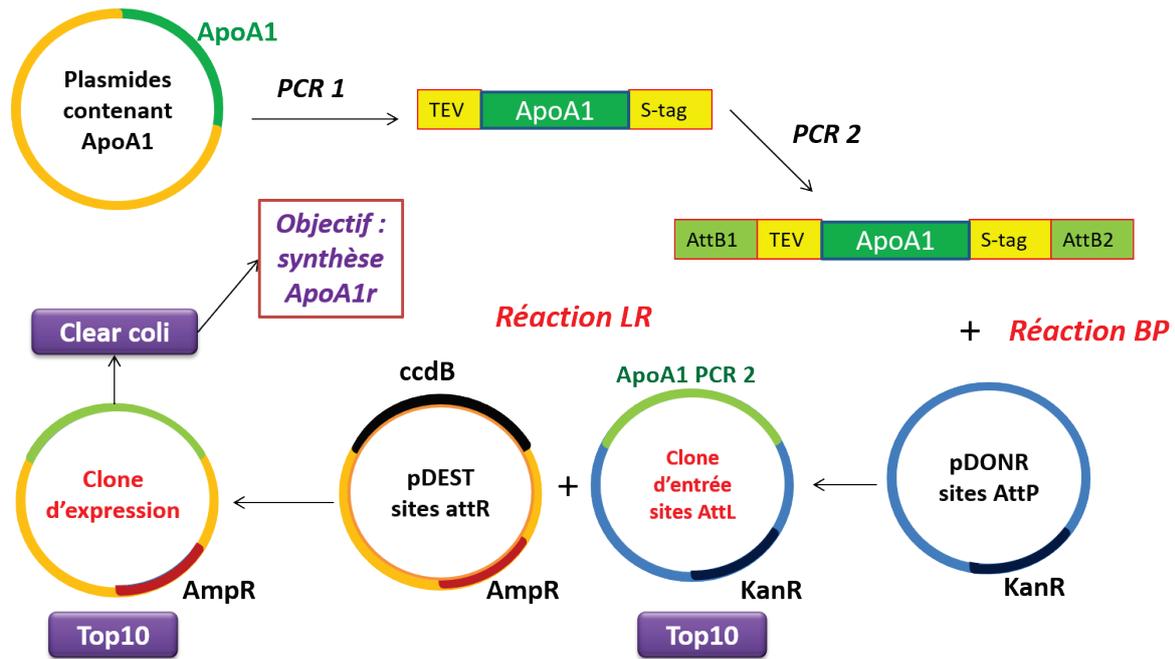


Figure 69 : Principe du système de clonage GATEWAY appliqué à l'ApoA1.

Le protocole suivi pour la recombinaison GATEWAY est celui fourni par Invitrogen (User guide 250522 MAN0000282 page V).

- La PCR 1 permet d'amplifier la séquence d'intérêt (ApoA1 730 pb) du plasmide de départ (pPIC9k-ApoA1), en même temps que l'ajout d'une séquence codant pour un site de clivage protéique par l'enzyme TEV (Tobacco Etch Virus protease) de 25 pb et d'un S-tag de 45 pb qui est un fragment de la RNase permettant détection colorimétrique et la purification de la protéine recombinante. Ce tag ne sera pas utilisé étant donné qu'un codon stop est positionné en fin de séquence nucléotidique codant pour ApoA1.

Les amorces utilisées pour la PCR 1 sont les suivantes :

Oligo E forward (TEV ApoA1) :

GGCTTCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCGATGAACCCCCCAGAGCCCCTGG

Oligo F reverse (S-tag ApoA1) :

TTAGCTGTCCATGTGTTGGCGTTCGAATTTAGCAGCGGTTTCTTTACTGGGTGTTGA  
GCTTCTTAGTGT

- La PCR 2 effectuée sur le produit de la PCR 1, extrait du gel, permet l'ajout des séquences spécifiques de recombinaison du phage  $\lambda$  AttB1 et AttB2. Les amorces utilisées pour la PCR 2 sont les suivantes :

Oligo C forward (**AttB1** TEV) :

**GGGGGGGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAGAATCTTTATTTTCAG**  
**GGC**

Oligo D reverse (**AttB2** S-tag) :

**GGGGGGGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAGCTGTCCATGTGTTG**  
**GCGTTCGAA**

- Les séquences AttB situées aux extrémités du produit de PCR 2 permettent la recombinaison et l'insertion de la séquence au niveau des sites AttP du plasmide donneur (pDONR). Cette recombinaison appelée réaction BP est catalysée par le mélange d'enzymes « BP clonase ». Le « clone d'entrée » obtenu, appelé pDONR-ApoA1 est transfecté dans des bactéries Top10 pour être amplifié. La sélection se fait ici par l'ajout de la kanamycine, étant donné que le pDONR221 possède le gène de résistance à la kanamycine après recombinaison. Après récupération par Midiprep du plasmide amplifié, deux digestions sont effectuées pour vérification, l'une avec BspHI uniquement et l'autre avec le couple NarI et SspI (4h à 37°C).

- Le pDONR-ApoA1 contenant les sites AttL est recombiné avec le vecteur de destination appelé pDEST qui possède les sites AttR. Cette réaction LR est catalysée par le mélange « LR clonase » et donne le « clone d'expression ». Sur le pDEST, le gène ccdB codant pour la protéine toxique CcdB, un poison naturel inhibiteur de l'ADN gyrase bactérienne, permet la sélection positive des vecteurs de destination ayant intégré le gène codant pour ApoA1. Afin de déterminer l'étiquette de fusion permettant une meilleure solubilité de l'ApoA1 recombinante, lors de l'expression de la protéine, 7 plasmides différents ont été utilisés, chacun codant pour un tag : GST (Glutathion S-transferase), MBP (Maltose-binding protein), His (6 histidines), TRX (Thioredoxin), NusA (N utilisation substance protein A), GB1 (Guanine nucleotide-binding protein) ou ZZ (domaine de liaison des IgG de la protéine A de Staphylococcus aureus). Notons que chaque tag est précédé d'un tag His (sauf pour His). Chaque construction est nommée de la façon suivante : pDEST-Tag-ApoA1.

- Des bactéries Top10 sont transformées avec chacun des 7 plasmides recombinés pDEST-ApoA1 pour l'amplification. Un clone bactérien de chaque construction est sélectionné sur les boîtes de pétri et mis en culture liquide de 50 ml puis les plasmides amplifiés sont extraits par Midiprep et analysés sur gel après PCR ou après digestion.

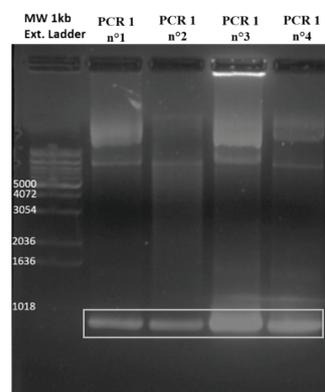
- La PCR permet d'amplifier l'ADN *in vitro*. Chaque cycle de PCR d'une durée d'environ une minute et comprend 3 étapes : une dénaturation de l'ADN par la température (95°C) afin de séparer les deux brins, une hybridation des amorces par complémentarité de bases avec les extrémités de la séquence d'intérêt (à 55°C) et enfin une élongation par l'action de l'enzyme ADN polymérase (à 72°C). Ce même cycle est 30 fois pour une amplification exponentielle de la séquence cible (2<sup>n</sup> copies pour n cycles). Ces valeurs sont adaptées selon les amorces pour chaque PCR, en particulier pour l'élongation pour laquelle on se place à environ 5°C en dessous de la T<sub>m</sub> (température de fusion) des amorces. La PCR a été effectuée en utilisant des amorces selon les différents pDEST : T7 forward / T7 reverse (pour GST, His, TRX, GB1 et ZZ), TRC forward / rnb reverse (pour MBP) et T7 forward / rnb reverse (pour NusA).

- La digestion enzymatique est réalisée par EcoRI pour tous les plasmides sauf pour pDEST-MBP-ApoA1 pour lequel NcoI est utilisé. Les plasmides ne contiennent qu'un site de restriction pour ces enzymes et donnent donc un double brin d'ADN linéaire.

### **Résultats et interprétation :**

#### ***i. Analyse sur gel des produits obtenus par PCR 1***

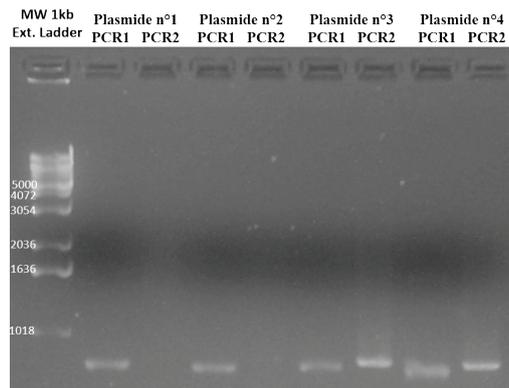
L'analyse sur gel d'agarose des produits de PCR 1 a montré qu'on obtient bien le produit attendu à une taille 802 pb (*Figure 70*). Les bandes d'intérêt sont extraites du gel pour être utilisé lors de la PCR 2.



*Figure 70 : Analyse des produits de la PCR 1 (Gateway). Gel d'agarose 1,2%. Les bandes d'intérêt sont encadrées.*

## ii. Analyse sur gel des produits obtenus par la PCR 2

L'analyse sur gel d'agarose des produits de PCR 2 (produit PCR1 avec l'ajout des séquences AttB1 et AttB2) montre que des bandes correspondant potentiellement à la taille attendue (867 pb) ont été obtenues pour 2 des 4 expériences. Bien que le marqueur utilisé ne permette pas de mesure précise, la comparaison des positions des bandes des deux PCR montre un décalage en cohérence avec les tailles théoriques (802 pb pour la PCR 1 et 867 pb pour la PCR 2) (*Figure 71*).



*Figure 71 : Analyse des produits de PCR 1 et PCR2 (Gateway).  
Comparaison des bandes PCR 1 (802 pb) et PCR 2 (867 pb) sur gel d'agarose 1,2%.*

## iii. Vérification de l'insertion du produit de PCR 2 dans le vecteur pDONR

A partir de cette étape, seul le produit de PCR 2 correspondant à la préparation n°4 a été sélectionné pour la suite. Des digestions sont réalisées sur produit de la réaction BP afin de vérifier la présence du clone d'entrée à la taille attendue (3343 pb). Une digestion est faite avec BspHI uniquement (bandes attendues à 2416 et 927 pb) et l'autre avec le couple NarI et SspI (bandes attendues à 2505 et 838 pb). La migration sur gel montre des bandes visibles entre 2000 et 3000 pb et des bandes à près de 2000 pb correspondant probablement à la forme surenroulée du plasmide non digéré qui migrerait donc plus loin par rapport aux bandes du marqueur. Bien que les bandes à 927 et 838 pb ne soient pas visibles sur le gel, ces résultats semblent indiquer que le clone d'entrée possède bien la taille attendue (*Figure 72*).

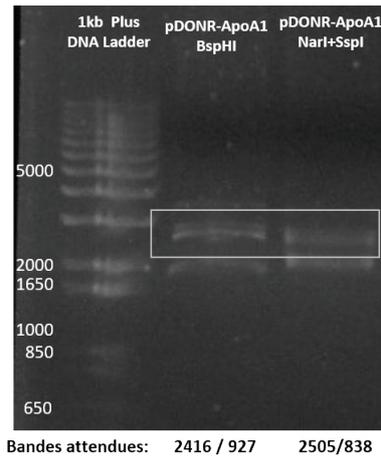


Figure 72 : Analyse des produits de digestion du clone d'entrée.  
Gel d'agarose 1,2%. Les bandes d'intérêt sont encadrées.

#### iv. Amplification et analyse des plasmides recombinés pDEST-ApoA1

L'analyse sur gel des produits de PCR pour les pDEST montre des bandes bien distinctes mais à des tailles différentes de celles attendues avec un décalage assez régulier entre les tailles obtenues et attendues (Figure 73).

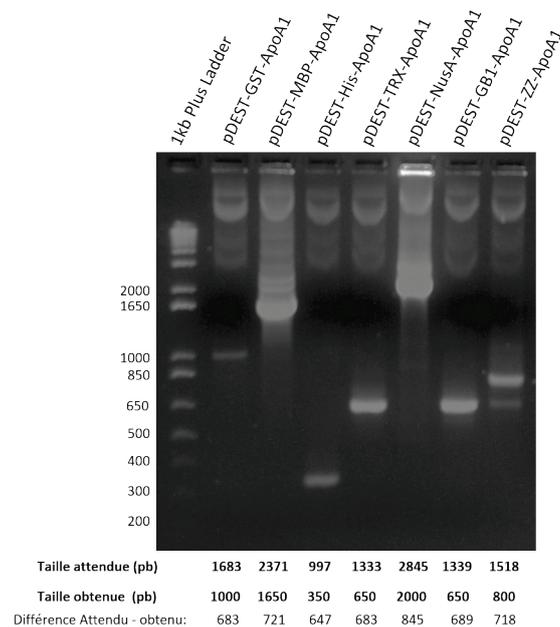
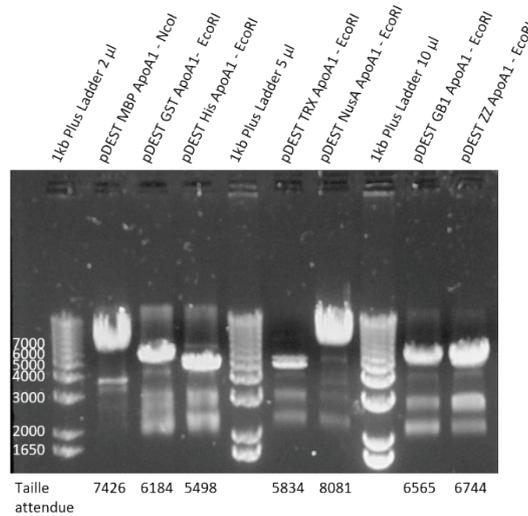


Figure 73 : Analyse des produits de PCR des 7 pDEST-ApoA1.  
Gel d'agarose 1,2%.

En revanche, l'analyse sur gel des produits de digestions (linéarisation) des pDEST recombinés montre la présence des bandes faibles probablement liées à une dégradation avec des bandes principales présentant une bonne correspondance de la position (limites supérieures) avec les

tailles attendues, ce qui confirme la présence des 7 plasmides recombinés pDEST-ApoA1 attendus (*Figure 74*).



*Figure 74 : Analyse des produits de digestion des pDEST-ApoA1. Gel d'agarose 1,2%.*

### **c) Expression de l'ApoA1r chez *Clearcoli* à partir des plasmides recombinés par la méthode GATEWAY**

#### **Matériel et méthode :**

- *Transformation des Clearcoli avec les clones d'expression et induction de la surexpression de l'ApoA1r*

La souche bactérienne *Clearcoli* présente l'avantage de posséder un LPS (lipopolysaccharide) non immunogène. Le LPS pouvant interagir avec l'ApoA1 et très difficile à éliminer. La transformation des *Clearcoli* est effectuée avec chacun des 7 plasmides obtenus précédemment. Après 48h, les clones sont sélectionnés et mis en préculture de 10 ml avec l'antibiotique de sélection (ampicilline 1 µg/ml) sur la nuit à 37°C. Des cultures de 50 ml de LB sont ensuite ensemencées avec les précultures. Lorsque la turbidité mesurée à 600 nm ( $DO_{600nm}$ ), atteint une valeur comprise entre 0,6 et 0,8, la surexpression de la protéine est induite par ajout de 50 µl d'IPTG (1 mM final), pendant 4h à 37°C.

- *Analyse sur gel de la surexpression de l'ApoA1*

Les cultures sont centrifugées et le culot bactérien resuspendu dans du tampon de lyse (Tris 20 mM, pH 7,8-8, NaCl 200 mM). Les bactéries sont lysées par sonication (amplitude 70%, pulse continu, 4sec ON / 6sec OFF, 12 cycles). Le surnageant est récupéré après centrifugation (12000 rpm, 30 min à 4°C). Les échantillons avant (Avi) et après induction (Api), le culot (C) et le

surnageant de lyse (S) ou (SL) sont déposés sur gel SDS-PAGE 12% d'acrylamide. La migration est effectuée à 25 à 30 mA par gel pendant 90 à 120 min.

– *Purification des protéines recombinantes*

Puisque chaque tag est précédé d'un tag His, la purification des protéines recombinantes s'effectue sur une colonne d'affinité Nickel (HisTrap HP GE Healthcare 5 ml), en utilisant un tampon A pour le chargement (Tris 20 mM, pH 7,8-8, NaCl 200 mM, imidazole 20 mM) et un tampon B (tampon A + 500 mM d'imidazole) utilisé pour le gradient d'élution (de 20 à 500 mM d'imidazole). L'imidazole est éliminé par ultrafiltration ou passage sur colonne de dessalage (HiTrap Desalting GE Healthcare) de 5ml.

– *Surexpression de la TEV recombinante*

La TEV (Tobacco Etch Virus Protease), est une enzyme de clivage reconnaissant spécifiquement la séquence peptidique E-N-L-Y-F-Q-G. Une 1<sup>ère</sup> TEV a été surexprimée après transformation dans des bactéries BL21(DE3) pLysS (résistantes au chloramphénicol) transformées avec un plasmide pET9a-TEV (KanR) (vecteur fourni par Muriel Gondry de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, CEA Saclay). Une 2<sup>nde</sup> TEV recombinante a été surexprimée dans les bactéries E.coli BL21(DE3) préalablement transformées par le vecteur pDIA17-pET28 (résistance : chloramphénicol et kanamycine) fournies par la plateforme de protéines recombinantes de l'Institut Pasteur, Paris. Pour les 2 enzymes TEV, la surexpression a été induite de façon classique (IPTG 1mM à une turbidité de 0,8 environ). La TEV, possédant un tag His a été purifiée sur colonne HisTrap HP 5 ml selon le même protocole utilisé pour l'ApoA1 recombinante.

– *Clivage de l'ApoA1 recombinante avec l'enzyme TEV*

L'ApoA1 surexprimée avec le tag NusA ou le tag TRX est incubée avec la TEV recombinante (obtenue à partir des vecteurs de CEA Saclay ou bactéries de l'Institut Pasteur, Paris) ou une TEV commerciale (*T4455 SIGMA*). Les clivages sont effectués à une proportion d'environ 10 µg pour 1 mg d'ApoA1, pour différentes températures et durées afin de déterminer les conditions optimales. Ensuite, une incubation à 30°C sur la nuit dans un tampon de digestion (50 mM Tris, 0,5 mM EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) et 1 mM DTT (dithiotréitol), pH 8) est finalement utilisée pour les clivages suivants.

## Résultats et interprétation :

### i. Suivi de l'expression de l'ApoA1 recombinante avec les différents tags

L'analyse du gel SDS-PAGE avec les extraits bactériens avant et après induction (Avi et Api), ainsi que les surnageants de lyse (SL) et culots de lyse (C), montre que seule l'ApoA1 avec l'étiquette NusA est retrouvée dans le surnageant de lyse (SL). La protéine NusA-ApoA1 est donc la seule qui est surexprimée de façon soluble et abondante. L'expression est aussi visible pour TRX-ApoA1 et GST-ApoA1 mais elles sont majoritairement retrouvées dans le culot de lyse (C). Notons qu'une bande, probablement une protéine contaminante bactérienne est retrouvée dans tous les puits à environ 40 kDa (astérisque) (Figure 75).

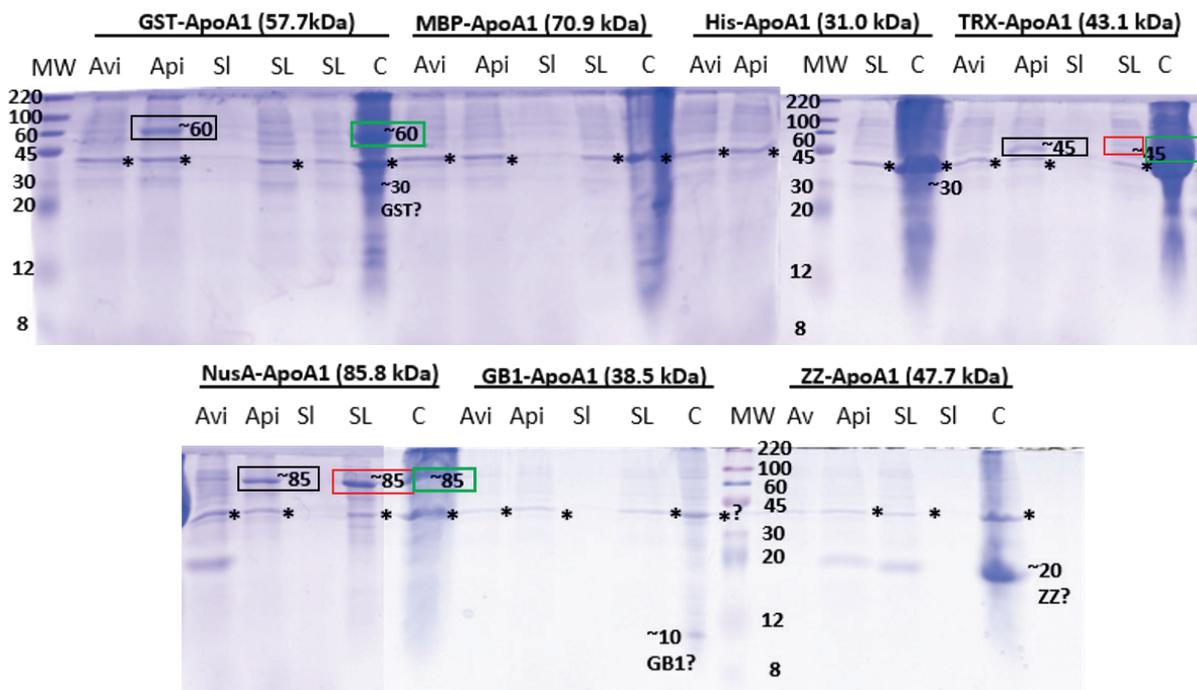


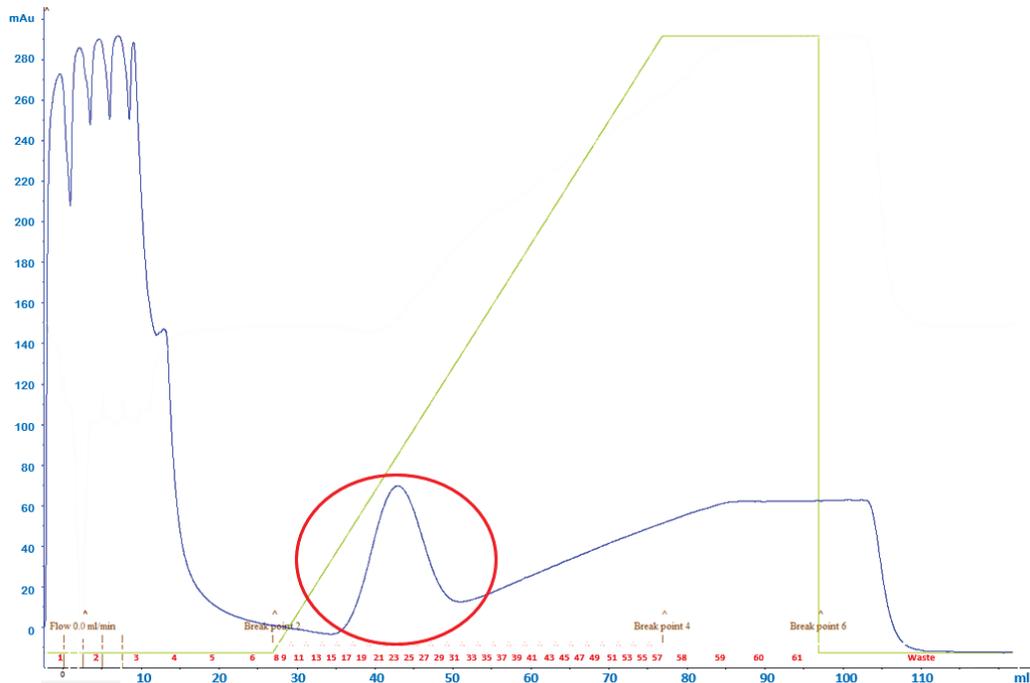
Figure 75 : Suivi de l'induction de la synthèse de l'ApoA1.

Gel SDS-PAGE 12%. Avi et Api: avant et après induction respectivement, SL : surnageant avant lyse (LB), SL et C : surnageant et culot de lyse respectivement. En encadré rouge : fraction soluble. Encadré vert : fraction insoluble, \*protéine contaminante.

### ii. Chromatographie d'affinité pour la purification de la protéine NusA-ApoA1

Le produit d'induction NusA-ApoA1 étant le seul obtenu sous forme soluble, le tag NusA est finalement le seul retenu pour la production en grande quantité d'ApoA1. Des cultures de 500 ml puis de 1 litre sont réalisées afin d'obtenir une quantité plus importante de la protéine pour les tests de clivage du tag. Toutes les protéines ne s'accrochant pas à la colonne d'affinité Nickel, sont retrouvées dans les fractions de chargement (de 0 à 25 ml) puis la protéine d'intérêt

possédant le tag His-NusA est éluée pendant le gradient à environ 160 mM d'imidazole correspondant à un volume d'éluion de 42 ml (*Figure 76*).



*Figure 76 : Profil d'éluion de la protéine NusA-ApoA1 (colonne HisTrap HP 5 ml). Suivi  $A_{280}$  (courbe bleu) et gradient d'imidazole (courbe verte). Le pic de la protéine d'intérêt est entouré en rouge.*

Afin d'évaluer leur pureté, un dépôt des fractions obtenues sur gel SDS-PAGE est effectué en parallèle des différentes fractions du produit d'expression (avant et après induction, surnageant et culot) (*Figure 77*). On peut confirmer ici que les bandes correspondant à la protéine NusA-ApoA sont détectées entre 60 et 100 kDa, en cohérence avec sa masse théorique (85 kDa). Après extraction, la protéine se ne n'est présente que dans le surnageant de lyse (S). Une petite partie de la protéine est perdue dans les fractions de chargement (F3-F4) de la chromatographie d'affinité probablement dû à la saturation de la colonne. La majorité de la protéine se retrouve dans le pic d'éluion (fractions F17 à F31) avec une bonne pureté apparente (très peu de bandes contaminantes).

L'étiquette NusA permet donc une production d'ApoA1r soluble et abondante (30 mg par litre de culture). Il est toutefois nécessaire de procéder à une dernière étape de clivage du tag NusA pour obtenir l'ApoA1 recombinante finale. Pour cela l'enzyme TEV est utilisée puisque la protéine de fusion NusA-ApoA1 possède un site de clivage pour la TEV entre l'ApoA1 et le tag, dont la séquence a été ajoutée lors de la PCR 1 de la méthode GATEWAY.

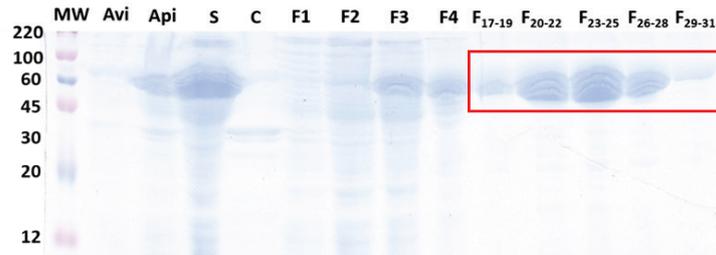


Figure 77 : Suivi de la synthèse et de la purification de la protéine NusA-ApoA1. Gel SDS-PAGE 12%. Les bandes correspondant au pic d'éluion sur la chromatographie sont encadrées en rouge. Avi : avant induction ; Api : après induction ; S : surnageant ; C : culot.

### iii. Les tests de clivage de la protéine NusA-ApoA1 par l'enzyme TEV

Le clivage de la protéine recombinante NusA-ApoA1 a amené à l'utilisation de trois enzymes TEV différentes (deux recombinantes et une commerciale). Les tests de clivage avec la première TEV recombinante (vecteur fourni par le CEA Saclay), sont réalisés pour différents temps et températures d'incubation (24h à 4°C, 24h à 25°C, 90 min à 34°C). L'analyse sur gel SDS-PAGE montre que la bande de la TEV seule apparaît vers 30 kDa, ce qui est cohérent avec sa masse théorique de 28 kDa. L'analyse du clivage montre que la bande entre 60 et 100 kDa correspondant à la protéine NusA-ApoA1 (85 kDa) reste très intense, attestant de l'absence de clivage. De plus, aucune bande n'apparaît par rapport à la condition contrôle, aux alentours de 28 kDa (ApoA1 seule clivée de son tag) et 58 kDa (tag His-NusA) (Figure 78). La TEV recombinante testée ne permet donc pas le clivage du tag NusA.

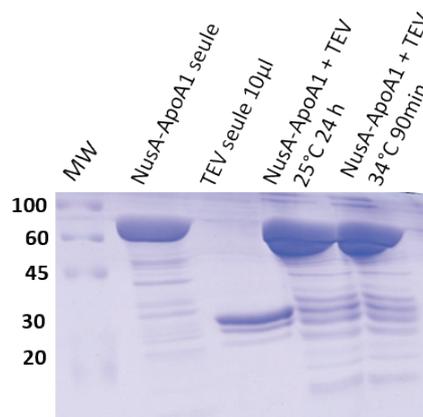
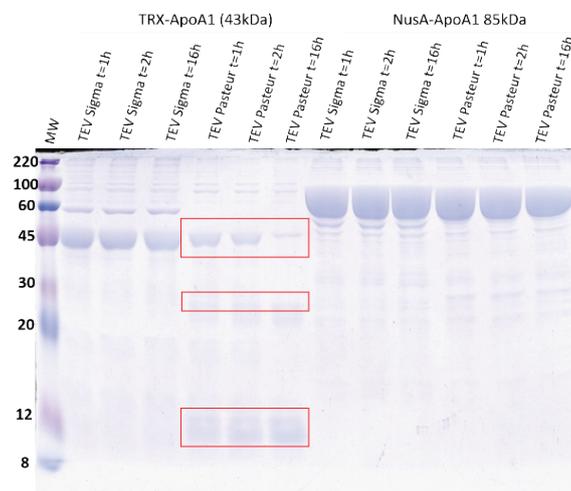


Figure 78 : Analyse du clivage de la NusA-ApoA1 par la TEV recombinante. (vecteur fourni par CEA Saclay), SDS-PAGE 12%.

L'hypothèse alors émise est la possible inaccessibilité de l'enzyme au site de clivage, à cause de la taille importante du tag NusA (55 kDa). Pour vérifier cette hypothèse, l'ApoA1 a alors été produite avec le tag TRX (12 kDa) de plus petite taille. Pour compenser le faible rendement de la protéine de fusion soluble issue de la construction avec le tag TRX, un plus grand volume de

culture a été nécessaire. Nous avons alors testé en parallèle le clivage avec la première TEV mais aussi avec une TEV commerciale (*T4455 SIGMA*) pour les deux tags (TRX-ApoA1 et NusA-ApoA1). L'ajout de Triton de 0,1 à 1%, ou d'urée à 0,5 M a été testé afin d'affaiblir les interactions entre le Tag et ApoA1 et ainsi essayer de rendre plus accessible le site de clivage sans affecter l'activité de l'enzyme [352]. Ces essais s'étant également révélés infructueux (analyses par SDS-PAGE non présentées), une autre TEV recombinante (vecteur intégré dans des bactéries fournies par l'Institut Pasteur, Paris) a été utilisée. Le gel SDS-PAGE du contrôle de digestion après 1h, 2h et 16h d'incubation montre qu'une variation de l'intensité de la bande de l'ApoA1 recombinante au cours du temps est obtenue uniquement pour le tag TRX clivée par la TEV recombinante de l'institut Pasteur. Nous observons que l'intensité de la bande TRX-ApoA1 (43 kDa) diminue tandis que celle du tag TRX libre (12 kDa) augmente. Cependant, la bande de l'ApoA1 clivée (28 kDa) n'apparaît pas. La bande visible vers 28 kDa ne varie pas et correspond probablement à la TEV (qui a la même masse moléculaire). D'ailleurs pour le résultat obtenu pour la construction NusA avec la TEV Pasteur, nous observons également une bande à 28 kDa mais pas de bande complémentaire à 58 kDa (His-NusA). De plus, l'intensité de la bande à 86 kDa ne variant pas, nous pouvons supposer qu'il s'agit uniquement de la TEV à 28 kDa. Nous avons donc bien un clivage pour TRX-ApoA1 mais l'ApoA1 a probablement été dégradée et/ou a perdu sa solubilité une fois séparée du tag. (*Figure 79*).



*Figure 79 : Suivi du clivage de TRX- et NusA-ApoA1 par les TEV commerciale et recombinante. Gel SDS-PAGE 12% (16h à 30°C dans le tampon de digestion).*

Trois TEV différentes ont été utilisées et n'ont pas permis de réaliser le clivage du tag et ainsi obtenir l'ApoA1 recombinante finale. Face à l'inefficacité des clivages réalisés, un nouveau plasmide pET28a commercial (GeneCust) contenant le gène codant pour ApoA1 avec un tag His

et optimisé pour l'expression en milieu bactérien, a été utilisé pour la production de l'ApoA1, afin de réduire les contraintes liées à la taille de l'étiquette.

**d) Production de l'ApoA1r marquée et non marquée avec étiquette His, à partir d'un plasmide recombinant à codons optimisés**

**Matériel et méthode :**

– Surexpression de l'ApoA1 recombinante à partir du plasmide

Le plasmide pET28a-ApoA1 avec codons optimisés pour l'expression en milieu bactérien (*Gene Cust*) (Figure 80) est amplifié en Top10. Les bactéries *Clearcoli* sont transformées avec ce plasmide, puis les cultures sont induites et l'ApoA1 est extraite et purifiée selon le même protocole que celui utilisé pour NusA-ApoA1. L'ApoA1r synthétisée a une masse théorique de 31 kDa ; elle possède en N-ter 21 acides aminés, comprenant le tag His, un site de clivage par la thrombine et quelques acides aminés séparateurs (Figure 81).

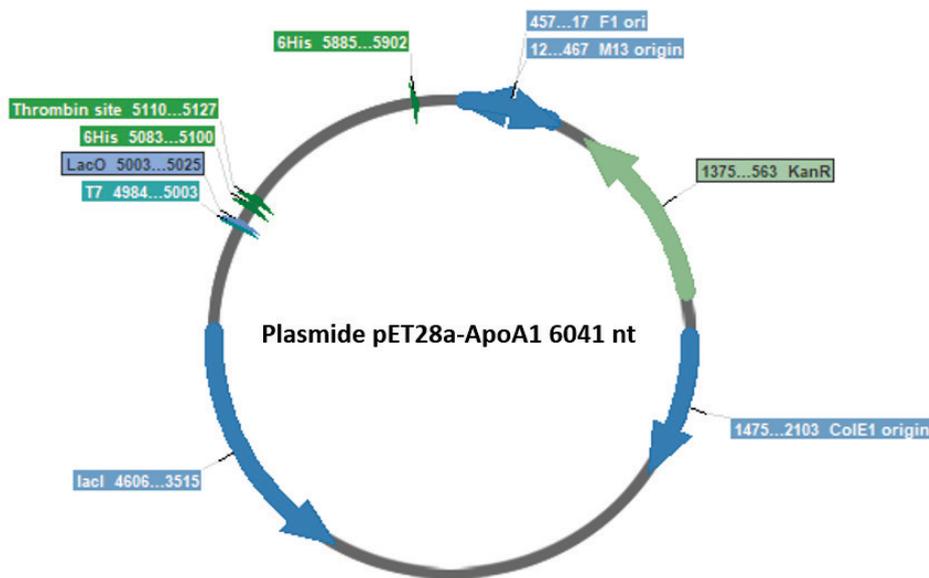


Figure 80 : Plasmide recombinant pET28a-ApoA1 (Serial Cloner Graphic Map)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQ  
 FEGSALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSLREQLGPVTQEFWDNLEKETETGLRQE  
 MSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQ  
 EKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRQLAARLEALKENGGARLAE  
 YHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLTQ\*

Figure 81 : Séquence protéique de l'ApoA1r codée par le pET28a-ApoA. Le tag histidine (en rouge), le site de clivage reconnu par la thrombine (en vert) et la séquence de l'ApoA1 native (en bleu).

Une fois le protocole optimisé pour l'ApoA1r en milieu LB, la production de la protéine en milieu marquée est réalisée. La seule différence avec la synthèse classique réside dans le milieu de culture utilisé qui est un milieu minimum. Ce milieu appelé M9, est préparé sous deux formes : la forme marquée pour la culture induite et la forme non marquée pour les précultures. Le milieu M9 ne contient qu'une seule source de carbone qui est le glucose ( $^{12}\text{C}$  ou  $^{13}\text{C}$ ) et une seule source d'azote qui est l'ammonium ( $^{14}\text{N}$  ou  $^{15}\text{N}$ ). Il est composé de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (6,4 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3 g/L),  $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$  ou  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 g/L) et  $\text{NaCl}$  (0,5 g/L) et ajusté à pH 7,4. Après stérilisation par autoclave, le milieu est complété par du glucose  $^{12}\text{C}$  ou glucose  $^{13}\text{C}$  (3 g/L), du  $\text{MgSO}_4$  (2 mM), du  $\text{CaCl}_2$  (10  $\mu\text{M}$ ) et de l'antibiotique selon le cas. Le milieu de culture initial des bactéries (LB) est changé par deux centrifugations (20 min à 4°C, 6000 rpm) puis resuspension du culot dans du milieu M9 afin d'éliminer toute trace de milieu LB. La méthode est identique pour passer des précultures en M9 non marqué aux cultures en milieu marqué. Le suivi de l'expression et de la purification de l'ApoA1r (masse théorique : 31 kDa) est réalisé par gel SDS-PAGE 15%.

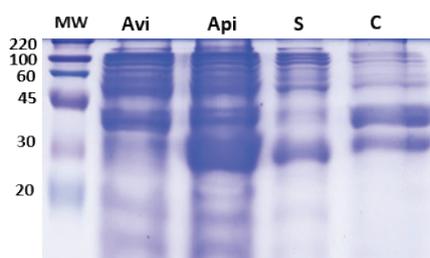
– *Clivage du tag His*

Le clivage du tag His est réalisé en incubant l'ApoA1r avec des concentrations croissantes en thrombine (*T7513 SIGMA*) (de 1 à 8 unités par mg) à température ambiante pendant 6h. L'analyse des produits de digestion de l'ApoA1r par la thrombine est réalisée sur gel SDS-PAGE 15%.

**Résultats et interprétation :**

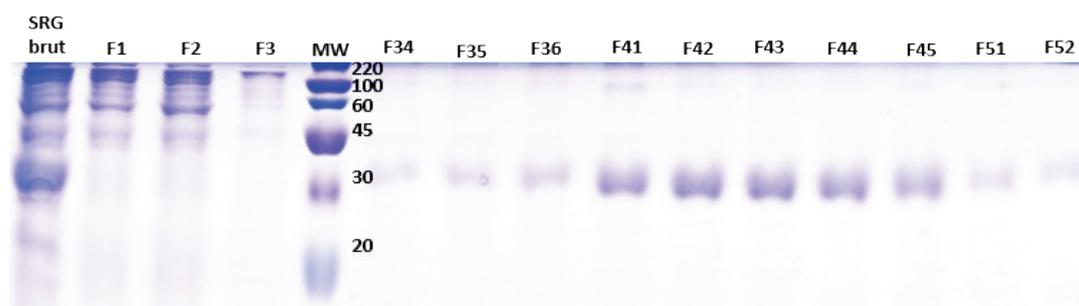
**i. Synthèse de l'ApoA1r en milieu classique en *E. coli* avec le pET28a-ApoA1**

Le suivi de l'expression (*Figure 82*) et de la purification (*Figure 83*) de l'ApoA1r (masse théorique : 31 kDa) est réalisé par gel SDS-PAGE. On observe une induction efficace de la surexpression de la protéine His-ApoA1 par comparaison des bandes Avi et Api. Une partie de la protéine se retrouve dans le culot (*Figure 82*).



*Figure 82 : Suivi de l'induction de la surexpression de la protéine His-ApoA1. Gel SDS PAGE (15%) les Clearcoli sont transformées avec le vecteur pET28a-ApoA1. Avi : Avant induction ; Api : Après induction ; S : surnageant ; C : culot.*

L'analyse sur gel SDS PAGE du suivi de la purification de l'ApoA1 montre que l'ApoA1 n'apparaît pas dans les fractions de chargement (F1 à F3), ce qui indique que la colonne retient correctement l'ApoA1, permettant un rendement optimal. On constate *de visu* une bonne pureté de la protéine dans les fractions d'élution (supérieure à 90%) (quelques faibles bandes de protéines contaminantes ayant une certaine affinité pour la colonne HisTrap) (*Figure 83*). La quantité d'ApoA1r produite est satisfaisante (8 mg par litre de culture), contrairement au pDEST-His-ApoA1 préparé par la technique GATEWAY pour laquelle la bande de surexpression n'apparaissait pas sur le gel SDS-PAGE (*Figure 75*). L'efficacité de la surexpression est donc attribuable à l'utilisation d'une séquence avec des codons optimisés, principale différence entre les plasmides pDEST et pET28a.



*Figure 83 : Suivi de la purification de la protéine His-ApoA1. Chromatographie sur colonne HisTrap HP 5ml GE-Heathcare, Gel SDS PAGE (15%), F1 à F3 : fractions de chargement ; F34 à F52 : fractions contenant le pic d'élution sur le profil UV ( $A_{280nm}$ ).*

## **ii. Production de l'ApoA1r marquée $^{15}N/^{13}C$ en milieu minimum M9**

L'induction de la surexpression de l'ApoA1 est également vérifiée sur gel (apparition de la bande entre 20 et 30 kDa pour ApoA1), ainsi que la présence de la protéine dans le surnageant de lyse, indiquant sa solubilité (*Figure 84*). Une optimisation de l'étape de sonication afin de mieux lyser les bactéries a permis par la suite de récupérer davantage d'ApoA1r dans le surnageant de lyse. Le rendement obtenu après purification sur la colonne HisTrap puis la Desalting est d'environ 7 mg par litre de culture, soit l'équivalent du rendement obtenu en milieu LB.

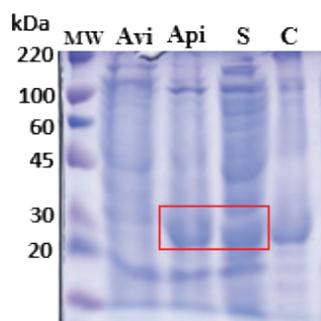


Figure 84 : Suivi de la surexpression de la protéine His-ApoA1 marquée  $^{15}N/^{13}C$ .  
SDS-PAGE 12%

### iii. Clivage du tag His par la thrombine

L'analyse des produits de digestion de l'ApoA1r par la thrombine sur gel SDS-PAGE avec des quantités croissantes d'enzyme, montre une diminution progressive de la masse moyenne de la bande ApoA1 se situant entre 20 et 30 kDa. Ce résultat semble indiquer une augmentation du taux de clivage avec une stagnation pour des quantités de thrombine entre 4 et 8 u/mg (voir Figure 85).

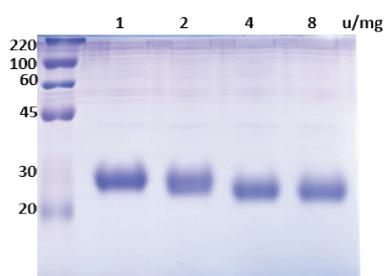


Figure 85 : Analyse du clivage du tag His de l'ApoA1r par la thrombine.  
Doses de 1 à 8 unités d'enzyme par protéine. Gel SDS-PAGE 15%.

Afin d'éliminer la partie clivée de la protéine (le tag His), une chromatographie d'affinité est effectuée avec une colonne HisTrap. La protéine est alors récupérée dans les fractions de chargement. Cependant, la thrombine ne possédant pas de tag, elle est éluée en même temps que l'ApoA1. La thrombine ayant une masse d'environ 38 kDa serait difficilement séparée de l'ApoA1 clivée sur une colonne de gel filtration. Du fait de la faible quantité utilisée, elle n'est pas détectable sur un gel SDS-PAGE. Une analyse RMN de l'ApoA1 clivée présentée plus loin (Figure 89) montre une dégradation importante de la protéine au cours du temps, probablement liée à une activité non spécifique de la thrombine. Nous avons alors décidé de continuer notre projet avec la protéine His-ApoA1 en nous affranchissant de l'étape de clivage.

## 2. Analyse de l'ApoA1 marquée $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ par RMN et reconstitution de HDL

### **Objectifs :**

L'ApoA1 recombinante surexprimée est analysée par fluorescence et par RMN et comparée à ApoA1 issue de plasma pour vérifier son état de repliement. L'analyse par RMN de la protéine marquée a également pour objectif la détermination des conditions et paramètres nécessaires pour l'étude des interactions. Différents protocoles sont utilisés pour une reconstitution de HDL à partir de la protéine His-ApoA1 afin d'obtenir une taille proche de celle des HDL natifs. Enfin, des tests sur cellules sont réalisés pour l'évaluation de la fonctionnalité de l'ApoA1 recombinante.

### **Méthodes :**

#### – *Spectres de fluorescence de l'ApoA1*

Les spectres d'émission de fluorescence de l'ApoA1 ont été obtenus pour 5  $\mu\text{M}$  de l'ApoA1p (ApoA1 purifiée de plasma humain) et l'ApoA1r, mesurés de 250 à 500 nm à une concentration de 5  $\mu\text{M}$ , avec ou sans urée 8M, après une excitation à 280 nm. Pour cette longueur d'onde d'excitation, l'émission de fluorescence résulte de la double contribution des résidus Trp et Tyr, celle du Trp étant fortement prédominante. Les mesures sont réalisées sur le fluorimètre HORIBA FluoroMax-4.

#### – *La RMN homo- et hétéronucléaire*

Les expériences 1D  $^1\text{H}$  sont utilisées pour l'analyse de l'ApoA1 recombinante et plasmatique (suppression d'eau par gradients, 128 scans, délai de relaxation de 2 s). L'expérience HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  est utilisée pour l'ApoA1 marquée (32 scans 256 points dans la dimension  $^{15}\text{N}$ , largeur spectrale : 12,6 ppm en  $^1\text{H}$  et 36 ppm en  $^{15}\text{N}$ , porteuse 4,7 ppm en  $^1\text{H}$ , 118 ppm en  $^{15}\text{N}$ , 30°C).

#### – *Protocole classique de reconstitution des HDL avec l'ApoA1r*

Ce protocole se base sur les travaux de l'équipe de Peter Lerch [353]. Il consiste à ajouter 5,5 mg de POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) et 3 mg d'acide cholique à 0,5 ml de tampon (Tris 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 0,005%,  $\text{NaN}_3$  1mM). Le mélange est incubé durant 1h à 4°C sous agitation. Les phospholipides forment alors des micelles stabilisées par le cholate. L'équivalent de 2 mg d'ApoA1 est ensuite rajouté (ratio protéine/lipide de 1 : 150) suivi d'une incubation pendant 16h à 4°C sous agitation. 5 dialyses sont enfin réalisées sur 3 jours afin d'éliminer l'acide cholique.

– *Second protocole pour la reconstitution des HDL avec l'ApoA1r*

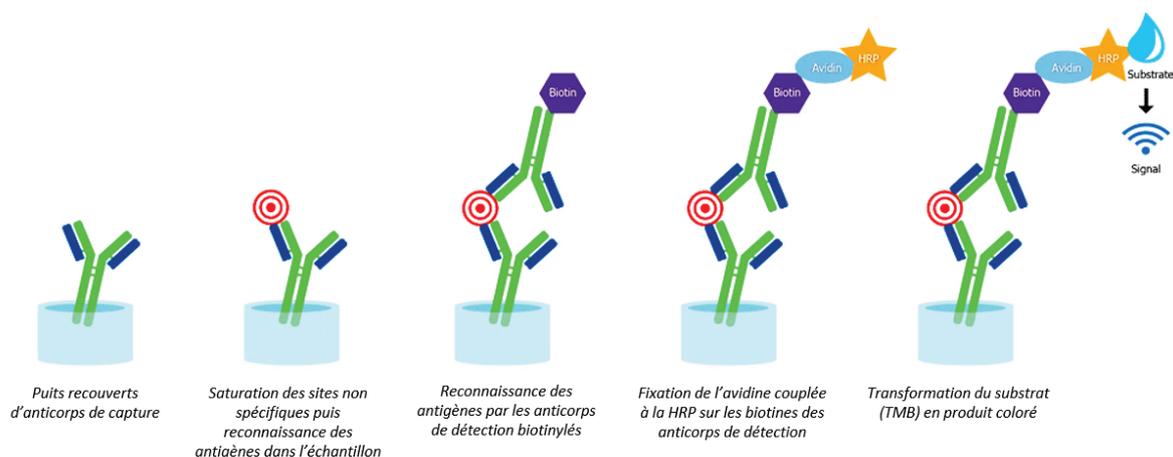
Ce protocole sur les travaux de l'équipe de Cesar Martin. Le phospholipide est dissout dans du chloroforme/méthanol (2 :1) puis séché à l'azote. Après dissolution de l'échantillon sec dans du tampon (Tris 10 mM, pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM) 10 cycles de congélation (-196°C(N<sub>2</sub> liquide)/décongélation(25°C) sont effectués. La température a été adaptée d'après la T<sub>m</sub> (température de fusion) du POPC qui est de -2°C. On ajoute ensuite au POPC, une quantité équimolaire de cholate de sodium, puis l'ApoA1 est ajoutée à raison d'une molécule de protéine pour 100 lipides. Après incubation à 37°C sur la nuit dans un Thermomixer à 800 rpm, l'échantillon est dialysé 3 fois, puis centrifugé (10 min à 14 000 rpm) et enfin filtré (0,22 µm). Les HDL reconstituées sont conservées à 4°C.

– *Prétraitement de cellules de la lignée EA.hy926 avec l'ApoA1r et les HDLr et mesure de la sécrétion des cytokines proinflammatoires*

Afin de déterminer les capacités anti-inflammatoires de l'ApoA1, nous avons utilisé des cellules EA.hy926 sur lesquelles nous avons effectué un pré-traitement avec l'ApoA1r, sous forme libre ou sous forme de HDLr, suivi d'une induction de l'inflammation par le TNF-α. Nous avons ensuite évalué l'inflammation en déterminant la sécrétion des cytokines inflammatoires IL-6 et MCP-1. Les EA.hy926 sont une lignée humaine de cellules hybrides immortalisées utilisées comme modèle pour l'étude de l'endothélium vasculaire. Cette lignée est issue de la fusion de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine avec des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain A549, obtenue par exposition au polyéthylène glycol (PEG). Le milieu HAT (hypoxanthine, aminoptérine, thymidine) est utilisé pour la sélection de l'hybridome [354]. Les cellules sont mises en cultures en plaques 6 puits (3.10<sup>5</sup> cellules/puits) dans un milieu DMEM (10% sérum de veau fœtal (SVF), 10% L-Glu, 2% amphotéricine B, 10% pénicilline/streptomycine, 2% HAT) laissées sous incubation (sous atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C) jusqu'à obtention de la confluence. Chaque condition est réalisée en triplicata. Le schéma des traitements réalisés est représenté ci-dessous :



L'ApoA1 filtrée est préparée dans du PBS 1X, et le véhicule correspond au tampon dans lequel a été reconstitué les HDL (Tris 10 mM, pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM). Entre les 16 h de prétraitement et les 4 h de stimulation au TNF- $\alpha$ , le milieu de culture est éliminé. Pour des raisons de disponibilité, la concentration d'ApoA1 de 16  $\mu$ M a été déterminée par la concentration minimale suffisante pour mettre en évidence un effet anti-inflammatoire de l'ApoA1 dans la littérature [308], bien que la concentration de 32  $\mu$ M soit également classiquement utilisée et plus proche des taux plasmatiques [355, 356]. Le surnageant est prélevé et les cellules sont récupérées après rinçage. La mesure de l'expression protéique des cytokines IL-6 et MCP-1 a été réalisé par méthode ELISA « Sandwich » en plaque 96 puits selon le protocole fourni par le fabricant (eBioscience). Le principe se base sur la reconnaissance spécifique des cytokines IL-6 et MCP-1 présents dans les échantillons, d'abord par un anticorps de capture fixés à la plaque, puis par un anticorps de détection biotinylés. L'avidine couplée à la HRP (Horseradish Peroxidase) se fixe ensuite sur les biotines des anticorps de détection. La révélation se fait grâce au TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine), qui est le substrat de la HRP. Sa transformation enzymatique donne un produit coloré (bleu puis jaune après l'arrêt de la réaction par le HCl 0,2N). Une quantification des cytokines se fait alors par un dosage colorimétrique ( $A_{450nm}$ ) (Figure 86).



© 2016 Rockland Immunochemicals, Inc.

Figure 86 : Principe de l'ELISA sandwich.  
Utilisé pour la détection d'IL-6 ou MCP-1 (antigènes) dans les surnageants cellulaires.

## Résultats et interprétation :

### a) Caractérisation structurale de l'ApoA1r marquée par RMN et reconstitution de HDL

#### i. Analyse de l'état de repliement de l'ApoA1r marquée par fluorescence et par RMN

##### – Analyse de l'état de repliement de l'ApoA1 par spectroscopie en fluorescence

La fluorescence intrinsèque de l'ApoA1r est due à la présence de quatre résidus tryptophane (Trp) au sein de sa séquence. La fluorescence étant extrêmement sensible aux variations structurales des protéines qui entraînent une modification de l'environnement électronique de ces résidus Trp, nous pouvons comparer l'ApoA1 plasmatique et l'ApoA1 recombinante ainsi que la modification de leur spectre d'émission de fluorescence en présence d'un agent dénaturant tel que l'urée.

L'analyse des spectres montre une différence de l'intensité de fluorescence en fonction de l'origine de l'ApoA1, associée à un décalage de la longueur d'onde d'émission maximale ( $\lambda_{\max}$ ) qui passe de 340 nm à 356 nm suite à la dénaturation de l'ApoA1 en présence d'urée. Cette observation est valable aussi bien pour l'ApoA1r que pour l'ApoA1p (Figure 87).

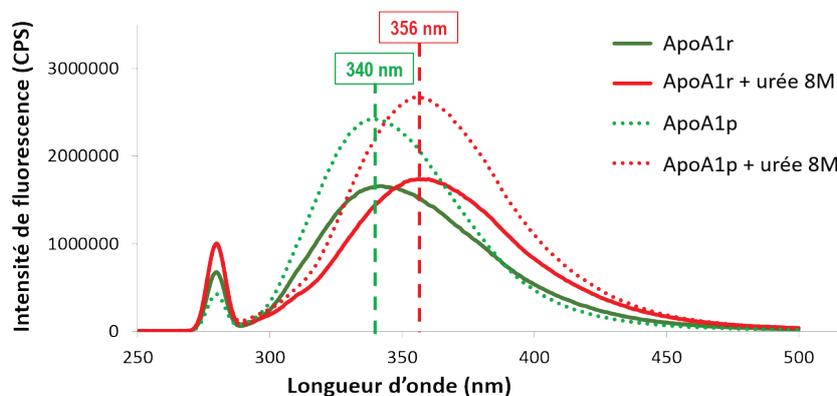


Figure 87 : Comparaison des spectres de fluorescence de l'ApoA1r et l'ApoA1p. En présence (courbes rouges) et en absence (courbes vertes) d'urée.

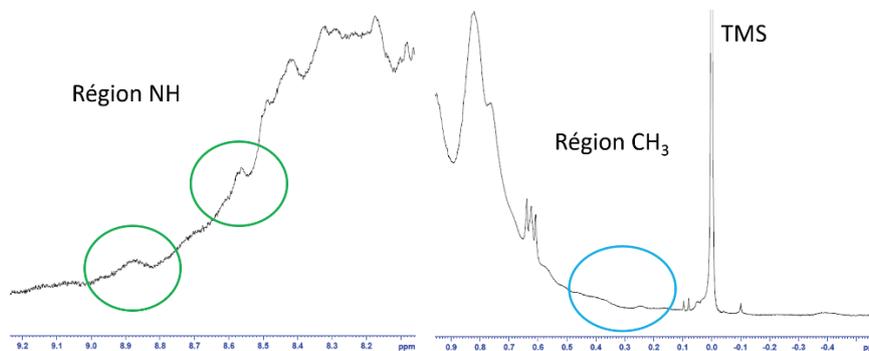
Ce résultat indique que pour les deux ApoA1, les résidus Trp se retrouvent exposés au solvant par le dépliement de la protéine (valeur typique de la  $\lambda_{\max}$  à 356 nm) et donc que leur environnement devient plus hydrophile avec la dénaturation en présence d'urée. La  $\lambda_{\max}$  à 340 nm en absence d'urée correspond aux résidus Trp dans un environnement plutôt hydrophobe, en accord avec un repliement au moins partiel de la protéine. Ces données sont également

compatibles avec l'hypothèse d'un niveau de repliement similaire entre l'ApoA1r marquée et l'ApoA1p.

La différence d'intensité de fluorescence entre les pics à 340 nm des deux types d'ApoA1 pourrait en partie être due à la présence de l'étiquette de fusion (6His + site de la thrombine) sur l'ApoA1r. En effet, on mesure une diminution d'environ 30% de l'intensité de l'émission de fluorescence pour l'ApoA1r (recombinante/plasmatique=0,7). Etant donné qu'un des 4 résidus Trp est situé seulement 4 résidus après l'étiquette (*Figure 81*), il est possible qu'il y ait une modification de l'environnement et un quenching partiel de la fluorescence de ce Trp. Une répétition de l'expérience avec un dosage plus précis pourrait écarter la possibilité d'une erreur d'estimation de la concentration.

– *Analyse de la structuration de l'ApoA1r par RMN homo- et hétéronucléaire*

La RMN permet dans un premier temps d'évaluer l'état de repliement de la protéine. L'ApoA1 marquée  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  peut être détectée par RMN du  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  ou  $^{13}\text{C}$ . La RMN  $^1\text{H}$  à une dimension mesure uniquement le signal du proton (homonucléaire) et donne déjà une idée du repliement ou non d'une protéine. La RMN à 2 dimensions utilisée ici, se base sur le couple  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  pour la détection des couplages scalaires à une liaison  $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ . La RMN 1D  $^1\text{H}$ , réalisée sur l'ApoA1r permet déjà de détecter des signaux caractéristiques dans les régions NH et  $\text{CH}_3$  indiquant l'existence de zones structurées au sein de la protéine (*Figure 88*).

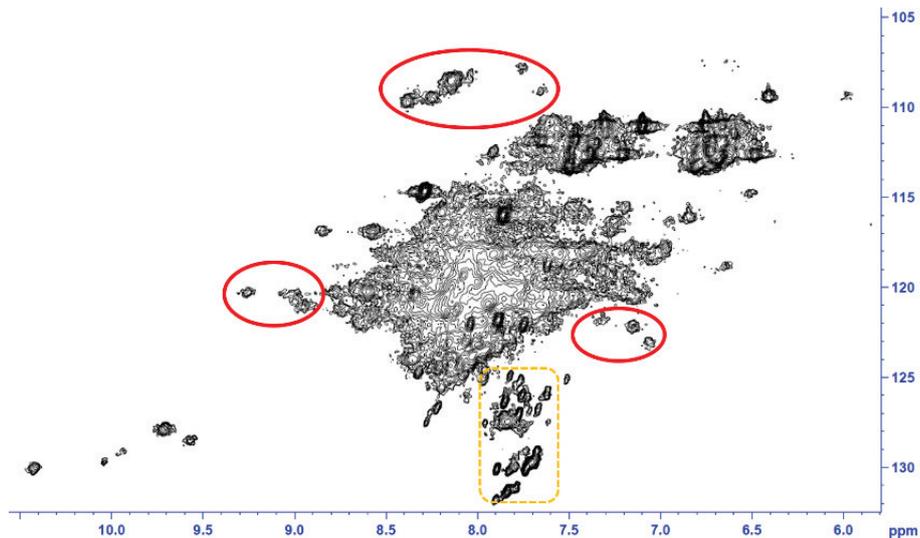


*Figure 88 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  1D de l'ApoA1r marquée à 100  $\mu\text{M}$ .*

*Les signaux de structuration sont présents dans les régions des groupements NH sont entourés (en vert) et  $\text{CH}_3$  (en bleu).*

Ce résultat a été confirmé par la RMN 2D hétéronucléaire  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  (en HSQC). On obtient un spectre 2D se composant de tâches de corrélation H-N dont l'image globale constitue une empreinte de la protéine et de son état de repliement. L'analyse des spectres a permis de mettre en évidence des pics bien distincts montrant une structuration partielle de l'ApoA1r, contrairement aux signaux concentrés au centre du spectre qui suggèrent qu'une partie

importante de la protéine n'est pas structurée ou partiellement structurée en hélices- $\alpha$ , structures connues comme produisant une faible dispersion des signaux RMN des NH comparée à des structures en feuillets- $\beta$  (*Figure 89*). Ce résultat est en accord avec la littérature. En effet, nous avons vu qu'en absence de phospholipides l'ApoA1, dont la structure est presque exclusivement constituée d'hélices- $\alpha$ , n'adopte pas un repliement stable mais existe sous forme de « globule fondu » [267].



*Figure 89 : Spectre RMN 2D HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de l'ApoA1r marquée à 265  $\mu\text{M}$ . Des signaux montrent la structuration partielle de la protéine (entourés en rouge), d'autres témoignent d'une dégradation partielle par la thrombine (encadrés en jaune).*

La comparaison des spectres obtenus avec l'ApoA1 de plasma humain (ApoA1p) purifiée à partir de CSL-111 par délipidation, montre une forte similarité des signaux (*Figure 90*). Ce résultat suggère que l'ApoA1 recombinante présente une structuration similaire à l'ApoA1 extraite à partir de plasma humain.

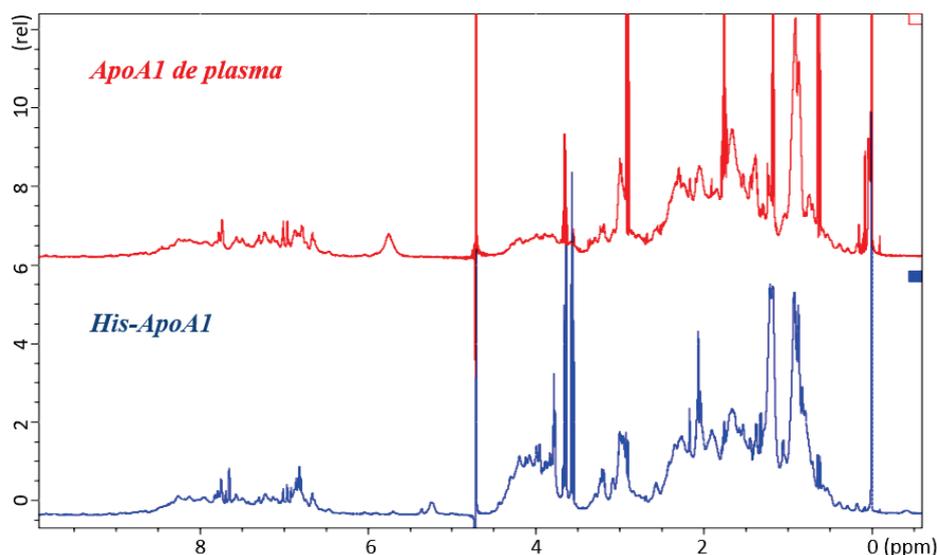


Figure 90 : Comparaison des spectres RMN  $^1\text{H}$  de l'ApoA1r et l'ApoA1p. Protéine His-ApoA1 (bleu) et ApoA1 purifiée de plasma (rouge).

## ii. Synthèses de HDL reconstituées à partir de l'ApoA1r

Avant d'arriver sous forme circulante dans le plasma, l'ApoA1 est associée à quelques lipides au niveau du foie et de l'intestin grêle, lieux de sa synthèse. Cette association lui permet d'initier sa transformation en HDL naissant. Afin de comprendre la liaison de l'ApoA1 à des partenaires, il est donc important de l'étudier sous forme de HDL reconstituées, dans laquelle est adoptera sa conformation fonctionnelle, en l'associant à des phospholipides. C'est le plus souvent sous la forme de HDL discoïdaux que l'ApoA1 est étudiée dans la littérature. Précisons que l'étiquette de fusion n'est à priori pas une limite pour l'étape de reconstitution étant donné que c'est la partie C-terminale de l'ApoA1 qui est primordiale pour l'interaction avec les phospholipides et l'initiation de la formation des HDL.

### – Analyse des HDL reconstitués par le protocole classique

Les HDLr obtenus ont été analysés par DLS afin d'évaluer la taille des particules et leur distribution dans l'échantillon brut. Une taille moyenne de 20 nm a été mesurée pour la particule majoritaire. Notons que l'intensité n'est pas proportionnelle à la quantité et qu'une particule de taille plus importante contribuera plus fortement au signal (Figure 91). La molécule de HDL a généralement une taille entre 10 et 15 nm, par conséquent, la taille obtenue ici n'apparaît pas satisfaisante. Un second protocole a alors été utilisé afin de déterminer la cause de cette différence.

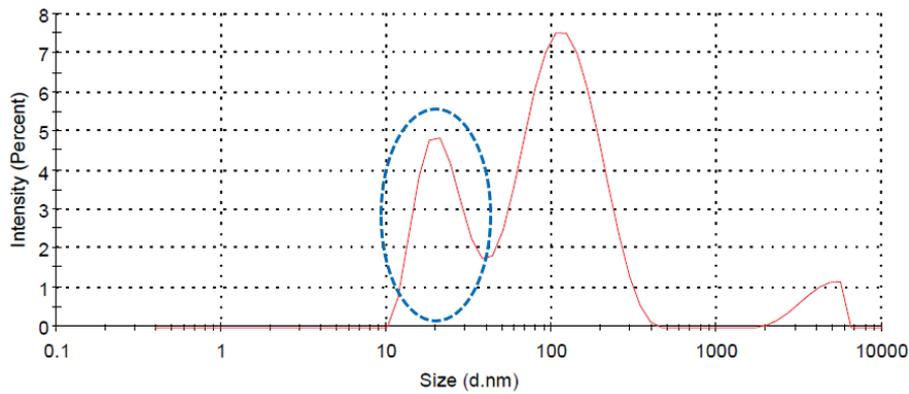


Figure 91 : Analyse de la taille des HDLr avec l'ApoA1r par DLS.  
 Mesure de la distribution des tailles de particules dans l'échantillon brut de HDLr avec l'ApoA1r marquée. La population majoritaire d'une taille moyenne de 20 nm de diamètre est entourée en bleu.

– Analyse des HDL reconstitués par le second protocole (de l'équipe de Cesar Martin)

Les mesures réalisées par DLS montrent que le pic principal de ces HDLr obtenus selon le second protocole correspond à des particules de taille identique à celle obtenue à l'aide du premier protocole (environ 20 nm). La reconstitution de HDL avec le POPC uniquement a déjà été réalisée dans la littérature avec l'obtention d'une taille de 10 à 12 nm [357]. Il est possible que l'ApoA1r produite ne se comporte pas comme l'ApoA1 plasmatique pour la formation de HDL. Cela pourrait être dû à la présence du tag His. Pour vérifier cette hypothèse, des HDLr ont été préparées avec du POPC et de l'ApoA1 purifiée de plasma humain (ApoA1p). L'analyse des HDLr résultantes par DLS montre un pic majoritaire correspondant à une taille de particules de 12 nm. (Figure 92). Cette valeur est en accord avec la taille attendue. Cette observation suggère que la présence du tag non clivé modifie l'interaction de l'ApoA1 avec le POPC, aboutissant à des HDLr de taille environ deux fois plus élevée que la taille attendue.

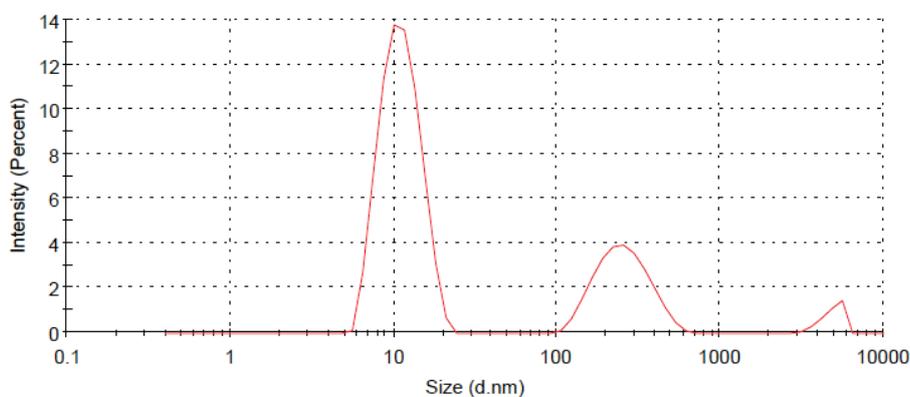


Figure 92 : Analyse de la taille des HDLr avec l'ApoA1p par DLS.  
 Mesure de la distribution des tailles de particules dans l'échantillon brut de HDLr avec l'ApoA1 extraite de plasma humain.

– Analyse par RMN HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  des HDLr avec l'ApoA1 recombinante marquée

L'analyse des HDLr préparés avec la protéine His-ApoA1, par RMN HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  montre une disparition de la plupart des signaux comparés à ceux de l'ApoA1r marquée observés précédemment (Figure 93). Ceci indique que la présence de phospholipides autour de la protéine diminue fortement son temps de relaxation, masquant ainsi son signal. Cela peut aussi s'expliquer par la taille importante du HDL.

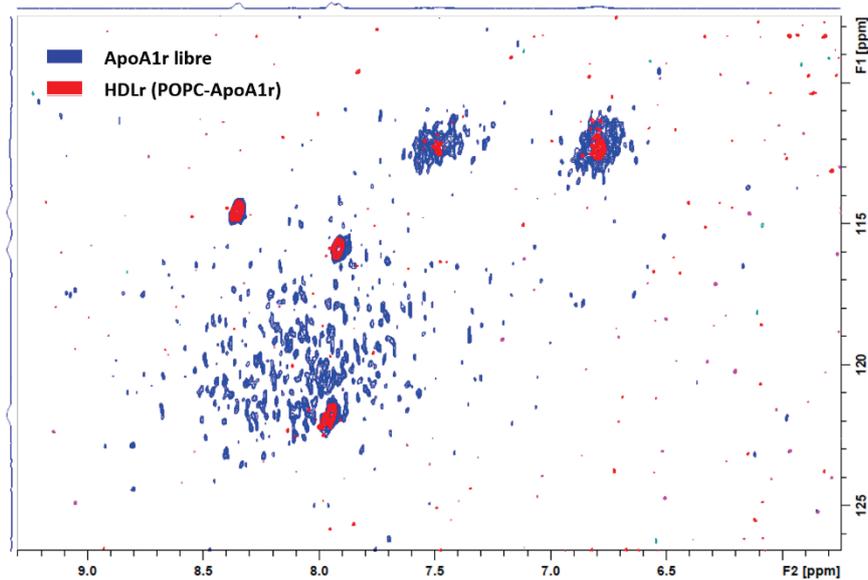


Figure 93 : Spectres RMN 2D HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de l'ApoA1r marquée, libre ou sous forme HDLr. ApoA1r marquée non clivée à 200  $\mu\text{M}$  (en bleu) et HDLr préparés à partir de la même ApoA1r 200  $\mu\text{M}$  (en rouge).

En conclusion, bien que repliement de l'ApoA1r libre apparaisse globalement similaire à celui de l'ApoA1p (résultat RMN  $^1\text{H}$ ), le tag présent à l'extrémité N-ter apporte une variation locale de la structure primaire de l'ApoA1r et par conséquent de sa conformation locale. De plus, la taille des HDLr obtenue avec cette His-ApoA1 est différente de celle obtenue avec l'ApoA1 plasmatique. Ce résultat suggère une interaction différente de l'ApoA1 avec les phospholipides.

L'objectif principal étant l'étude de l'interaction protéine-ligand, il est nécessaire d'évaluer les propriétés fonctionnelles de cette ApoA1r. En effet, la fonction d'une protéine dépend de ses propriétés de liaison ou de reconnaissance. Si les fonctions antioxydantes sont liées principalement à la séquence en acides aminés, les fonctions impliquant une signalisation sont davantage dépendantes de la reconnaissance spécifique et donc d'un repliement fidèle à celui de la protéine native. Pour évaluer la fonctionnalité de ApoA1r (libre ou sous forme de HDLr) nous sommes focalisés sur l'étude de ses propriétés anti-inflammatoires.

### b) Evaluation de la fonctionnalité de l'ApoA1r et des HDLr

Les capacités anti-inflammatoires de l'ApoA1r (His-ApoA1) libre ou sous forme de HDLr ont été évaluées sur des cellules EA.hy926. Une mesure des cytokines inflammatoires IL-6 et MCP-1 par ELISA est réalisée suite au prétraitement des cellules par l'ApoA1r ou les HDLr (concentrations de 16  $\mu$ M), suivi d'une induction de l'inflammation par le TNF- $\alpha$ .

Les valeurs sont exprimées en pourcentage du taux de cytokine sécrétée par rapport à la condition avec le TNF- $\alpha$  seul pour laquelle ce taux est considéré à 100% (Figure 94). Les résultats montrent une sécrétion importante des cytokines en présence du TNF- $\alpha$  par rapport au véhicule. Cette sécrétion importante en IL-6 est significativement réduite pour les cellules prétraitées avec les HDLr à partir de l'ApoA1r, mais pas les cellules traitées avec l'ApoA1r seule. En revanche, aucun effet du prétraitement avec l'ApoA1r ou les HDLr n'est observé pour la sécrétion de MCP-1. Etant donné qu'un effet anti-inflammatoire efficace de ces mêmes quantités d'ApoA1 libre a déjà été démontré pour les deux cytokines [308], il semblerait que la présence du tag interfère avec les capacités anti-inflammatoires de l'ApoA1.

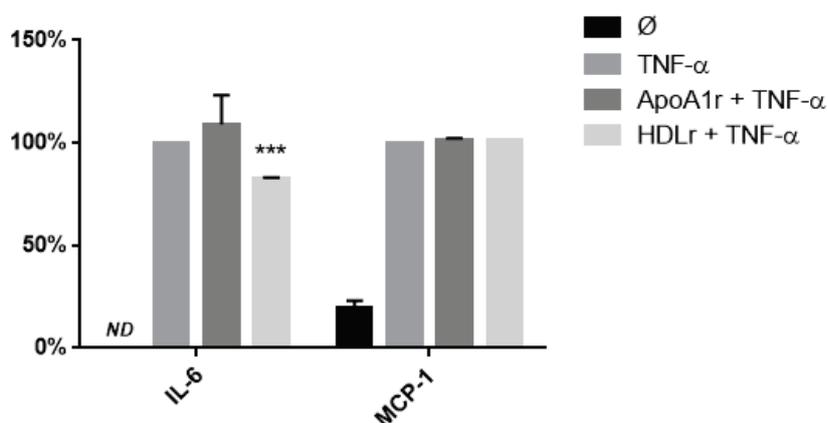


Figure 94 : Evaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'ApoA1r sur cellules endothéliales. Effet du prétraitement des cellules Ea.Hy926 avec la His-ApoA1 et les HDLr (16  $\mu$ M d'équivalent en His-ApoA1) sur le taux d'IL-6 et MCP-1 dans le surnageant de culture après stimulation au TNF- $\alpha$ . \*\*\* Test t de Student non-apparié comparé à la condition en présence de TNF- $\alpha$ . P-value = 0,0008 (n=2).

En conclusion et en considérant l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons supposer que l'ApoA1r ne peut pas être utilisée sans avoir effectué au préalable le clivage du tag His pour les études d'interaction utilisant la RMN. Nous proposons donc une solution alternative, l'utilisation de la technique ITC pour l'étude des interactions et qui présente l'avantage de ne pas nécessiter de marquage préalable de la protéine. Nous avons utilisé dans un premier temps des HDLr commerciaux (CSL-111), composés uniquement d'ApoA1 purifié de plasma (ApoA1p) et des phospholipides extraits de graines de soja, un modèle très utilisé dans la littérature [358, 359].

### 3. Etude des effets de la glycation des HDL sur l'interaction avec les partenaires de liaison

#### **Objectifs :**

Trois ligands de natures différentes ont été sélectionnés pour cette étude d'interaction : l'alpha-1-antitrypsine ( $\alpha$ 1AT), la sphingosine-1-phosphate (S1P) et les microARN. Ces molécules sont en partie transportées par les HDL et possèdent des propriétés régulatrices qui leur confèrent un rôle déterminant dans la préservation de l'intégrité vasculaire. Un peu comme l'albumine transporte les molécules endogènes et les médicaments, les HDL lient puis libèrent ces ligands, dont une distribution diminuée s'avère potentiellement athérogène. L'étude des effets de la glycation sur la capacité des HDL à véhiculer ces molécules protectrices est donc intéressante pour la compréhension du lien existant entre l'état diabétique et le risque d'athérosclérose.

#### **Méthodes :**

##### – *Cinétique de la glycation de l'ApoA1 et des HDL par fluorescence*

Une cinétique de la glycation de l'ApoA1 libre ou des CSL-111 a été réalisée et suivie par mesure de la fluorescence du Trp ( $\lambda_{\text{excit}}$  : 280 nm) et des AGE ( $\lambda_{\text{excit}}$  : 370 nm) toutes les heures pendant les 48 h d'incubation de l'ApoA1r avec le méthylglyoxal. La technique de fluorescence étant très sensible, la concentration de protéine utilisée est de 1  $\mu$ M pour l'ApoA1 libre et de 5  $\mu$ M pour les CSL-111 (concentration en ApoA1), en présence de 3 mmol MGO par gramme de protéine, proportion classiquement utilisée dans la littérature [272].

##### – *Glycation des HDLr commerciaux : CSL-111*

Les HDLr (CSL-111) sont incubés avec du MGO (3 mmol par gramme d'ApoA1) pendant 24 h à 37°C. Les échantillons sont ensuite dialysés 4 fois sur 3 jours dans une solution de sérum physiologique (pH 7,3 NaCl 9 g/L), le tampon de conservation des CSL-111.

##### – *Titration par la méthode ITC*

Différents tests ont été effectués avec des rapports de concentrations ligand/protéine de 10 à 20, tel qu'il est recommandé dans la littérature. Nous avons finalement retenu une concentration en CSL-111 de 50  $\mu$ M dans la cellule, et une concentration en ligand voisine de 1 mM dans la seringue pour obtenir un signal suffisant. La titration a été réalisée en ajoutant le ligand en 18 injections de 2  $\mu$ l (précédée d'une 1<sup>ère</sup> injection de 0,4  $\mu$ l) dans la cellule contenant les CSL-111, espacées d'un temps de retour à l'équilibre de 150 sec, pour une durée totale de titration de 50 min.

– *Préparation des ligands*

Pour la préparation de l'alpha 1-antitrypsine, le médicament appelé Zemaira (lyophilisat de 1 g d' $\alpha$ 1AT) est dialysé contre une solution de sérum physiologique (le même que celui des CSL-111). Le médicament purifié à une concentration en  $\alpha$ 1AT de 50 mg/ml (1g pour 20 ml final) est alors conservé à -20°C. La sphingosine-1-phosphate ou S1P (73914, Sigma) est dissoute dans 264  $\mu$ l de NaOH 300 mM pour obtenir une concentration finale de 10 mM. Les microRNA lyophilisés (Metabion, Condalab, Spain) ont été repris dans de l'eau DEPC (diethyl-pyrocabonate) en ajoutant un volume précis pour une concentration finale de 1 mM. Les séquences des microARN utilisés sont les suivantes : hsa-miR-33a-5p : 5' gugcauuguaguagcauugca 3', hsa-miR-33a-3p : 5' caauguuuccacagugcaucac 3', hsa-miR-223-5p : 5'cguguauuugacaagcugaguu3', hsa-miR-223-3p 5' ugucaguuuuguaaaauacccca 3'.

***Résultats et interprétation :***

***a) La glycation de l'ApoA1 et des HDL***

***i. Cinétique de la glycation de l'ApoA1 par fluorescence***

La glycation de l'ApoA1r est réalisée avec du MGO à 3 mmol/g. L'évolution des émissions de fluorescence du Trp et des AGE a été suivie durant 48h d'incubation de l'His-ApoA1 avec le methylglyoxal (*Figure 95*). On observe une diminution presque linéaire de l'émission maximum de fluorescence du Trp jusqu'à sa quasi-stagnation à 37h. Parallèlement une augmentation de la fluorescence des AGE (pic à 450 nm) est observée avec 3 phases principales : la 1<sup>ère</sup> phase (phase de latence) avec une pente faible, la 2<sup>nde</sup> phase à partir de 10h au cours de laquelle la formation d'AGE s'accroît puis la 3<sup>ème</sup> phase à partir de 25h d'incubation, avec une pente nettement plus forte.

Une variation similaire est observée pour la glycation de l'ApoA1 purifiée de plasma, concernant l'évolution inversée de la fluorescence du Trp et de celle des AGE. Cependant, la glycation semble beaucoup plus lente que pour l'ApoA1r, le plateau n'est pas atteint pour le signal du Trp et l'apparition des AGE n'atteint pas sa phase d'accélération (*Figure 96*).

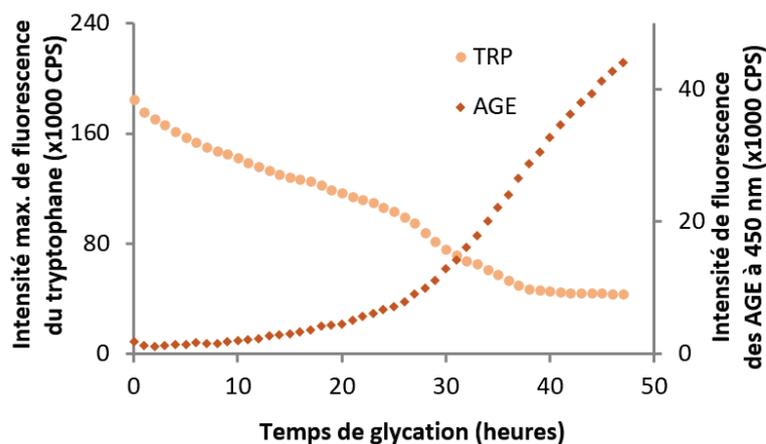


Figure 95 : Cinétique de la glycation de la protéine His-ApoA1 par le MGO. Suivi sur 48h de la glycation de l'ApoA1 à  $1\mu\text{M}$  avec MGO à  $3\text{ mmol/g}$  sur 48h par spectroscopie de fluorescence pour le Trp (excitation à  $280\text{ nm}$ ) et les AGE (excitation à  $370\text{ nm}$ ).

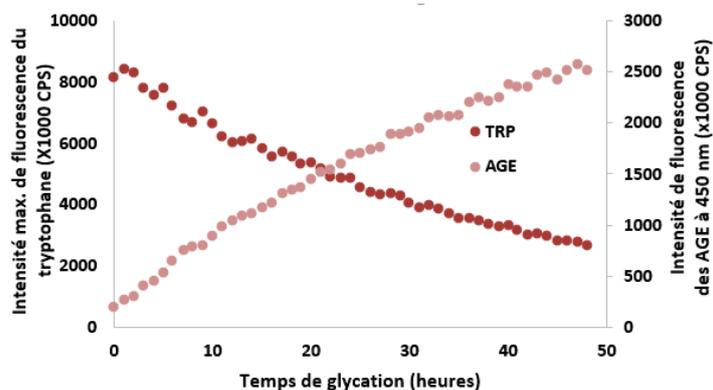


Figure 96 : Cinétique de la glycation de l'ApoA1p par le MGO. Suivi de la glycation de l'ApoA1 purifiée de plasma à  $5\mu\text{M}$  avec le MGO ( $3\text{ mmol/g}$ ) sur 48h par spectroscopie de fluorescence pour le Trp (excitation à  $280\text{ nm}$ ) et les AGE (excitation à  $370\text{ nm}$ ).

Concernant l'ApoA1r, le suivi de l'évolution de la longueur d'onde de fluorescence maximale du Trp pour différents temps de glycation de l'ApoA1 (0, 24h et 48h) (Figure 97) montre que la diminution de l'intensité de fluorescence du Trp (effet hypochrome) s'accompagne d'un décalage du maximum d'émission vers les longueurs d'onde élevées (effet bathochrome). Ceci n'est pas observé pour l'ApoA1 purifiée de plasma, pour laquelle le maximum d'émission de fluorescence est détecté à  $340\text{ nm}$  pour toute la durée de l'incubation, ce qui suggère une modification conformationnelle plus marquée pour l'ApoA1r (His-ApoA1).

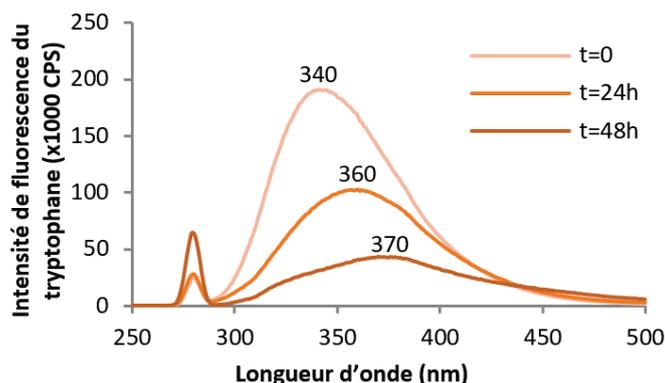


Figure 97 : Décalage de la  $\lambda_{max}$  de fluorescence de la His-ApoA1 au cours de la glycation. Spectres d'émission de fluorescence du Trp pour 3 temps de glycation de l'ApoA1 par le MGO à 3 mmol par g de protéine (0, 24, 48h). Les longueurs d'onde d'émission maximale sont indiquées en nm.

Pour l'ApoA1r comme pour l'ApoA1p, la glycation par le méthylglyoxal entraîne donc une diminution de la fluorescence du tryptophane, parallèlement à l'apparition des AGE fluorescents. Ce phénomène serait commun à toutes les protéines et s'expliquerait par un transfert d'énergie ayant lieu entre les résidus Trp et les AGE formés lors de la glycation [360].

## ii. Glycation des HDLr commerciaux : CSL-111

La cinétique de glycation des CSL-111 par spectroscopie de fluorescence a également été réalisée. De manière similaire, on observe une diminution de l'intensité de fluorescence du Trp parallèlement à une augmentation de celle des AGE fluorescents (Figure 98).

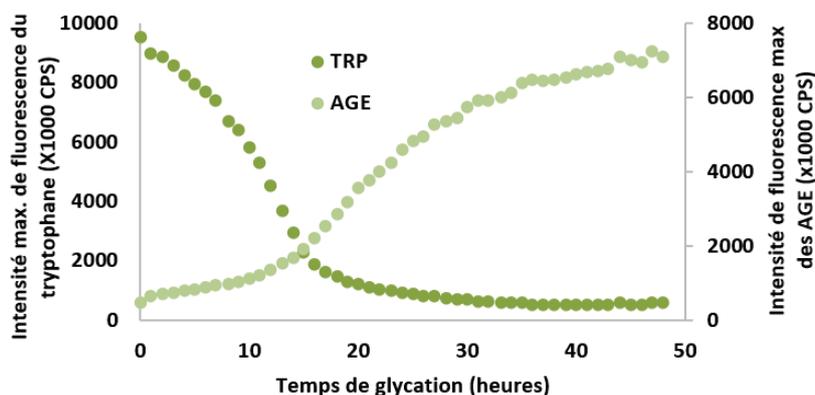


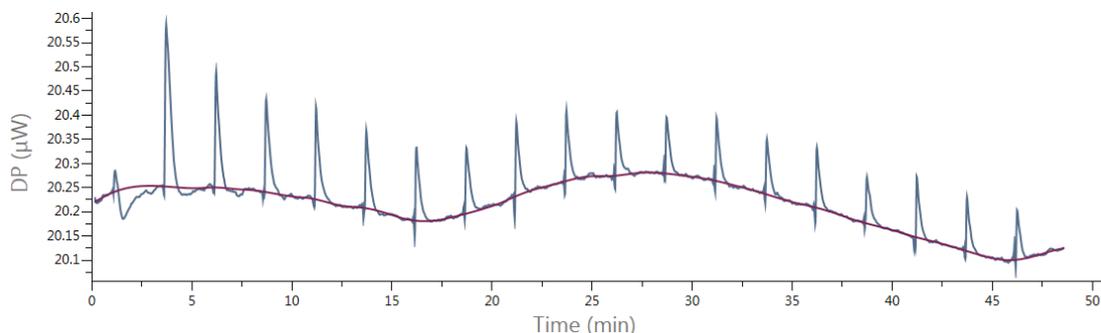
Figure 98 : Cinétique de la glycation des HDLr commerciaux. Suivi de la glycation des CSL-111 à 5  $\mu$ M d'ApoA1 avec le MGO (3 mmol/g) sur 48h par spectroscopie de fluorescence pour le Trp (excitation à 280 nm) et les AGE (excitation à 370 nm).

Si on compare l'évolution des courbes cinétiques, on observe une glycation beaucoup plus rapide pour l'ApoA1 sous forme de HDLr (CSL-111) (Figure 96), que pour l'ApoA1 libre (purifiée de plasma) (Figure 98), indiquée par une pente beaucoup plus marquée pour l'apparition des AGE

fluorescents comme pour la diminution de l'intensité de fluorescence du Trp qui atteint sa valeur minimale dès 30 heures. Les longueurs d'onde d'émission maximale ont également été mesurées pour les CSL-111 : elle passe de 339 à 429 nm (pour le Trp) et de 322 à 336 nm (pour les AGE) entre l'état initial et la fin des 48 h de glycation (résultat non présenté), ce qui indique un changement conformationnel plus marqué pour l'ApoA1 dans sa forme de HDLr.

### ***b) Les conditions requises pour l'expérimentation en ITC***

L'utilisation de la méthode ITC nécessite une bonne pureté de la protéine et du ligand, la détermination précise des valeurs de concentrations, ainsi qu'un tampon strictement identique pour les deux partenaires. Des dialyses ou de fortes dilutions sont des solutions pouvant permettre d'éviter le phénomène de « buffer mismatch », qui correspond au signal dû à la dilution d'un tampon dans un tampon différent qui s'accompagne d'un échange de chaleur, entraînant un masquage plus ou moins important des signaux d'interaction. Les valeurs d'un « titrage-contrôle » correspondant au ligand injecté dans le tampon seul, doivent généralement être soustraites de celles du titrage d'interaction protéine-ligand. En effet, sous l'effet de la dilution, le ligand peut subir un changement conformationnel induisant une variation calorifique détectable (*Figure 99*). Des contrôles ont donc été systématiquement effectués.

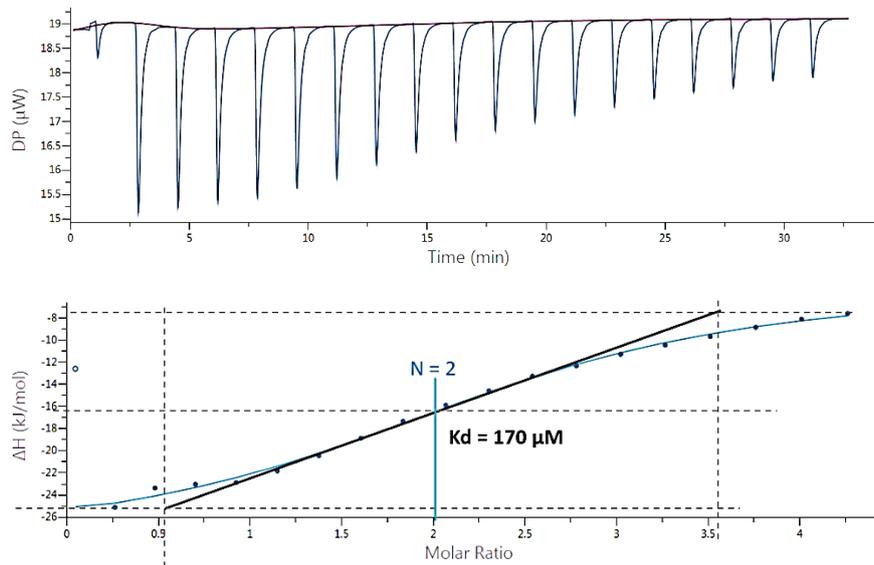


*Figure 99 : Signal de dilution du liraglutide en ITC. Effet dû à la chaleur de dilution du liraglutide (480 µM, seringue) dans le tampon borate 50 mM pH 7,5 (cellule) par injections de 2 µL (excepté la première injection de 0,4 µL).*

### ***c) L'alpha-1-antitrypsine***

L'alpha 1-antitrypsine ( $\alpha$ 1AT), protéine anti-inflammatoire, joue un rôle de protection cellulaire contre les enzymes libérées dans le sang lors de l'inflammation. Elle est transportée par les HDL et possède donc potentiellement une action protectrice non négligeable sur les cellules endothéliales. D'ailleurs, sa déficience augmente le risque cardiovasculaire [361]. Si sa liaison aux HDL est altérée par la glycation, sa distribution aux tissus cibles pourrait être affectée et donc son action moins efficace.

Les premières titrations de l' $\alpha$ 1AT avec les CSL-111 n'ont pas montré de différence d'affinité pour l' $\alpha$ 1AT entre les CSL-111 glyquées et non-glyquées (nombre de sites  $n$  entre 1,8 et 2,3 et  $K_d$  entre 10 et 20  $\mu$ M pour l'analyse par le logiciel Malvern et entre 100 et 200  $\mu$ M par une analyse manuelle. Un exemple d'analyse manuelle de résultat ITC obtenu pour l' $\alpha$ 1AT entre les CSL-111 glyquées est présenté en *Figure 100*.



*Figure 100 : Analyse d'un résultat ITC pour l'interaction de l' $\alpha$ 1AT avec les CSL-111 glyqués. Analyse manuelle du nombre de site ( $N$ ) et du  $K_d$ .*

Une mauvaise reproductibilité de l'expérience a été observée, en lien avec une dégradation rapide de l' $\alpha$ 1AT au cours du temps. Une optimisation des étapes de préparation et de conservation de l' $\alpha$ 1AT ainsi que de nouvelles expériences de titration pourrait aisément résoudre cette difficulté. L' $\alpha$ 1AT apparaît toutefois comme un ligand bien adapté à la technique ITC, puisqu'elle présente un signal de dilution relativement faible.

#### ***d) La sphingosine-1-phosphate***

La sphingosine-1-phosphate est un médiateur lipidique qui intervient dans diverses voies de régulations, dont la migration et la prolifération mais qui participe également au rôle vasodilatateur des HDL qui les transportent ainsi qu'à leur fonction de stabilisation des jonctions entre les cellules endothéliales [297]. Si la liaison de la sphingosine-1-phosphate aux HDL est altérée en cas de glycation, cela pourrait compromettre son action protectrice sur l'intégrité du tissu cellulaire recouvrant l'intima des artères et contribuer à la fragilisation de l'endothélium qui est l'évènement initiateur de l'athérogénèse.

La première difficulté de l'étude d'interaction avec la S1P est sa solubilité. Bien que le méthanol soit le solvant classiquement préconisé, il nécessite un chauffage. Or, le méthanol est très volatile. Le volume doit pouvoir être mesuré précisément pour déterminer une concentration précise. Une recherche supplémentaire nous a orienté sur l'utilisation d'une solution de NaOH 0,3 M dans laquelle la S1P présente une solubilité de 4 mg/ml mais précipite en dessous d'un pH de 7,5 (fiche produit sur [www.caymanchem.com](http://www.caymanchem.com)). La dissolution a ainsi été rapide à 4 mg/ml soit 10,5 mM. Cependant, quel que soit le solvant, le tampon doit être identique pour le ligand et la protéine et correspondre à des conditions compatibles avec l'étude d'interactions biomoléculaires. Une dilution au 1/10<sup>ème</sup> a été envisagée, les tests ont été effectués avec un tampon concentré afin que l'ajout de NaOH aboutisse à un pH de 8, l'absence de « buffer mismatch » a été vérifié pour le tampon final. Cependant, la S1P a précipité lors de la dilution à 1 mM.

L'amélioration de la méthode RMN en HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N pour la détection des HDLr à partir d'ApoA1 marquée pourrait permettre une étude de l'interaction avec la S1P en faisant préalablement une titration vérifiant l'effet négligeable de la variation de pH induite par l'ajout de la S1P. La technique de fluorescence pourrait également être appliquée directement sur les CSL-111 après détermination des gammes de concentrations adéquates pour l'étude des interactions.

#### *e) Les microARN*

Les microARN choisis sont : miR-33a-5p, miR-33a-3p, miR-223-5p, miR-223-3p (homo sapiens). Ces ARN sont connus pour être transportés par les HDL et impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique. Les miR-33a et b ciblent les régions introniques des gènes de la SREBP-2 et SREBP1 (Sterol regulatory element-binding proteins). Les miR-223-5p et 3p régulent la synthèse du cholestérol [168].

Lors des premières expériences de titration, un important « buffer mismatch » a été détecté pour l'expérience contrôle avec le miR-33a-5p à 1 mM en eau DEPC (*Figure 101*).

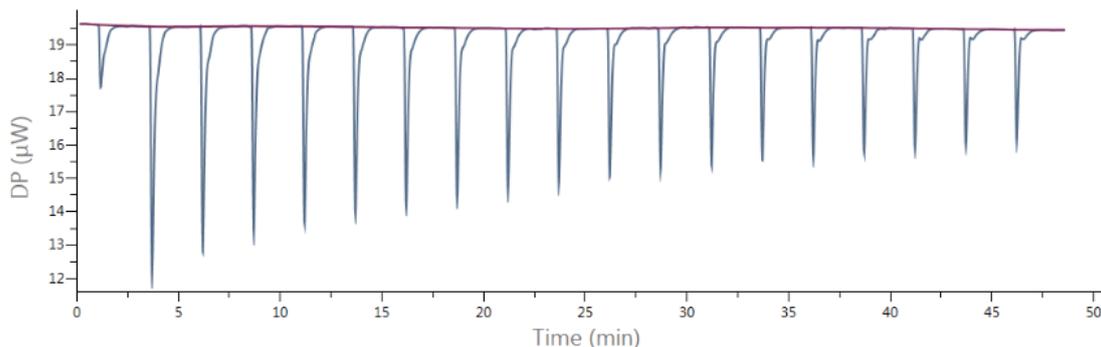


Figure 101 : Titration contrôlée de l'ARN 1 mM en eau DEPC (seringue) dans l'eau DEPC (cellule).

Nous avons alors supposé que les microARN lyophilisés contiennent des sels qu'il conviendra d'éliminer préalablement aux expériences de titration par des méthodes de dessalage ou de précipitation puis re-solubilisation.

### ***Discussion***

La glycation de l'ApoA1, est un paramètre important à prendre en considération car l'étude de son influence peut amener à une meilleure compréhension du dysfonctionnement des HDL, fortement exacerbé dans un contexte diabétique [320]. En effet, le stress oxydant et l'inflammation s'installent dans un cercle vicieux, comme deux processus fortement liés et qui s'autoentretiennent l'un l'autre, et peuvent être initiés entre autres par le processus de glycation. Des études ont montré l'impact de la glycation de l'ApoA1 sur sa fonctionnalité, telle que ses propriétés anti-inflammatoire et antiathérogène, sa capacité à activer la LCAT, son rôle dans l'efflux de cholestérol, ou encore son efficacité à former des HDL en présence de phospholipides [272]. Ainsi, les conséquences de la glycation de l'ApoA1 sur les HDL sont connues sous l'aspect structural et fonctionnel. Cependant, l'influence sur l'affinité de l'ApoA1 glyquée, libre ou associée aux lipides, pour ses différents partenaires liés à la fonction des HDL n'a à ce jour pas été explorée.

Un suivi de la glycation a pu être réalisé par la technique de fluorescence qui présente l'avantage d'être très sensible et ne requiert que quelques nanomoles de protéine. La glycation de l'ApoA1 libre, effectuée dans plusieurs études peut amener à la question de la concordance avec la situation *in vivo*. Cependant, l'ApoA1 étant très soluble et pouvant s'échanger entre lipoprotéines, on peut émettre l'hypothèse que l'ensemble de sa structure puisse être à un moment

donnée exposée à l'hyperglycémie. Pour répondre à cette question, il faudrait comparer les résidus concernés par la glycation pour l'ApoA1 issue de plasma de patients diabétiques avec ceux de l'ApoA1 glyquée *in vitro*, par exemple par spectrométrie de masse. En effet, l'ApoA1 dans le plasma, se retrouve toujours associée aux lipides et sa conformation est modifiée par rapport à sa forme délipidée [267]. Dans le cas d'une étude d'interaction, il paraît donc plus pertinent de considérer l'ApoA1 dans sa forme complexée aux phospholipides.

La RMN est une des techniques les plus adaptées pour l'étude des propriétés de liaison de l'ApoA1 étant donné qu'elle permet un ciblage du signal de la protéine par rapport aux lipides. La méthode RMN offre un panel de paramètres variant avec la liaison (temps de relaxation, diffusion, etc.) permettant l'étude des interactions protéine-ligand. Cependant, pour que le signal de la protéine puisse être détecté dans le complexe protéine-ligand, son marquage est nécessaire. Le marquage aux isotopes stables implique la production d'une protéine recombinante. Nous avons aussi vu que le clivage efficace d'une étiquette de fusion permettant le repliement et la purification de la protéine nécessite de prendre en considération les contraintes d'accessibilité du site de clivage par une protéase spécifique ainsi que l'efficacité de la méthode de purification permettant l'élimination de l'enzyme après clivage. L'ensemble des techniques de recombinaison et de surexpression de l'ApoA1 utilisées dans notre étude ainsi que les résultats obtenus pour les clivages sont résumés dans le schéma de la *Figure 102*.

L'étape de clivage s'avère nécessaire étant donné la perte de fonctionnalité de la protéine observée dans nos résultats préliminaires concernant l'effet anti-inflammatoire évalué sur les EA.hy926 ainsi que la mesure de la taille des HDLr qui apparaît plus importante que la taille attendue. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que le tag qui représente presque 10% du nombre total d'acides aminés de l'ApoA1r peut fortement moduler sa fonctionnalité. Dans le cas de l'ApoA1r, le tag a surtout son importance lors de l'étape de purification par chromatographie permettant d'obtenir une bonne pureté à la protéine. Cependant, l'expression de l'ApoA1 sous forme soluble ne dépend pas uniquement du tag étant donné que l'utilisation d'un plasmide à codons optimisés a permis la surexpression de la protéine His-ApoA1 avec une très bonne solubilité.

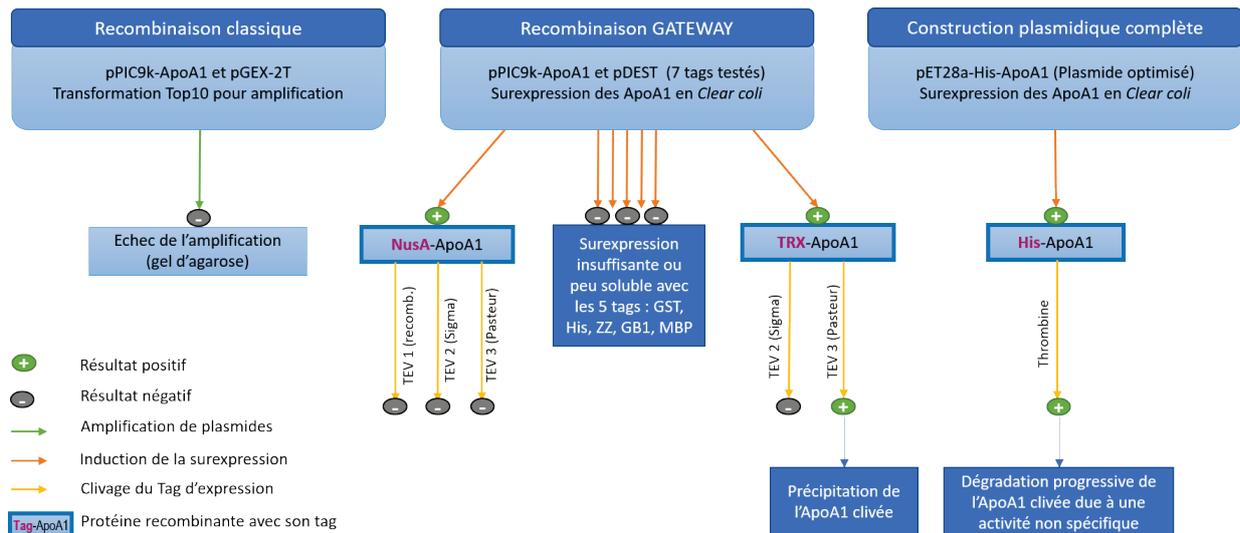


Figure 102 : Bilan des techniques utilisées pour la surexpression de l'ApoA1 recombinante en Clearcoli et résultats obtenus pour les clivages avec les enzymes TEV et thrombine.

La première solution à mettre en œuvre serait l'utilisation d'un vecteur similaire à pET28a (avec codons optimisés) contenant la séquence His-ApoA1 mais en remplaçant le site de clivage par la thrombine (protéase peu spécifique) par un site de clivage TEV (très spécifique). Une TEV recombinante possédant un tag His faciliterait son élimination après l'étape de clivage.

On pourrait considérer une deuxième solution consistant à s'affranchir de la protéine de fusion en utilisant d'autres méthodes de purification telles qu'une chromatographie d'exclusion couplée à une chromatographie échangeuse d'ion. Cette solution nécessiterait cependant un travail conséquent de mise au point des conditions expérimentales.

Une ApoA1 recombinante tronquée, présentée précédemment (Figure 24) possède la particularité de garder la même conformation dans sa forme délipidée ou liée aux phospholipides. Elle présente des propriétés de liaison aux phospholipides similaires à l'ApoA1 native, notamment pour le POPC. Surexprimée avec un marquage  $^{15}\text{N}$ , elle a donné lieu à une étude par RMN HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  avec des signaux exploitables en présence de phospholipides [270]. La synthèse de cette forme particulière de l'ApoA1r ainsi que la reconstitution de HDL serait une alternative intéressante et pourrait nous permettre d'optimiser la méthode RMN afin d'étudier la liaison à différents partenaires et de déterminer l'implication directe de l'ApoA1 dans ses interactions. Il serait important d'évaluer au préalable l'impact de la troncation (région N-ter) dans la liaison aux partenaires autres que les phospholipides, ainsi que la similarité de l'effet de la glycation sur les formes native et tronquée de l'ApoA1.

La technique d'ITC présente le grand avantage de ne requérir aucun marquage. Cependant la nécessité d'un tampon identique est un inconvénient lorsque le conditionnement initial du ligand comporte des sels, car la dialyse n'est pas toujours envisageable pour les petites molécules telles que les microARN. Il est cependant possible d'utiliser d'autres méthodes telles que le dessalage sur colonne Sephadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences™ PD-10), ou par précipitation puis re-solubilisation avec un kit classique d'extraction d'ARN (RNAeasy QIAGEN kit). Il existe également un kit de lavage et de concentration d'échantillon d'ARN prépurifié qui offre un rendement entre 85 et 100% tout en préservant l'intégrité de la molécule (*K0841 Thermo Scientific*).

Certains ligands sont intrinsèquement difficiles à étudier, tels que les lipides comme la S1P qui n'est presque pas soluble dans les conditions classiques de pH compatibles avec les protéines pour une étude d'interaction. En effet ne nous pouvons nous permettre d'adapter le tampon originel de la protéine pour satisfaire les conditions de solubilité du ligand, car toute modification du tampon originel peut entraîner un changement conformationnel de la protéine ayant in fine un impact sur ses propriétés de liaison. Pour les études sur cellules, l'albumine est utilisée pour véhiculer la S1P. L'ajout d'une molécule supplémentaire n'est pas applicable pour un calcul d'affinité, d'autant plus que l'albumine peut également se lier aux HDL. Cependant, cela pourrait permettre une étude comparative entre les HDL glyqués et non glyqués si la quantité d'albumine est suffisamment faible pour que son impact sur la liaison soit négligeable. Nous avons cependant constaté que l'albumine possède un signal de dilution relativement intense en ITC (résultat non présenté), ce qui pourrait limiter son utilisation en association avec le ligand.

## ***Conclusion générale***

L'étude des interactions protéine-ligand est incontournable lorsque l'on souhaite comprendre les altérations fonctionnelles d'une protéine, que ces altérations soient la conséquence d'une maladie génétique ou d'une pathologie qui modifie les paramètres du milieu intérieur, telle que le diabète. En effet, la structure et la fonction des protéines peuvent être modulées par des conditions ne correspondant pas à l'état d'homéostasie.

Dans le cas du diabète, c'est l'hyperglycémie chronique qui est considérée comme l'élément caractéristique permettant de comprendre les conséquences physiopathologiques. Ces conséquences incluent notamment la glycation des protéines dont les répercussions au sein de l'organisme n'ont pas encore été complètement élucidées. L'alimentation est le premier facteur modifiant la glycémie, sans compter les hormones et les émotions. L'insuline est modulée de plusieurs manières, ce qui explique les modes d'action variés des nombreux médicaments proposés aux patients diabétiques. L'étude des interactions et de leurs modifications apporte des éléments de compréhension importants permettant de formuler de nouvelles hypothèses. Par exemple, la baisse d'efficacité du liraglutide chez les patients présentant un taux d'HbA1c très élevé peut être attribuée à une interaction diminuée avec l'albumine comme nous l'avons montré dans la première étude. Dans ce cas, la diminution de l'effet thérapeutique n'est donc pas forcément liée à une altération de la réponse cellulaire à GLP-1. De même pour la baisse de l'efficacité du détémir, la résistance à l'insuline ne serait peut-être pas la seule contribution.

Etudier les modifications d'une protéine hors du milieu physiologique implique de trouver d'une part, des modèles pertinents mimant la physiopathologie considérée et des techniques d'étude adaptées permettant de mettre en évidence l'effet attribué uniquement au paramètre concerné. Nous avons vu que pour l'albumine comme pour l'ApoA1, les quantités de glucose ou de méthylglyoxal utilisées pour la glycation *in vitro* correspondent à des concentrations supra-pathologiques. La glycation *in vivo* implique une multitude de facteurs, le glucose mais aussi les métabolites apparaissant en conséquence de l'hyperglycémie et créant ainsi les conditions pouvant la favoriser. Des éléments présents uniquement *in vivo*, peuvent expliquer les différences avec le modèle *in vitro* : par exemple d'autres paramètres que le glucose ou le méthylglyoxal peuvent intervenir et amplifier la glycation tels que les métaux générateurs de stress oxydant qui ne sont pas présents dans les modèles *in vitro*. C'est la raison pour laquelle les modèles de glycation *in vitro* qui miment le mieux les effets observés *in vivo* ne correspondent pas aux valeurs physiopathologiques d'un seul paramètre, comme la concentration en glucose : une

glycation à 100 mM de glucose à 37°C est ainsi nécessaire pour mimer les conséquences de la glycation de l'albumine chez un patient dont la concentration en glucose sanguin est de 25 mM, soit une glycémie 4 fois plus faible. Plusieurs études ont montré qu'une glycation à 25mM de glucose à 37°C n'altérerait en rien les propriétés de l'ApoA1 ou de l'albumine. D'autre part, les rapports de concentrations utilisés dans la littérature pour la glycation des protéines avec le méthylglyoxal, sont plus élevés pour l'ApoA1 (ex : 3 mmol/g) que pour la HSA (ex : 0,25 mmol/g) mais cela apparaît cohérent avec les concentrations relatives dans le plasma (environ 40 g/L pour la HSA et 1 à 2 mg/L pour l'ApoA1). Le meilleur moyen d'évaluer les effets de la glycation *in vivo* consiste à étudier la protéine purifiée de plasma de patients diabétiques. Cependant, la quantité de plasma humain nécessaire pour isoler et étudier l'ApoA1 serait trop importante étant donné sa faible concentration.

La technique choisie pour l'étude des interactions doit également permettre de reproduire le plus fidèlement possible les conditions *in vivo*, en particulier le pH. D'autre part, pour les techniques nécessitant un marquage, comme c'est fréquemment le cas notamment pour la RMN, ce dernier ne doit pas affecter les propriétés de la protéine ou du ligand afin de ne pas influencer sur la mesure d'interaction. La technique ITC ne présente pas cet inconvénient et est une technique rapide à mettre en œuvre. Cependant, des conditions de pureté et de tampon sont à respecter rigoureusement. De plus, la glycation de la protéine étudiée demande une adaptation de la gamme de concentration utilisée pour le titrage.

L'étude de la glycation de l'albumine et de l'ApoA1 ouvre plus généralement sur la question de l'efficacité du transport des molécules endogènes et exogènes au sein du plasma dans un contexte diabétique. Ces échanges entre protéines transporteuses et cellules sont importants pour la distribution des molécules entre cellules productrices et cellules cibles pour permettre le fonctionnement global d'un système régulé, tel que le métabolisme glucidique et lipidique. La glycation de ces protéines peut ainsi diminuer l'efficacité de médicaments tels que le liraglutide, ou bien de molécules anti-inflammatoires telle que la S1P, qui empruntent ces voies de transport. Cette glycation peut initier un dysfonctionnement d'autres voies, entraînant l'oxydation et l'inflammation qui sont impliquées dans les complications associées au diabète, et dans le développement de l'athérosclérose. La glycation des protéines plasmatiques en générales dans un contexte diabétique altère leur interaction avec les polyphénols, composés antioxydants naturels faisant l'objet d'approches efficaces de traitement et prévention du diabète de type 2.

Elle entraîne également des modifications de l'absorption et de la distribution de ces polyphénols altérant ainsi leur métabolisme et leur action chez les patients diabétiques [362, 363].

## *Perspectives*

Les effets néfastes de la glycation de l'albumine sur son interaction avec le liraglutide ont été démontrés sur l'albumine glyquée *in vitro* et *in vivo*. Notre étude pourrait être complétée par une étude pharmacocinétique afin de déterminer les conséquences de la glycation de l'albumine sur la clairance plasmatique du liraglutide. L'altération de l'affinité de l'albumine pour son ligand apporte un élément de compréhension aux observations cliniques concernant la baisse de l'efficacité thérapeutique de certains médicaments liant l'albumine, qu'il serait intéressant de reproduire sur un modèle animal, par exemple sur des souris diabétiques. Aucune étude n'a encore été réalisée pour démontrer l'implication de la glycation dans la baisse de la clairance ou l'action des molécules thérapeutiques transportées par l'albumine.

Concernant l'ApoA1, ses propriétés anti-inflammatoire et antioxydante sont fortement impliquées dans l'action antiathérogène des HDL. La fonctionnalité des HDL étant altérée chez les patients diabétiques, de plus en plus d'intérêt est accordé à l'étude de la glycation de l'ApoA1 et de ses conséquences sur la composition des HDL. En particulier, les effets de la glycation de l'ApoA1 sur l'interaction avec ses partenaires n'ont pas encore été étudiés. Nos travaux ont posé les bases pour l'étude de l'interaction de l'ApoA1 avec différents partenaires (tels que la S1P, les microARN, l' $\alpha$ 1AT, ou encore la PON-1) et permettrait par la suite d'évaluer l'implication de la glycation de l'ApoA1 dans la liaison des différentes molécules participant au potentiel antiathérogène des particules de HDL. Il serait ensuite intéressant de corréliser ces données d'interactions avec une étude *in vivo* portant sur un modèle de souris diabétiques et non diabétiques. Cette corrélation serait établie en mesurant d'une part le taux de glycation de l'ApoA1 et d'autre part la teneur des HDL en partenaires d'interaction. Les complications vasculaires concernant près de la moitié des cas de diabète, ces perspectives d'études préciseraient entre autres, le rôle de la glycation dans le lien fort existant entre le diabète et l'athérosclérose, deux pathologies qui continuent leur progression avec 380 millions de patients diabétiques prévus pour 2025 [364].





## Bibliographie

1. Chopart, F.U., *Traité des voies urinaires, notes et additions*. 1855: Delahays.
2. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *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): p. 539-53.
3. Pickar, G.D. and A.U. Pickar-Abernethy, *Dosage Calculations*. 2012: Cengage Learning.
4. Paul Valensi, V.V. and R. Duteil, *Diabète Maladies métaboliques & Nutrition 2e édition*. 2005.
5. Andrianesis, V. and J. Doupis, *The role of kidney in glucose homeostasis--SGLT2 inhibitors, a new approach in diabetes treatment*. Expert Rev Clin Pharmacol, 2013. **6**(5): p. 519-39.
6. *International Diabetes Federation diabetes atlas.5., International Diabetes Federation, Brussels, Belgium*. 2015.
7. M., G.L.G., *Le diabète sous toutes ses formes. Le diabète chez l'enfant et l'adolescent, 2e édition*. Montréal. 2012.
8. Wu, Y., et al., *Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention*. Int J Med Sci, 2014. **11**(11): p. 1185-200.
9. Holt, R.I.G., et al., *Textbook of Diabetes*. 2011: Wiley.
10. Todd, J.A., *Etiology of type 1 diabetes*. Immunity, 2010. **32**(4): p. 457-67.
11. Thomas, H.E. and T.W. Kay, *Intracellular pathways of pancreatic beta-cell apoptosis in type 1 diabetes*. Diabetes Metab Res Rev, 2011. **27**(8): p. 790-6.
12. Leslie, R.D., *Predicting adult-onset autoimmune diabetes: clarity from complexity*. Diabetes, 2010. **59**(2): p. 330-1.
13. Bhattacharya, S., D. Dey, and S.S. Roy, *Molecular mechanism of insulin resistance*. J Biosci, 2007. **32**(2): p. 405-13.
14. Beale, E.G., *Insulin signaling and insulin resistance*. J Investig Med, 2013. **61**(1): p. 11-4.
15. Pandey, A., S. Chawla, and P. Guchhait, *Type-2 diabetes: Current understanding and future perspectives*. IUBMB Life, 2015. **67**(7): p. 506-13.
16. Rhodes, C.J., *Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death?* Science, 2005. **307**(5708): p. 380-4.
17. Jonas, J.C., et al., *Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 14112-21.
18. Sears, B. and M. Perry, *The role of fatty acids in insulin resistance*. Lipids Health Dis, 2015. **14**: p. 121.
19. Golden, S.H., et al., *Risk factor groupings related to insulin resistance and their synergistic effects on subclinical atherosclerosis: the atherosclerosis risk in communities study*. Diabetes, 2002. **51**(10): p. 3069-76.
20. Popelier, M.U., *Le diabète*. 2006: le Cavalier bleu.
21. Stankov, K., D. Benc, and D. Draskovic, *Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes mellitus type 1*. Pediatrics, 2013. **132**(6): p. 1112-22.
22. Zhao, W., et al., *Body mass index and the risk of all-cause mortality among patients with type 2 diabetes mellitus*. Circulation, 2014. **130**(24): p. 2143-51.
23. McCarthy, M. and S. Menzel, *The genetics of type 2 diabetes*. Br J Clin Pharmacol, 2001. **51**(3): p. 195-9.

24. Sladek, R., et al., *A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 881-5.
25. Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of, H., et al., *Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels*. Science, 2007. **316**(5829): p. 1331-6.
26. Voight, B.F., et al., *Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis*. Nat Genet, 2010. **42**(7): p. 579-89.
27. Khazrai, Y.M., G. Defeudis, and P. Pozzilli, *Effect of diet on type 2 diabetes mellitus: a review*. Diabetes Metab Res Rev, 2014. **30 Suppl 1**: p. 24-33.
28. Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 782-7.
29. Hu, F.B., et al., *Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women*. N Engl J Med, 2001. **345**(11): p. 790-7.
30. Manson, J.E., et al., *A prospective study of cigarette smoking and the incidence of diabetes mellitus among US male physicians*. Am J Med, 2000. **109**(7): p. 538-42.
31. Cullmann, M., A. Hilding, and C.G. Ostenson, *Alcohol consumption and risk of pre-diabetes and type 2 diabetes development in a Swedish population*. Diabet Med, 2012. **29**(4): p. 441-52.
32. Saad, M.J., A. Santos, and P.O. Prada, *Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance*. Physiology (Bethesda), 2016. **31**(4): p. 283-93.
33. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-72.
34. Hennen, G.U., *Endocrinologie*. 2001: De Boeck Supérieur.
35. Schopf, V., et al., *Effects of individual glucose levels on the neuronal correlates of emotions*. Front Hum Neurosci, 2013. **7**: p. 212.
36. Yeo, G.S. and L.K. Heisler, *Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics*. Nat Neurosci, 2012. **15**(10): p. 1343-9.
37. Timper, K. and J.C. Bruning, *Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity*. Dis Model Mech, 2017. **10**(6): p. 679-689.
38. Salway, J.G.U., *Medical Biochemistry at a Glance*. 2011: Wiley.
39. Karlson, P.U., *Mechanisms of Hormone Action: A NATO Advanced Study Institute*. 2013: Elsevier Science.
40. Karamitsos, D.T., *The story of insulin discovery*. Diabetes Res Clin Pract, 2011. **93 Suppl 1**: p. S2-8.
41. Decourt, P.U., *La véritable histoire de la découverte de l'insuline: Paulesco Redivivus: Le plus grand génie médical du XXe siècle: James Reilly (1887-1974)*. 1976: Archives Internationales Claude Bernard.
42. Bhagavan, N.V.U., *Medical Biochemistry*. 2002: Harcourt/Academic Press.
43. Hulse, R.E., L.A. Ralat, and T. Wei-Jen, *Structure, function, and regulation of insulin-degrading enzyme*. Vitam Horm, 2009. **80**: p. 635-48.
44. Desbuquois, B., et al., *[Regulation of insulin receptor expression and its gene]*. Ann Endocrinol (Paris), 1993. **54**(6): p. 373-84.
45. Tsai, M., et al., *Stimulation of leptin secretion by insulin*. Indian J Endocrinol Metab, 2012. **16**(Suppl 3): p. S543-8.
46. Ahren, B., *Glucagon--Early breakthroughs and recent discoveries*. Peptides, 2015. **67**: p. 74-81.

47. Cooperberg, B.A. and P.E. Cryer, *Insulin reciprocally regulates glucagon secretion in humans*. Diabetes, 2010. **59**(11): p. 2936-40.
48. Kuo, T., et al., *Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids*. Adv Exp Med Biol, 2015. **872**: p. 99-126.
49. Shih, K.C., et al., *Effect of growth hormone on dawn phenomenon in patients with type 2 diabetes*. Growth Factors, 2013. **31**(2): p. 66-73.
50. Olaleye, S.B. and R.A. Elegbe, *Catecholamines potentiate the effect of thyroid hormone on intestinal absorption of glucose in the rat*. Afr J Med Med Sci, 2005. **34**(2): p. 177-83.
51. Arlot, S., et al., *[Contraception for the diabetic woman]*. Fertil Contracept Sex, 1988. **16**(11): p. 921-6.
52. Del Prato, S., et al., *Characterization of cellular defects of insulin action in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1993. **91**(2): p. 484-94.
53. Robertson, R.P., *Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42351-4.
54. Ramana, K.V., et al., *Nitric oxide regulates the polyol pathway of glucose metabolism in vascular smooth muscle cells*. FASEB J, 2003. **17**(3): p. 417-25.
55. Bonnefont-Rousselot, D., *Glucose and reactive oxygen species*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2002. **5**(5): p. 561-8.
56. Lipinski, B., *Evidence in support of a concept of reductive stress*. Br J Nutr, 2002. **87**(1): p. 93-4; discussion 94.
57. Rebolledo, O.R. and S.M. Actis Dato, *Postprandial hyperglycemia and hyperlipidemia-generated glycoxidative stress: its contribution to the pathogenesis of diabetes complications*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2005. **9**(4): p. 191-208.
58. Yan, L.J., *Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress*. J Diabetes Res, 2014. **2014**: p. 137919.
59. Jay, D., H. Hitomi, and K.K. Griendling, *Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications*. Free Radic Biol Med, 2006. **40**(2): p. 183-92.
60. Bonnefont-Rousselot, D., *Produits de glycation avancée et hyperglycémie*. Métabolismes Hormones Diabètes et Nutrition, 2004. **VIII**.
61. Moussard, C.U., *Biochimie structurale et métabolique*. 2006: De Boeck Supérieur.
62. Uribarri, J., et al., *Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1043**: p. 461-6.
63. Singh, R., et al., *Advanced glycation end-products: a review*. Diabetologia, 2001. **44**(2): p. 129-46.
64. Ledesma-Osuna, A.I., G. Ramos-Clamont, and L. Vazquez-Moreno, *Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose*. Acta Biochim Pol, 2008. **55**(3): p. 491-7.
65. Suarez, G., et al., *Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructation). Comparison with the Maillard reaction initiated by glucose*. J Biol Chem, 1989. **264**(7): p. 3674-9.
66. McPherson, J.D., B.H. Shilton, and D.J. Walton, *Role of fructose in glycation and cross-linking of proteins*. Biochemistry, 1988. **27**(6): p. 1901-7.
67. Thornalley, P.J., A. Langborg, and H.S. Minhas, *Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose*. Biochem J, 1999. **344 Pt 1**: p. 109-16.

68. Phillips, S.A. and P.J. Thornalley, *The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal.* Eur J Biochem, 1993. **212**(1): p. 101-5.
69. Casazza, J.P., M.E. Felver, and R.L. Veech, *The metabolism of acetone in rat.* J Biol Chem, 1984. **259**(1): p. 231-6.
70. Lyles, G.A. and J. Chalmers, *The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery.* Biochem Pharmacol, 1992. **43**(7): p. 1409-14.
71. Poli, G., et al., *Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions.* Biochem J, 1985. **227**(2): p. 629-38.
72. Chaplen, F.W., W.E. Fahl, and D.C. Cameron, *Detection of methylglyoxal as a degradation product of DNA and nucleic acid components treated with strong acid.* Anal Biochem, 1996. **236**(2): p. 262-9.
73. Kong, X., et al., *Increased plasma levels of the methylglyoxal in patients with newly diagnosed type 2 diabetes 2.* J Diabetes, 2014. **6**(6): p. 535-40.
74. Kandhro, A.J., M.A. Mirza, and M.Y. Khuhawar, *Capillary gas chromatographic determination of methylglyoxal from serum of diabetic patients by precolumn derivatization using meso-stilbenediamine as derivatizing reagent.* J Chromatogr Sci, 2008. **46**(6): p. 539-43.
75. Rabbani, N. and P.J. Thornalley, *The critical role of methylglyoxal and glyoxalase 1 in diabetic nephropathy.* Diabetes, 2014. **63**(1): p. 50-2.
76. Rabbani, N. and P.J. Thornalley, *Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome.* Amino Acids, 2012. **42**(4): p. 1133-42.
77. Kilhovd, B.K., et al., *Increased serum levels of methylglyoxal-derived hydroimidazolone-AGE are associated with increased cardiovascular disease mortality in nondiabetic women.* Atherosclerosis, 2009. **205**(2): p. 590-4.
78. O'Brien, R. and K. Timmins, *The role of oxidation and glycation in the pathogenesis of diabetic atherosclerosis.* Trends Endocrinol Metab, 1994. **5**(8): p. 329-34.
79. Ohgami, N., et al., *CD36, serves as a receptor for advanced glycation endproducts (AGE).* J Diabetes Complications, 2002. **16**(1): p. 56-9.
80. Daffu, G., et al., *Radical roles for RAGE in the pathogenesis of oxidative stress in cardiovascular diseases and beyond.* Int J Mol Sci, 2013. **14**(10): p. 19891-910.
81. Trivelli, L.A., H.M. Ranney, and H.T. Lai, *Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus.* N Engl J Med, 1971. **284**(7): p. 353-7.
82. Penttila, I.M., et al., *Quality specifications for glycated hemoglobin A1c.* Ups J Med Sci, 1993. **98**(3): p. 395-9.
83. Penttila, I., et al., *Methods, units and quality requirements for the analysis of haemoglobin A1c in diabetes mellitus.* World J Methodol, 2016. **6**(2): p. 133-42.
84. Voet, D., J.G. Voet, and L.U.h.b.g.c.b.i.B. Domenjoud, *Biochimie.* 2016: De Boeck Supérieur.
85. De Rosa, M.C., et al., *Glycated human hemoglobin (HbA1c): functional characteristics and molecular modeling studies.* Biophys Chem, 1998. **72**(3): p. 323-35.
86. Farber, S.D., et al., *Oxygen affinity of hemoglobin and peripheral nerve degeneration in experimental diabetes.* J Neurol Sci, 1991. **101**(2): p. 204-7.

87. Thom, C.S., et al., *Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(3): p. a011858.
88. Rondeau, P. and E. Bourdon, *The glycation of albumin: structural and functional impacts*. Biochimie, 2011. **93**(4): p. 645-58.
89. Mo, Y., et al., *Relationship between glycated albumin and glycated hemoglobin according to glucose tolerance status: A multicenter study*. Diabetes Res Clin Pract, 2016. **115**: p. 17-23.
90. Sany, D., Y. Elshahawy, and W. Anwar, *Glycated albumin versus glycated hemoglobin as glycemic indicator in hemodialysis patients with diabetes mellitus: variables that influence*. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2013. **24**(2): p. 260-73.
91. Yoshiuchi, K., et al., *Glycated albumin is a better indicator for glucose excursion than glycated hemoglobin in type 1 and type 2 diabetes*. Endocr J, 2008. **55**(3): p. 503-7.
92. Utumatwishima, J.N., et al., *Reversing the tide - diagnosis and prevention of T2DM in populations of African descent*. Nat Rev Endocrinol, 2018. **14**(1): p. 45-56.
93. Singh, V.P., et al., *Advanced glycation end products and diabetic complications*. Korean J Physiol Pharmacol, 2014. **18**(1): p. 1-14.
94. Pfeiffer, A.F. and H.H. Klein, *The treatment of type 2 diabetes*. Dtsch Arztebl Int, 2014. **111**(5): p. 69-81; quiz 82.
95. Franz, M.J., et al., *Lifestyle weight-loss intervention outcomes in overweight and obese adults with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials*. J Acad Nutr Diet, 2015. **115**(9): p. 1447-63.
96. Lim, E.L., et al., *Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol*. Diabetologia, 2011. **54**(10): p. 2506-14.
97. Buse, J.B., *Glycemic Targets in Diabetes Care: Emerging Clarity after Accord*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2015. **126**: p. 62-76.
98. *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33)*. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet, 1998. **352**(9131): p. 837-53.
99. Bischoff, H., *The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes*. Clin Invest Med, 1995. **18**(4): p. 303-11.
100. Landgraf, R., *Meglitinide analogues in the treatment of type 2 diabetes mellitus*. Drugs Aging, 2000. **17**(5): p. 411-25.
101. Rizos, C.V., A. Kei, and M.S. Elisaf, *The current role of thiazolidinediones in diabetes management*. Arch Toxicol, 2016. **90**(8): p. 1861-81.
102. Weng, J., et al., *Effect of intensive insulin therapy on beta-cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a multicentre randomised parallel-group trial*. Lancet, 2008. **371**(9626): p. 1753-60.
103. Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study, G., et al., *Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2008. **358**(24): p. 2545-59.
104. Nolan, C.J., et al., *Insulin resistance as a physiological defense against metabolic stress: implications for the management of subsets of type 2 diabetes*. Diabetes, 2015. **64**(3): p. 673-86.
105. Bohm, A., et al., *Effect of insulin detemir, compared to human insulin, on 3T3-L1 adipogenesis*. Regul Pept, 2008. **151**(1-3): p. 160-3.

106. Philips, J.C. and A. Scheen, *Insulin detemir in the treatment of type 1 and type 2 diabetes*. Vasc Health Risk Manag, 2006. **2**(3): p. 277-83.
107. Holst, J.J., *The physiology of glucagon-like peptide 1*. Physiol Rev, 2007. **87**(4): p. 1409-39.
108. Manandhar, B. and J.M. Ahn, *Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogs: recent advances, new possibilities, and therapeutic implications*. J Med Chem, 2015. **58**(3): p. 1020-37.
109. Parkes, D.G., K.F. Mace, and M.E. Trautmann, *Discovery and development of exenatide: the first antidiabetic agent to leverage the multiple benefits of the incretin hormone, GLP-1*. Expert Opin Drug Discov, 2013. **8**(2): p. 219-44.
110. Li, Y., L. Li, and C. Holscher, *Incretin-based therapy for type 2 diabetes mellitus is promising for treating neurodegenerative diseases*. Rev Neurosci, 2016. **27**(7): p. 689-711.
111. Gupta, V., *Glucagon-like peptide-1 analogues: An overview*. Indian J Endocrinol Metab, 2013. **17**(3): p. 413-21.
112. Trujillo, J.M., W. Nuffer, and S.L. Ellis, *GLP-1 receptor agonists: a review of head-to-head clinical studies*. Ther Adv Endocrinol Metab, 2015. **6**(1): p. 19-28.
113. Young, M.A., et al., *Clinical pharmacology of albiglutide, a GLP-1 receptor agonist*. Postgrad Med, 2014. **126**(7): p. 84-97.
114. Glaesner, W., et al., *Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein*. Diabetes Metab Res Rev, 2010. **26**(4): p. 287-96.
115. Lau, J., et al., *Discovery of the Once-Weekly Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Analogue Semaglutide*. J Med Chem, 2015. **58**(18): p. 7370-80.
116. Kalra, S., *Follow the LEADER-Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results Trial*. Diabetes Ther, 2016. **7**(4): p. 601-609.
117. Marso, S.P., et al., *Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes*. N Engl J Med, 2016. **375**(4): p. 311-22.
118. Nauck, M.A., et al., *Five weeks of treatment with the GLP-1 analogue liraglutide improves glycaemic control and lowers body weight in subjects with type 2 diabetes*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2006. **114**(8): p. 417-23.
119. Duh, E.J., J.K. Sun, and A.W. Stitt, *Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies*. JCI Insight, 2017. **2**(14).
120. Vallon, V. and R. Komers, *Pathophysiology of the diabetic kidney*. Compr Physiol, 2011. **1**(3): p. 1175-232.
121. Leite, R.S., N.M. Marlow, and J.K. Fernandes, *Oral health and type 2 diabetes*. Am J Med Sci, 2013. **345**(4): p. 271-3.
122. de Macedo, G.M., S. Nunes, and T. Barreto, *Skin disorders in diabetes mellitus: an epidemiology and physiopathology review*. Diabetol Metab Syndr, 2016. **8**(1): p. 63.
123. Sinwar, P.D., *The diabetic foot management - recent advance*. Int J Surg, 2015. **15**: p. 27-30.
124. Apelqvist, J., et al., *International consensus and practical guidelines on the management and the prevention of the diabetic foot. International Working Group on the Diabetic Foot*. Diabetes Metab Res Rev, 2000. **16 Suppl 1**: p. S84-92.
125. E. Andrès, J.F.B., *Microangiopathie diabétique : de la physiopathologie au traitement*. Act. Méd. Int. - Métabolismes - Hormones - Nutrition - N° 1 / mars 1999, 1999. **III**.

126. Laight, D.W., M.J. Carrier, and E.E. Anggard, *Endothelial cell dysfunction and the pathogenesis of diabetic macroangiopathy*. *Diabetes Metab Res Rev*, 1999. **15**(4): p. 274-82.
127. Murphy, W.A., Jr., et al., *The iceman: discovery and imaging*. *Radiology*, 2003. **226**(3): p. 614-29.
128. Thompson, R.C., et al., *Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations*. *Lancet*, 2013. **381**(9873): p. 1211-22.
129. Schwartz, B.G., J.M. Schussler, and R.L. Rosenthal, *Tumor-like coronary atheroma: a modern coronary evaluation with a historical perspective*. *Tex Heart Inst J*, 2011. **38**(3): p. 275-8.
130. Badimon, L., G. Vilahur, and T. Padro, *Lipoproteins, platelets and atherothrombosis*. *Rev Esp Cardiol*, 2009. **62**(10): p. 1161-78.
131. Lippi, G., M. Franchini, and G. Targher, *Arterial thrombus formation in cardiovascular disease*. *Nat Rev Cardiol*, 2011. **8**(9): p. 502-12.
132. Criqui, M.H. and V. Aboyans, *Epidemiology of peripheral artery disease*. *Circ Res*, 2015. **116**(9): p. 1509-26.
133. Ouweneel, A.B. and M. Van Eck, *Lipoproteins as modulators of atherothrombosis: From endothelial function to primary and secondary coagulation*. *Vascul Pharmacol*, 2016. **82**: p. 1-10.
134. *Prise en charge thérapeutique du patient dyslipidémique, AFSSAPS Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé*. 2005.
135. Jean, D., *Le métabolisme des lipoprotéines*. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 2006. **41**(1): p. 55-60.
136. Bergmark, C., et al., *A novel function of lipoprotein [a] as a preferential carrier of oxidized phospholipids in human plasma*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(10): p. 2230-9.
137. T. Gautier, D.M., L. Lagrost, *Métabolisme des lipides et des lipoprotéines chez l'homme*. 2010.
138. Acton, Q.A.U., *HDL Lipoproteins—Advances in Research and Application: 2012 Edition*. 2012: ScholarlyEditions.
139. Asztalos, B.F., et al., *High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(11): p. 2181-7.
140. Charrière, S., *Apolipoprotein AV: A new actor in triglyceride metabolism*. *Médecine des Maladies Métaboliques*. **3**(6): p. 575-580.
141. Buttet, M., et al., *From fatty-acid sensing to chylomicron synthesis: role of intestinal lipid-binding proteins*. *Biochimie*, 2014. **96**: p. 37-47.
142. Berge, K.E., et al., *Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters*. *Science*, 2000. **290**(5497): p. 1771-5.
143. Norum, K.R., et al., *Transport of cholesterol*. *Physiol Rev*, 1983. **63**(4): p. 1343-419.
144. Shepherd, J., *Lipoprotein metabolism. An overview*. *Drugs*, 1994. **47 Suppl 2**: p. 1-10.
145. Bouhairie, V.E. and A.C. Goldberg, *Familial hypercholesterolemia*. *Cardiol Clin*, 2015. **33**(2): p. 169-79.
146. Tosheska Trajkovska, K. and S. Topuzovska, *High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: strategies for raising HDL cholesterol*. *Anatol J Cardiol*, 2017. **18**(2): p. 149-154.
147. Singh, R.B., et al., *Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process*. *Exp Clin Cardiol*, 2002. **7**(1): p. 40-53.

148. Pierre Gourdy, F.B., Jean-François Arnal, *Œstrogènes et risque cardiovasculaire*. Sang Thrombose Vaisseaux, 2016. **17**(3): p. 155-61.
149. Blair, A., et al., *Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32512-9.
150. Vidal, F., et al., *Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells*. Eur J Biochem, 1998. **252**(3): p. 378-84.
151. Gimbrone, M.A., Jr. and G. Garcia-Cardena, *Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 620-36.
152. Yuhanna, I.S., et al., *High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase*. Nat Med, 2001. **7**(7): p. 853-7.
153. Bentzon, J.F., et al., *Mechanisms of plaque formation and rupture*. Circ Res, 2014. **114**(12): p. 1852-66.
154. Viola, J. and O. Soehnlein, *Atherosclerosis - A matter of unresolved inflammation*. Semin Immunol, 2015. **27**(3): p. 184-93.
155. Falk, E., *Pathogenesis of atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(8 Suppl): p. C7-12.
156. Hopkins, P.N., et al., *Characterization of Autosomal Dominant Hypercholesterolemia Caused by PCSK9 Gain of Function Mutations and Its Specific Treatment With Alirocumab, a PCSK9 Monoclonal Antibody*. Circ Cardiovasc Genet, 2015. **8**(6): p. 823-31.
157. Wang, J.C. and M. Bennett, *Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence*. Circ Res, 2012. **111**(2): p. 245-59.
158. Barton, M., R.K. Dubey, and T. Traupe, *Oral contraceptives and the risk of thrombosis and atherosclerosis*. Expert Opin Investig Drugs, 2002. **11**(3): p. 329-32.
159. Sissan, M.A. and S. Leelamma, *Role of oral contraceptive in atherosclerosis*. Indian J Exp Biol, 1994. **32**(5): p. 307-10.
160. Messner, B. and D. Bernhard, *Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(3): p. 509-15.
161. Torres, N., et al., *Nutrition and Atherosclerosis*. Arch Med Res, 2015. **46**(5): p. 408-26.
162. Agouridis, A.P., M.S. Kostapanos, and M.S. Elisaf, *Statins and their increased risk of inducing diabetes*. Expert Opin Drug Saf, 2015. **14**(12): p. 1835-44.
163. Ciurleo, R., P. Bramanti, and S. Marino, *Role of statins in the treatment of multiple sclerosis*. Pharmacol Res, 2014. **87**: p. 133-43.
164. Velasco, M., E. Rojas, and V.B. Pirela, *Approach to a successful selection of antihypertensive drugs for the patient with atherosclerosis*. Am J Ther, 2013. **20**(4): p. 442-7.
165. Mills, D.C., et al., *Clopidogrel inhibits the binding of ADP analogues to the receptor mediating inhibition of platelet adenylate cyclase*. Arterioscler Thromb, 1992. **12**(4): p. 430-6.
166. Dumas, M.E., et al., *Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12511-6.
167. Wang, Z., et al., *Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis*. Cell, 2015. **163**(7): p. 1585-95.

168. Davalos, A., et al., *miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(22): p. 9232-7.
169. Feinberg, M.W. and K.J. Moore, *MicroRNA Regulation of Atherosclerosis*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 703-20.
170. Loyer, X., et al., *MicroRNAs as therapeutic targets in atherosclerosis*. Expert Opin Ther Targets, 2015. **19**(4): p. 489-96.
171. Vickers, K.C., et al., *MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(4): p. 423-33.
172. Meiler, S., et al., *MicroRNA 302a is a novel modulator of cholesterol homeostasis and atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(2): p. 323-31.
173. Rui, M., et al., *Recombinant high density lipoprotein nanoparticles for target-specific delivery of siRNA*. Pharm Res, 2013. **30**(5): p. 1203-14.
174. Shaw, J.A., et al., *Infusion of reconstituted high-density lipoprotein leads to acute changes in human atherosclerotic plaque*. Circ Res, 2008. **103**(10): p. 1084-91.
175. Calkin, A.C., et al., *Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux*. Circulation, 2009. **120**(21): p. 2095-104.
176. Lacko, A.G., et al., *HDL as a drug and nucleic acid delivery vehicle*. Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 247.
177. Zhang, W., et al., *Tanshinone IIA-loaded reconstituted high density lipoproteins: Atherosclerotic plaque targeting mechanism in a foam cell model and pharmacokinetics in rabbits*. Pharmazie, 2012. **67**(4): p. 324-30.
178. Nadal, J.F. and P.C. Gutierrez, *[Type 2 diabetes mellitus and cardiovascular risk factors: is comprehensive treatment required?]*. Med Clin (Barc), 2013. **141 Suppl 2**: p. 7-13.
179. Miettinen, H., et al., *Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. The FINMONICA Myocardial Infarction Register Study Group*. Diabetes Care, 1998. **21**(1): p. 69-75.
180. Ashraf, J.M., et al., *Recent advances in detection of AGEs: Immunochemical, bioanalytical and biochemical approaches*. IUBMB Life, 2015. **67**(12): p. 897-913.
181. Kiuchi, K., et al., *Increased serum concentrations of advanced glycation end products: a marker of coronary artery disease activity in type 2 diabetic patients*. Heart, 2001. **85**(1): p. 87-91.
182. Yamagishi, S.I., et al., *Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 25096-100.
183. Reilly, M.P., et al., *Plasma leptin levels are associated with coronary atherosclerosis in type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(8): p. 3872-8.
184. Nakamura, Y., et al., *Immunohistochemical localization of advanced glycosylation end products in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus*. Am J Pathol, 1993. **143**(6): p. 1649-56.
185. Surh, Y.J., et al., *Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals*. J Nutr, 2005. **135**(12 Suppl): p. 2993S-3001S.
186. Bucciarelli, L.G., et al., *RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice*. Circulation, 2002. **106**(22): p. 2827-35.
187. Zhao, J., R. Randive, and J.A. Stewart, *Molecular mechanisms of AGE/RAGE-mediated fibrosis in the diabetic heart*. World J Diabetes, 2014. **5**(6): p. 860-7.

188. Jandeleit-Dahm, K. and M.E. Cooper, *The role of AGEs in cardiovascular disease*. *Curr Pharm Des*, 2008. **14**(10): p. 979-86.
189. Younis, N., et al., *Glycation as an atherogenic modification of LDL*. *Curr Opin Lipidol*, 2008. **19**(4): p. 378-84.
190. Sobal, G., J. Menzel, and H. Sinzinger, *Why is glycated LDL more sensitive to oxidation than native LDL? A comparative study*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2000. **63**(4): p. 177-86.
191. Kropiewnicka, E.H. and L. Paczek, *[The importance of advanced glycosylation end products in the creation and progression of atherosclerosis in non-insulin-dependent diabetes mellitus]*. *Przegl Lek*, 2000. **57**(5): p. 283-7.
192. Hodgkinson, C.P., et al., *Advanced glycation end-product of low density lipoprotein activates the toll-like 4 receptor pathway implications for diabetic atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(12): p. 2275-81.
193. de Vries, M.A., et al., *Glucose-dependent leukocyte activation in patients with type 2 diabetes mellitus, familial combined hyperlipidemia and healthy controls*. *Metabolism*, 2015. **64**(2): p. 213-7.
194. Koks, N., et al., *Glucose-dependent leucocyte activation in familial hypercholesterolemia*. *Eur J Clin Invest*, 2017. **47**(11): p. 839-846.
195. Litwinoff, E., et al., *Emerging Targets for Therapeutic Development in Diabetes and Its Complications: The RAGE Signaling Pathway*. *Clin Pharmacol Ther*, 2015. **98**(2): p. 135-44.
196. Peters Jr, T., *1 - Historical Perspective*, in *All About Albumin*. 1995, Academic Press: San Diego. p. 1-8.
197. Sugio, S., et al., *Crystal structure of human serum albumin at 2.5 A resolution*. *Protein Eng*, 1999. **12**(6): p. 439-46.
198. He, X.M. and D.C. Carter, *Atomic structure and chemistry of human serum albumin*. *Nature*, 1992. **358**(6383): p. 209-15.
199. Peters Jr, T., *2 - The Albumin Molecule: Its Structure and Chemical Properties*, in *All About Albumin*. 1995, Academic Press: San Diego. p. 9-II.
200. Quinlan, G.J., G.S. Martin, and T.W. Evans, *Albumin: biochemical properties and therapeutic potential*. *Hepatology*, 2005. **41**(6): p. 1211-9.
201. Carballal, S., et al., *Sulfenic acid in human serum albumin*. *Amino Acids*, 2007. **32**(4): p. 543-51.
202. Peters Jr, T., *4 - Genetics: The Albumin Gene*, in *All About Albumin*. 1995, Academic Press: San Diego. p. 133-187.
203. Beeken, W.L., et al., *Studies of I-131-albumin catabolism and distribution in normal young male adults*. *J Clin Invest*, 1962. **41**: p. 1312-33.
204. Peters Jr, T., *5 - Metabolism: Albumin in the Body*, in *All About Albumin*. 1995, Academic Press: San Diego. p. 188-250.
205. Peters Jr, T., *6 - Clinical Aspects: Albumin in Medicine*, in *All About Albumin*. 1995, Academic Press: San Diego. p. 251-284.
206. Phillips, A., A.G. Shaper, and P.H. Whincup, *Association between serum albumin and mortality from cardiovascular disease, cancer, and other causes*. *Lancet*, 1989. **2**(8677): p. 1434-6.
207. Doweiko, J.P. and D.J. Nompleggi, *The role of albumin in human physiology and pathophysiology, Part III: Albumin and disease states*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1991. **15**(4): p. 476-83.
208. Hassan, K., et al., *The impact of oxidized serum albumin on the oncotic pressure and hydration status of peritoneal dialysis patients*. *Ther Clin Risk Manag*, 2016. **12**: p. 463-9.

209. Lexa, K.W., E. Dolgih, and M.P. Jacobson, *A structure-based model for predicting serum albumin binding*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e93323.
210. Garcovich, M., M.A. Zocco, and A. Gasbarrini, *Clinical use of albumin in hepatology*. Blood Transfus, 2009. **7**(4): p. 268-77.
211. Qiao, R., et al., *Albumin and Ricinus communis agglutinin decrease endothelial permeability via interactions with matrix*. Am J Physiol, 1993. **265**(2 Pt 1): p. C439-46.
212. Peters Jr, T., *3 - Ligand Binding by Albumin*, in *All About Albumin*. 1995, Academic Press: San Diego. p. 76-132.
213. Sudlow, G., D.J. Birkett, and D.N. Wade, *Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin*. Mol Pharmacol, 1976. **12**(6): p. 1052-61.
214. Ghuman, J., et al., *Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin*. J Mol Biol, 2005. **353**(1): p. 38-52.
215. Kragh-Hansen, U., V.T. Chuang, and M. Otagiri, *Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin*. Biol Pharm Bull, 2002. **25**(6): p. 695-704.
216. Goncharova, I., et al., *Photo-isomerization and oxidation of bilirubin in mammals is dependent on albumin binding*. Anal Biochem, 2015. **490**: p. 34-45.
217. Knudsen, A., A.O. Pedersen, and R. Brodersen, *Spectroscopic properties of bilirubin-human serum albumin complexes: a stoichiometric analysis*. Arch Biochem Biophys, 1986. **244**(1): p. 273-84.
218. Sabbioni, G. and C.P. Wild, *Identification of an aflatoxin G1-serum albumin adduct and its relevance to the measurement of human exposure to aflatoxins*. Carcinogenesis, 1991. **12**(1): p. 97-103.
219. Scharfstein, J.S., et al., *In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols*. J Clin Invest, 1994. **94**(4): p. 1432-9.
220. Roche, M., et al., *The antioxidant properties of serum albumin*. FEBS Lett, 2008. **582**(13): p. 1783-7.
221. Anraku, M., et al., *Redox properties of serum albumin*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(12): p. 5465-72.
222. Petitpas, I., et al., *Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I*. J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 22804-9.
223. Simard, J.R., et al., *Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis*. J Mol Biol, 2006. **361**(2): p. 336-51.
224. Simard, J.R., et al., *Locating high-affinity fatty acid-binding sites on albumin by x-ray crystallography and NMR spectroscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 17958-63.
225. Ni, Y., et al., *Circulating Unsaturated Fatty Acids Delineate the Metabolic Status of Obese Individuals*. EBioMedicine, 2015. **2**(10): p. 1513-22.
226. Chen, X., et al., *Differences in maternal circulating fatty acid composition and dietary fat intake in women with gestational diabetes mellitus or mild gestational hyperglycemia*. Diabetes Care, 2010. **33**(9): p. 2049-54.
227. Spector, A.A., *Fatty acid binding to plasma albumin*. J Lipid Res, 1975. **16**(3): p. 165-79.
228. Klotz, I.M., F.M. Walker, and R.B. Pivan, *The binding of organic ions by proteins*. J Am Chem Soc, 1946. **68**: p. 1486-90.
229. Dieter, P., H. Krause, and A. Schulze-Specking, *Arachidonate metabolism in macrophages is affected by albumin*. Eicosanoids, 1990. **3**(1): p. 45-51.

230. Chanphai, P., et al., *Transporting testosterone and its dimers by serum proteins*. J Photochem Photobiol B, 2015. **153**: p. 173-83.
231. Tritsch, G.L., et al., *Thyroxine binding by human serum albumin*. J Biol Chem, 1961. **236**: p. 3163-7.
232. Oyakawa, E.K. and B.H. Levedahl, *Testosterone binding to bovine and human serum albumin: the role of tyrosine groups*. Arch Biochem Biophys, 1958. **74**(1): p. 17-23.
233. Westphal, U., *Interaction between hydrocortisone-4-C14 or progesterone-4-C14 and serum albumin as demonstrated by ultracentrifugation and electrophoresis*. Endocrinology, 1955. **57**(4): p. 456-65.
234. Westphal, U., H.E. Firschein, and E.M. Pearce, *Binding of hydrocortisone-4-C14 and progesterone-4-C14 to serum albumin, demonstrated by paper electrophoresis*. Science, 1955. **121**(3147): p. 601-2.
235. Larsen, M.T., et al., *Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease*. Mol Cell Ther, 2016. **4**: p. 3.
236. Clerici, M., et al., *Cigarette smoke induces alterations in the drug-binding properties of human serum albumin*. Blood Cells Mol Dis, 2014. **52**(4): p. 166-74.
237. Maciazek-Jurczyk, M., et al., *Alteration of human serum albumin binding properties induced by modifications: A review*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2018. **188**: p. 675-683.
238. Berg, A.H., et al., *Carbamylation of serum albumin as a risk factor for mortality in patients with kidney failure*. Sci Transl Med, 2013. **5**(175): p. 175ra29.
239. Cao, H., T. Chen, and Y. Shi, *Glycation of human serum albumin in diabetes: impacts on the structure and function*. Curr Med Chem, 2015. **22**(1): p. 4-13.
240. Bourdon, E., N. Loreau, and D. Blache, *Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin*. FASEB J, 1999. **13**(2): p. 233-44.
241. Shaklai, N., R.L. Garlick, and H.F. Bunn, *Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function*. J Biol Chem, 1984. **259**(6): p. 3812-7.
242. Rondeau, P., et al., *Oxidative stresses induced by glycoxidized human or bovine serum albumin on human monocytes*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(6): p. 799-812.
243. Marashi, S.A., S. Safarian, and A.A. Moosavi-Movahedi, *Why major nonenzymatic glycation sites of human serum albumin are preferred to other residues?* Med Hypotheses, 2005. **64**(4): p. 881.
244. Iberg, N. and R. Fluckiger, *Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites*. J Biol Chem, 1986. **261**(29): p. 13542-5.
245. Garlick, R.L. and J.S. Mazer, *The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo*. J Biol Chem, 1983. **258**(10): p. 6142-6.
246. Ahmed, N. and P.J. Thornalley, *Peptide mapping of human serum albumin modified minimally by methylglyoxal in vitro and in vivo*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1043**: p. 260-6.
247. Anguizola, J., et al., *Review: Glycation of human serum albumin*. Clin Chim Acta, 2013. **425**: p. 64-76.
248. Selvin, E., et al., *Fructosamine and Glycated Albumin and the Risk of Cardiovascular Outcomes and Death*. Circulation, 2015. **132**(4): p. 269-77.
249. Chen, S., M.P. Cohen, and F.N. Ziyadeh, *Amadori-glycated albumin in diabetic nephropathy: pathophysiologic connections*. Kidney Int Suppl, 2000. **77**: p. S40-4.

250. Yoon, H.J., et al., *Glycated albumin and the risk of micro- and macrovascular complications in subjects with type 1 diabetes*. *Cardiovasc Diabetol*, 2015. **14**: p. 53.
251. Plantier, J.L., et al., *Comparison of antioxidant properties of different therapeutic albumin preparations*. *Biologicals*, 2016. **44**(4): p. 226-233.
252. Fanali, G., et al., *Human serum albumin: from bench to bedside*. *Mol Aspects Med*, 2012. **33**(3): p. 209-90.
253. Faure, P., et al., *Impairment of the antioxidant properties of serum albumin in patients with diabetes: protective effects of metformin*. *Clin Sci (Lond)*, 2008. **114**(3): p. 251-6.
254. Cohen, M.P., et al., *Inhibiting albumin glycation ameliorates diabetic nephropathy in the db/db mouse*. *Exp Nephrol*, 2000. **8**(3): p. 135-43.
255. Yamagishi, S., K. Fukami, and T. Matsui, *Evaluation of tissue accumulation levels of advanced glycation end products by skin autofluorescence: A novel marker of vascular complications in high-risk patients for cardiovascular disease*. *Int J Cardiol*, 2015. **185**: p. 263-8.
256. Awang, T., et al., *Understanding the effects of two bound glucose in Sudlow site I on structure and function of human serum albumin: theoretical studies*. *J Biomol Struct Dyn*, 2017. **35**(4): p. 781-790.
257. Awasthi, S., N.A. Murugan, and N.T. Saraswathi, *Advanced Glycation End Products Modulate Structure and Drug Binding Properties of Albumin*. *Mol Pharm*, 2015. **12**(9): p. 3312-22.
258. Wa, C., et al., *Characterization of glycation adducts on human serum albumin by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. *Clin Chim Acta*, 2007. **385**(1-2): p. 48-60.
259. Baraka-Vidot, J., et al., *Glycation alters ligand binding, enzymatic, and pharmacological properties of human albumin*. *Biochemistry*, 2015. **54**(19): p. 3051-62.
260. Baraka-Vidot, J., et al., *Impaired drug-binding capacities of in vitro and in vivo glycated albumin*. *Biochimie*, 2012. **94**(9): p. 1960-7.
261. Berg JM, T.J., Stryer L. , *Hemoglobin Transports Oxygen Efficiently by Binding Oxygen Cooperatively*, in *Biochemistry. 5th edition*. . 2002, New York: W H Freeman.
262. Gomme, P.T., K.B. McCann, and J. Bertolini, *Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions*. *Drug Discov Today*, 2005. **10**(4): p. 267-73.
263. von Eckardstein, A. and D. Kardassis, *High density lipoproteins: From biological understanding to clinical exploitation*. Vol. 224. 2015.
264. Malmendier, C.L., C. Delcroix, and J.P. Ameryckx, *In vivo metabolism of human apoprotein A-I-phospholipid complexes. Comparison with human high density lipoprotein-apoprotein A-I metabolism*. *Clin Chim Acta*, 1983. **131**(3): p. 201-10.
265. Boekholdt, S.M., et al., *Levels and changes of HDL cholesterol and apolipoprotein A-I in relation to risk of cardiovascular events among statin-treated patients: a meta-analysis*. *Circulation*, 2013. **128**(14): p. 1504-12.
266. Connelly, P.W., et al., *Reference values of plasma apolipoproteins A-I and B, and association with nonlipid risk factors in the populations of two Canadian provinces: Quebec and Saskatchewan*. *Canadian Heart Health Surveys Research Group*. *Can J Cardiol*, 1999. **15**(4): p. 409-18.
267. Gursky, O. and D. Atkinson, *Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1: implications for a lipid-free molten globular state*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(7): p. 2991-5.

268. Mei, X. and D. Atkinson, *Lipid-free Apolipoprotein A-I Structure: Insights into HDL Formation and Atherosclerosis Development*. Arch Med Res, 2015. **46**(5): p. 351-60.
269. Kontush, A. and M.J. Chapman, *High-Density Lipoproteins: Structure, Metabolism, Function and Therapeutics*. 2011: Wiley.
270. Borhani, D.W., et al., *Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12291-6.
271. Karlsson, H., et al., *Protein profiling of low-density lipoprotein from obese subjects*. Proteomics Clin Appl, 2009. **3**(6): p. 663-71.
272. Nobecourt, E., et al., *The impact of glycation on apolipoprotein A-I structure and its ability to activate lecithin:cholesterol acyltransferase*. Diabetologia, 2007. **50**(3): p. 643-53.
273. Vuilleumier, N., et al., *Pro- or anti-inflammatory role of apolipoprotein A-1 in high-density lipoproteins?* Swiss Med Wkly, 2013. **143**: p. w13781.
274. Schaefer, E.J., et al., *Diagnosis and treatment of high density lipoprotein deficiency*. Prog Cardiovasc Dis, 2016. **59**(2): p. 97-106.
275. Gualandri, V., et al., *AlMilano apoprotein identification of the complete kindred and evidence of a dominant genetic transmission*. Am J Hum Genet, 1985. **37**(6): p. 1083-97.
276. Alexander, E.T., et al., *Structural and functional consequences of the Milano mutation (R173C) in human apolipoprotein A-I*. J Lipid Res, 2009. **50**(7): p. 1409-19.
277. Heller, M., et al., *Compositional protein analysis of high density lipoproteins in hypercholesterolemia by shotgun LC-MS/MS and probabilistic peptide scoring*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(6): p. 1059-72.
278. Zannis, V.I., A. Chroni, and M. Krieger, *Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL*. J Mol Med (Berl), 2006. **84**(4): p. 276-94.
279. Krieger, M., *Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 793-7.
280. Pussinen, P.J., et al., *Binding of phospholipid transfer protein (PLTP) to apolipoproteins A-I and A-II: location of a PLTP binding domain in the amino terminal region of apoA-I*. J Lipid Res, 1998. **39**(1): p. 152-61.
281. Shih, A.Y., S.G. Sligar, and K. Schulten, *Maturation of high-density lipoproteins*. J R Soc Interface, 2009. **6**(39): p. 863-71.
282. Gordon, S.M. and W.S. Davidson, *Apolipoprotein A-I mimetics and high-density lipoprotein function*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2012. **19**(2): p. 109-14.
283. Lu, M., et al., *ApoB/apoA1 is an effective predictor of coronary heart disease risk in overweight and obesity*. J Biomed Res, 2011. **25**(4): p. 266-73.
284. Bursill, C.A., et al., *High-density lipoproteins suppress chemokines and chemokine receptors in vitro and in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(9): p. 1773-8.
285. Umemoto, T., et al., *Apolipoprotein AI and high-density lipoprotein have anti-inflammatory effects on adipocytes via cholesterol transporters: ATP-binding cassette A-1, ATP-binding cassette G-1, and scavenger receptor B-1*. Circ Res, 2013. **112**(10): p. 1345-54.
286. Puranik, R., et al., *Low dose apolipoprotein A-I rescues carotid arteries from inflammation in vivo*. Atherosclerosis, 2008. **196**(1): p. 240-7.

287. Tabet, F., et al., *Lipid-free apolipoprotein A-I and discoidal reconstituted high-density lipoproteins differentially inhibit glucose-induced oxidative stress in human macrophages*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(5): p. 1192-200.
288. Barter, P.J., et al., *Antiinflammatory properties of HDL*. *Circ Res*, 2004. **95**(8): p. 764-72.
289. Vecoli, C., et al., *Apolipoprotein A-I mimetic peptide L-4F prevents myocardial and coronary dysfunction in diabetic mice*. *J Cell Biochem*, 2011. **112**(9): p. 2616-26.
290. Ditiatkovski, M., et al., *Apolipoprotein A-I Mimetic Peptides: Discordance Between In Vitro and In Vivo Properties-Brief Report*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. **37**(7): p. 1301-1306.
291. Schwendeman, A., et al., *The effect of phospholipid composition of reconstituted HDL on its cholesterol efflux and anti-inflammatory properties*. *J Lipid Res*, 2015. **56**(9): p. 1727-37.
292. Baker, P.W., et al., *Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression*. *J Lipid Res*, 2000. **41**(8): p. 1261-7.
293. Chen, Z., et al., *Reconstituted HDL elicits marked changes in plasma lipids following single-dose injection in C57Bl/6 mice*. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2012. **17**(3): p. 315-23.
294. Shah, P.K., et al., *Effects of recombinant apolipoprotein A-I(Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Circulation*, 1998. **97**(8): p. 780-5.
295. Shah, P.K., et al., *High-dose recombinant apolipoprotein A-I(milano) mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein e-deficient mice. Potential implications for acute plaque stabilization*. *Circulation*, 2001. **103**(25): p. 3047-50.
296. Mackness, B., et al., *Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **318**(3): p. 680-3.
297. Mendelson, K., T. Evans, and T. Hla, *Sphingosine 1-phosphate signalling*. *Development*, 2014. **141**(1): p. 5-9.
298. Meseeha, M. and M. Attia, *Alpha 1 Antitrypsin Deficiency*, in *StatPearls*. 2017: Treasure Island (FL).
299. Janciauskiene, S.M., et al., *The discovery of alpha1-antitrypsin and its role in health and disease*. *Respir Med*, 2011. **105**(8): p. 1129-39.
300. Parks, J.S. and T.Y. Thuren, *Decreased binding of apoA-I to phosphatidylcholine monolayers containing 22:6 n-3 in the sn-2 position*. *J Lipid Res*, 1993. **34**(5): p. 779-88.
301. Zhang, M., et al., *Apolipoprotein A-1 binding protein promotes macrophage cholesterol efflux by facilitating apolipoprotein A-1 binding to ABCA1 and preventing ABCA1 degradation*. *Atherosclerosis*, 2016. **248**: p. 149-59.
302. Sorci-Thomas, M.G., S. Bhat, and M.J. Thomas, *Activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by HDL ApoA-I central helices*. *Clin Lipidol*, 2009. **4**(1): p. 113-124.
303. Spagnuolo, M.S., et al., *Assignment of the binding site for haptoglobin on apolipoprotein A-I*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(2): p. 1193-8.
304. Porta, A., et al., *Haptoglobin transport into human ovarian follicles and its binding to apolipoprotein A-1*. *Zygote*, 1999. **7**(1): p. 67-77.

305. Panin, L.E. and N.E. Kostina, [*Interaction of human apolipoprotein AI and HIV-1 envelope proteins with the native and recombinant CD4 receptors*]. *Vopr Virusol*, 2003. **48**(1): p. 24-6.
306. Bag, A.K., et al., *Comparative proteomics and glycoproteomics of plasma proteins in Indian visceral leishmaniasis*. *Proteome Sci*, 2014. **12**(1): p. 48.
307. Curtiss, L.K. and J.L. Witztum, *Plasma apolipoproteins AI, AII, B, CI, and E are glucosylated in hyperglycemic diabetic subjects*. *Diabetes*, 1985. **34**(5): p. 452-61.
308. Nobecourt, E., et al., *Nonenzymatic glycation impairs the antiinflammatory properties of apolipoprotein A-I*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(4): p. 766-72.
309. Hoang, A., et al., *Advanced glycation of apolipoprotein A-I impairs its anti-atherogenic properties*. *Diabetologia*, 2007. **50**(8): p. 1770-9.
310. Rashduni, D.L., et al., *Glycation of high-density lipoprotein does not increase its susceptibility to oxidation or diminish its cholesterol efflux capacity*. *Metabolism*, 1999. **48**(2): p. 139-43.
311. Femlak, M., et al., *The role and function of HDL in patients with diabetes mellitus and the related cardiovascular risk*. *Lipids Health Dis*, 2017. **16**(1): p. 207.
312. Hedrick, C.C., et al., *Glycation impairs high-density lipoprotein function*. *Diabetologia*, 2000. **43**(3): p. 312-20.
313. Ebtehaj, S., et al., *The anti-inflammatory function of HDL is impaired in type 2 diabetes: role of hyperglycemia, paraoxonase-1 and low grade inflammation*. *Cardiovasc Diabetol*, 2017. **16**(1): p. 132.
314. Kashyap, S.R., et al., *Glycation Reduces the Stability of ApoAI and Increases HDL Dysfunction in Diet-Controlled Type 2 Diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018. **103**(2): p. 388-396.
315. Godfrey, L., et al., *Arginine-directed glycation and decreased HDL plasma concentration and functionality*. *Nutr Diabetes*, 2014. **4**: p. e134.
316. Rashid, S., et al., *Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity*. *Clin Biochem*, 2003. **36**(6): p. 421-9.
317. Feng, X., et al., *Low apoA-I is associated with insulin resistance in patients with impaired glucose tolerance: a cross-sectional study*. *Lipids Health Dis*, 2017. **16**(1): p. 69.
318. Drew, B.G., et al., *High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Circulation*, 2009. **119**(15): p. 2103-11.
319. Fryirs, M.A., et al., *Effects of high-density lipoproteins on pancreatic beta-cell insulin secretion*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(8): p. 1642-8.
320. Srivastava, R.A.K., *Dysfunctional HDL in diabetes mellitus and its role in the pathogenesis of cardiovascular disease*. *Mol Cell Biochem*, 2018. **440**(1-2): p. 167-187.
321. Ford, I., et al., *A randomized controlled trial of platelet activity before and after cessation of clopidogrel therapy in patients with stable cardiovascular disease*. *J Am Coll Cardiol*, 2014. **63**(3): p. 233-9.
322. Miller, A.D. and J. Tanner, *Essentials of Chemical Biology: Structure and Dynamics of Biological Macromolecules*. 2008: Wiley.
323. Du, X., et al., *Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(2).
324. Gilson, M.K. and H.X. Zhou, *Calculation of protein-ligand binding affinities*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2007. **36**: p. 21-42.

325. Perozzo, R., G. Folkers, and L. Scapozza, *Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects*. J Recept Signal Transduct Res, 2004. **24**(1-2): p. 1-52.
326. Dayal, D., et al., *Severe early onset obesity due to a novel missense mutation in exon 3 of leptin gene in an infant from Northwest India*. J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2017.
327. Phizicky, E.M. and S. Fields, *Protein-protein interactions: methods for detection and analysis*. Microbiol Rev, 1995. **59**(1): p. 94-123.
328. Croney, J.C., D.M. Jameson, and R.P. Learmonth, *Fluorescence spectroscopy in biochemistry: teaching basic principles with visual demonstrations*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2001. **29**(2): p. 60-65.
329. Möller, M. and A. Denicola, *Study of protein-ligand binding by fluorescence*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2002. **30**(5): p. 309-312.
330. Canet, D., S. Bouguet-Bonnet, and S. Leclerc, *RMN express: résonance magnétique nucléaire : spins 1/2, état liquide*. 2010: Presses universitaires de Nancy.
331. Lambert, J.B. and E.P. Mazzola, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: An Introduction to Principles, Applications, and Experimental Methods*. 2004: Pearson Education.
332. Keeler, J., *Comprendre la RMN*. 2015: Presses polytechniques et universitaires romandes.
333. Ishima, R., *Protein-Inhibitor Interaction Studies Using NMR*. Appl NMR Spectrosc, 2015. **1**: p. 143-181.
334. Dalvit, C., et al., *Fluorine-NMR experiments for high-throughput screening: theoretical aspects, practical considerations, and range of applicability*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(25): p. 7696-703.
335. Meyer, B. and T. Peters, *NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors*. Angew Chem Int Ed Engl, 2003. **42**(8): p. 864-90.
336. Luo, R.S., M.L. Liu, and X.A. Mao, *NMR diffusion and relaxation study of drug-protein interaction*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 1999. **55A**(9): p. 1897-901.
337. Lepre, C.A., J.M. Moore, and J.W. Peng, *Theory and applications of NMR-based screening in pharmaceutical research*. Chem Rev, 2004. **104**(8): p. 3641-76.
338. Viegas, A., et al., *Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding*. Journal of Chemical Education, 2011. **88**(7): p. 990-994.
339. Dalvit, C., et al., *High-throughput NMR-based screening with competition binding experiments*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(26): p. 7702-9.
340. Dalvit, C., *Ligand- and substrate-based F-19 NMR screening: Principles and applications to drug discovery*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2007. **51**: p. 243-271.
341. Verdier, L., et al., *Dissociation-equilibrium constant and bound conformation for weak antibiotic binding interaction with different bacterial ribosomes*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 2000(12): p. 2363-2371.
342. Fielding, L., *NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants*. Curr Top Med Chem, 2003. **3**(1): p. 39-53.
343. Kabiri, M. and L.D. Unsworth, *Application of isothermal titration calorimetry for characterizing thermodynamic parameters of biomolecular interactions: peptide*

- self-assembly and protein adsorption case studies*. *Biomacromolecules*, 2014. **15**(10): p. 3463-73.
344. RICQUEBOURG, M., *Les maladies cardiovasculaires à La Réunion*, in *Tableau de bord*. 2017, Observatoire Régional de la Santé.
345. Fourcade N, V.L.F., Grémy I, Bourdillon F., *L'état de santé de la population en France – Rapport 2017*. DREES – Santé Publique France, 2017: p. 433p.
346. Gottschalk, M., K. Venu, and B. Halle, *Protein self-association in solution: the bovine pancreatic trypsin inhibitor decamer*. *Biophys J*, 2003. **84**(6): p. 3941-58.
347. Wang, Y., et al., *Transformation of oligomers of lipidated peptide induced by change in pH*. *Mol Pharm*, 2015. **12**(2): p. 411-9.
348. Frederiksen, T.M., et al., *Oligomerization of a Glucagon-like Peptide 1 Analog: Bridging Experiment and Simulations*. *Biophys J*, 2015. **109**(6): p. 1202-13.
349. Basiaga, S.B. and D.S. Hage, *Chromatographic studies of changes in binding of sulfonyleurea drugs to human serum albumin due to glycation and fatty acids*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010. **878**(30): p. 3193-7.
350. Matsuda, R., et al., *Studies of drug interactions with glycated human serum albumin by high-performance affinity chromatography*. *Rev Anal Chem*, 2014. **33**(2): p. 79-94.
351. Anguizola, J.A., S.B. Basiaga, and D.S. Hage, *Effects of Fatty Acids and Glycation on Drug Interactions with Human Serum Albumin*. *Curr Metabolomics*, 2013. **1**(3): p. 239-250.
352. Sun, C., et al., *Tobacco etch virus protease retains its activity in various buffers and in the presence of diverse additives*. *Protein Expr Purif*, 2012. **82**(1): p. 226-31.
353. Lerch, P.G., et al., *Production and characterization of a reconstituted high density lipoprotein for therapeutic applications*. *Vox Sang*, 1996. **71**(3): p. 155-64.
354. Ahn, K., et al., *A permanent human cell line (EA.hy926) preserves the characteristics of endothelin converting enzyme from primary human umbilical vein endothelial cells*. *Life Sci*, 1995. **56**(26): p. 2331-41.
355. McGrath, K.C., et al., *Role of 3beta-hydroxysteroid-delta 24 reductase in mediating antiinflammatory effects of high-density lipoproteins in endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(6): p. 877-82.
356. Cockerill, G.W., et al., *High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(11): p. 1987-94.
357. Ren, X., et al., *Editors: Kosuke Morikawa and Shin-ichi Tate 5 NMR structural studies of human apolipoprotein A-I at the lipid-free and HDL-associated states: A progress report*. 2006.
358. Besler, C., et al., *High-density lipoprotein-mediated anti-atherosclerotic and endothelial-protective effects: a potential novel therapeutic target in cardiovascular disease*. *Curr Pharm Des*, 2010. **16**(13): p. 1480-93.
359. Krause, B.R. and A.T. Remaley, *Reconstituted HDL for the acute treatment of acute coronary syndrome*. *Curr Opin Lipidol*, 2013. **24**(6): p. 480-6.
360. GhoshMoulick, R., et al., *Compensatory secondary structure alterations in protein glycation*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1774**(2): p. 233-42.
361. Curjuric, I., et al., *Alpha-1 antitrypsin deficiency: From the lung to the heart? Atherosclerosis*, 2018. **270**: p. 166-172.
362. Xu, W., L. Chen, and R. Shao, *Influence of glycation of plasma proteins in diabetes on the binding interaction with polyphenols*. *Curr Drug Metab*, 2014. **15**(1): p. 116-9.

363. Xie, Y., et al., *Glycation of plasma proteins in type II diabetes lowers the non-covalent interaction affinities for dietary polyphenols*. Integr Biol (Camb), 2012. **4**(5): p. 502-7.
364. van Dieren, S., et al., *The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2010. **17 Suppl 1**: p. S3-8.





## Résumé

Les interactions protéine-ligand interviennent dans de nombreux processus biochimiques et permettent notamment à certaines protéines sanguines d'assurer leur rôle de transport. Parmi ces protéines figurent notamment l'albumine, protéine la plus abondante du plasma, ou l'apolipoprotéine A1 (ApoA1), majoritaire au sein des lipoprotéines de haute densité (HDL). Dans un contexte diabétique, la glycation des protéines induit des modifications structurales affectant ainsi leur potentiel d'interaction.

Le premier objectif de ce travail de thèse visait à déterminer l'impact de la glycation de l'albumine sur sa liaison au liraglutide, un médicament de plus en plus utilisé dans le traitement du diabète de type 2. Ensuite, la seconde partie de ce travail a consisté en la production d'une ApoA1 humaine recombinante fonctionnelle afin d'étudier ses propriétés d'interaction, sous forme libre ou associée aux phospholipides. La technique RMN (résonance magnétique nucléaire) a été utilisée sur les protéines préalablement marquées au fluor (pour le liraglutide) ou aux isotopes stables  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  (pour l'ApoA1). La titration microcalorimétrique isotherme (ITC), méthode complémentaire à la RMN a été appliquée pour l'étude des interactions avec l'avantage de ne nécessiter aucun marquage. Différentes stratégies de clonage ont été explorées pour la surexpression de l'ApoA1 en bactérie *Clearcoli*.

Les résultats obtenus démontrent une altération de l'affinité de l'albumine pour le liraglutide *in vitro* et *in vivo*, dépendante du degré de glycation. Ces résultats, enrichis d'une analyse lipidomique et peptidique, permettent d'expliquer les observations cliniques concernant la baisse de l'efficacité de médicaments liant l'albumine chez les patients ayant un diabète mal contrôlé. Concernant l'ApoA1, le choix de l'étiquette de fusion reste à optimiser, mais sa surexpression de manière soluble et abondante a été obtenue pour l'ApoA1 marquée et non marquée.

Mots clés : glycation, interaction, albumine de sérum humain, liraglutide, apolipoprotéine A1

## Abstract

Protein-ligand interactions are involved in many biochemical processes. They are notably implicated in the role of transporter proteins in blood. Albumin, the most abundant plasma protein, and apolipoprotein A1 (ApoA1), which is the main component of high-density lipoprotein (HDL) belong to this class of proteins. In the context of diabetes, proteins are altered by glycation which leads to structural modifications and potentially affect their interactions.

The first objective of this work was to determine the impact of albumin glycation on its binding to liraglutide, a drug increasingly used in the treatment of type 2 diabetes. Then, the second part of this work involved the production of recombinant functional human ApoA1 in order to study its interaction properties, in its lipid-free form or associated with phospholipids. The NMR (nuclear magnetic resonance) technique has been used on proteins previously labeled with fluorine (for liraglutide) or stable  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  isotopes (for ApoA1). In addition, isothermal titration microcalorimetry (ITC), has been applied to the study of interactions with the advantage of not requiring any labeling. Various cloning strategies have been explored for the overexpression of ApoA1 in *Clearcoli* bacteria.

The results demonstrate an alteration of the affinity of albumin for liraglutide *in vitro* and *in vivo*, depending on the degree of glycation. These results, supported by a lipidomic and peptide analysis, explain clinical observations concerning the decrease of efficacy of albumin-binding drugs in patients with poorly controlled diabetes. Regarding ApoA1, the choice of the fusion tag remains to be optimized, but both labeled and unlabeled ApoA1 were successfully overexpressed at high yields in a soluble form.

Key words: glycation, interaction, human serum albumin, liraglutide, apolipoprotein A1

**LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT**

Je, soussigné(e) **Angélique GAJAHİ SOUDAHOME** en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint-Denis le : 03/05/2018

Signature :



**Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion**  
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

**Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat**

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de ces droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

**La contrefaçon et le faux**

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335\_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

**Le plagiat** est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.