Thèse d'exercice

Université de Limoges

Faculté de Pharmacie

Année 2020 Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 12 octobre 2020

Par **RAHALI Mohamed Ali**

Né(e) le 19 février 1991 à RABAT (MAROC)

Modifications post-traductionnelles de l'albumine comme biomarqueurs de l'atteinte hépatique

Thèse dirigée par **Dr. Souleiman EL BALKHI et Pr. Franck SAINT-MARCOUX**

Examinateurs :

Mme le Pr. Véronique LOUSTAUD-RATTI (PU-PH)	Juge
M. le Pr. Frédéric FAVREAU (PU-PH)	Juge
M. le Dr. Emmanuel BOURGOGNE (MCU-PH)	Juge
M. le Dr. Souleiman EL BALKHI (PH)	Directeur
M. le Pr. Franck SAINT-MARCOUX (PU-PH)	Co-directeur

Thèse d'exercice

Université de Limoges

Faculté de Pharmacie

Année 2020 Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 12 octobre 2020

Par **RAHALI Mohamed Ali**

Né(e) le 19 février 1991 à RABAT (MAROC)

Modifications post-traductionnelles de l'albumine comme biomarqueurs de l'atteinte hépatique

Thèse dirigée par **Dr. Souleiman EL BALKHI et Pr. Franck SAINT-MARCOUX**

Examinateurs :

Mme le Pr. Véronique LOUSTAUD-RATTI (PU-PH)	Juge
M. le Pr. Frédéric FAVREAU (PU-PH)	Juge
M. le Dr. Emmanuel BOURGOGNE (MCU-PH)	Juge
M. le Dr. Souleiman EL BALKHI (PH)	Directeur
M. le Pr. Franck SAINT-MARCOUX (PU-PH)	Co-directeur

Liste des enseignants

Le 1er septembre 2019

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	HÉMATOLOGIE
JOST Jérémy	PHARMACIE CLINIQUE

Licence CC BY-NC-ND 3.0

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BÉGAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTRÔLE DU MÉDICAMENT
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CHEMIN Guillaume	BIOCHIMIE
CLÉDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSÉE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FABRE Gabin	SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET INGÉNIERIE APPLIQUÉE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE
LAVERDET Betty	PHARMACIE GALÉNIQUE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE

Licence CC BY-NC-ND 3.0

MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
PASCAUD-MATHIEU Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATÉRIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

BOUDOT Clotilde	MICROBIOLOGIE (du 01/09/2018 au 31/08/2020)
MARCHAND Guillaume	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE (du 01/09/2019 au 31/08/2020)

PROFESSEURS EMERITES :

DREYFUSS Gilles (jusqu'au 31/03/2020)

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Remerciements

À Monsieur le Professeur Franck SAINT-MARCOUX. Tu me fais le grand honneur d'accepter d'être le président de ce jury. Pour ton accueil au sein du service, et tes conseils avisés, veuillez trouver dans ce travail le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

À Monsieur le Docteur Souleiman EL BALKHI. Tu m'as accordé ta confiance dans ce beau projet. Pour ton soutien, ta disponibilité, ta bonne humeur et ta gentillesse tout au long de ce travail. Reçois ici mes remerciements les plus sincères. Trouve dans ce travail le témoignage de ma profonde gratitude.

À Madame le Professeur Véronique LOUSTAUD-RATTI. Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

À Monsieur le Professeur Frédéric FAVREAU et Monsieur le Docteur Emmanuel BOURGOGNE. Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail. Recevez ici le témoignage de mon profond respect.

À Monsieur le Professeur Pierre MARQUET. Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire pour effectuer mes semestres d'internat et ma thèse. J'ai pu apprécier l'habituelle pertinence de vos propos lors de nos entretiens. Soyez assuré de ma profonde gratitude et de toute mon estime.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Je tiens à remercier :

Tout le personnel du service pharmacologie-toxicologie-pharmacovigilance, mais aussi de tout autre service dans lequel j'ai pu passer pour m'avoir aidée à progresser. Merci pour votre aide et votre bonne humeur. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous. Merci aux biologistes (JBW, Caro, Sylvain C., Nicolas), aux pharmacovigilants (Murielle, Anne, Claire, Hélène), aux ingénieurs (Sylvain D, Naïma et Arnaud) pour m'avoir enseigné les rudiments de la pharmacologie, de l'analytique ou de la recherche clinique, pour votre accueil et gentillesse. J'ai pris beaucoup de plaisir à apprendre et travailler avec vous et j'espère pouvoir longtemps continuer ainsi. Je remercie également tous les techniciens, techniciennes et secrétaires que j'ai eu la chance de rencontrer durant mes différents stages d'internat.

Toute l'unité INSERM-CHU 1248. Merci François-Ludovic pour ta rigueur, ta culture et ta maitrise de la LC-MS/MS. Merci à James pour ta bonne humeur et pour m'avoir appris les techniques nécessaires à ce travail toujours avec plaisir et patience. Merci à Hassan, Quentin, Tom, Roland, Florent, Benjamin, Antoine, Hélène, Emmanuelle, Gabin, Claire-Cécile, Jean-Seb, Angelika, Agota, Mehdi, Hugo, Marving pour votre soutien et tous ces bons moments passés dans l'unité.

Tous mes co-internes que j'ai eu la chance de côtoyer durant ces longues années d'études : Thomas, Sofiane, Haïfa, Joseph, Bénédicte, Alexandre, Marc, Pauline G, Camille, Céline, Pauline T, Jean-P***, Théo, Sébastien, Malika, Guillaume, Céline, également tous ceux du CBRS … Chacun d'entre vous m'aura apporté quelque chose.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

À mes proches :

À mes parents, qui ont fait de moi la personne que je suis et m'ont toujours soutenu et aidé malgré les difficultés. Merci pour la confiance que vous avez toujours eue en moi et pour les valeurs que vous m'avez inculquées qui m'ont permis de m'épanouir. Je vous aime.

À Meryem et Othmane, qui me supportent depuis toutes ces années dans les bons et les mauvais moments. Je vous aime

À Marine, mon amour. Merci d'être à mes côtés depuis bientôt 8 ans. Tu m'as toujours conforté dans mes choix et m'as apporté un soutien sans failles. Je t'aime.

Un remerciement tout particulier à **mes co-internes et amis, Thomas, Alexandre, Bénédicte, Joseph, Marc et Pauline**. Cet internat n'aurait jamais été les mêmes sans votre présence à mes côtés. À **Jean-Pascal et Pauline**, on a appris à se connaître un peu tardivement mais ne dit-on pas mieux vaut tard que jamais ! Ces années resteront de très bons souvenirs. Mais les nouveaux restent à écrire !!!

À mes amis de longue date, pour être restés présents malgré la distance : **Ali, Nasredine, Guigui, Thomas, Mister Andralay** sans vous ces années d'études auraient été bien tristes.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat : « **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** » disponible en ligne : *http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/*

Table des matières

Table des matières 11
Table des illustrations 14
Table des tableaux 16
Table des abréviations et des acronymes 17
I. Introduction 18
II. Contexte des travaux 20
II.1. HÉPATOTOXICITÉ 20
II.1.1. Hépatites toxiques 20
II.1.1.1. Généralités 20
II.1.1.2. Hépatite toxique alcoolique 21
II.1.1.3. Hépatite toxique chimique 22
II.1.2. Cirrhose 23
II.1.2.1. Définition & épidémiologie de la cirrhose 23
II.1.2.2. De la fibrose à la cirrhose : Physiopathologie & diagnostic 23
II.2. LES CANDIDATS BIOMARQUEURS DE L'HÉPATOTOXICITÉ 27
II.2.1. Glutamate Déshydrogénase (GLDH) 27
II.2.2. Kératine 18 (K18) 28
II.2.3. Sorbitol déshydrogénase (SDH) 28
II.2.4. Glutathion S-transférase (GST) 29
II.2.5. Acides biliaires 29
II.2.6. Ostéopontine (OPN) 30
II.2.7. « High mobility Group Box-1 » (HMGB1) 30
II.2.8. « Fatty Acid binding protein 1 » (FABP1) 31
II.2.9. Micro-ARN 122 (miR-122) 31
II.3. LA MOLÉCULE D'ALBUMINE 32
II.3.1. Synthèse, structure & principaux rôles de l'albumine 32
II.3.1.1. Synthèse 32
II.3.1.2. Structure générale 32
II.3.1.3. Rôles & fonctions 33
II.3.2. Modifications post-traductionnelles de l'albumine 34
II.3.2.1. Oxydation 34
II.3.2.2. Dimérisation 35
II.3.2.3. S-nitrosylation 35
II.3.2.4. Glycation 36
II.3.2.5. Troncature 36
II.3.2.6. Déhydroalanine conversion 36
II.3.2.7. Acétylation 37
II.3.3. Propriétés de fixation de l'albumine 37
II.3.3.1. Sites de liaison des métaux à l'albumine 37
II.3.3.2. Sites de fixation de la thyroxine à l'albumine 38
II.3.3.3. Interactions de différents métaux aux divers sites de liaison 39
II.3.3.3.1. Cuivre 39
II.3.3.3.2. Cadmium 39
II.3.3.3.3. Or 39

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II.4. ALTÉRATIONS DE L'ALBUMINE DANS LA CIRRHOSE 40
II.4.1. Isoforme tronquée N-terminale & cystéinylée de HSA dans la cirrhose ... 40
II.4.2. Albumine modifiée par l'ischémie dans la cirrhose 40
II.4.3. Formes dimériques de HSA dans la cirrhose 41
II.4.4. État redox de la Cys-34 dans la cirrhose 41
II.4.5. Capacité de liaison des ligands et capacités anti-oxydantes de HSA dans la cirrhose 41
III. OBJECTIFS & STRATÉGIE 42
IV. MATÉRIELS & MÉTHODES 43
IV.1. DÉVELOPPEMENT DU MODÈLE ANIMAL D'INSUFFISANCE HÉPATOCELLULAIRE 43
IV.1.1. Animaux 43
IV.1.2. Procédure expérimentale 43
IV.1.3. Analyses biochimiques du plasma 45
IV.1.4. Analyse anatomo-pathologique du foie 45
IV.2. RECRUTEMENT DE PATIENTS 46
IV.2.1. Patients 46
IV.2.2. Étude ALCIR 46
IV.3. ÉTUDE DE LA CAPACITÉ DE FIXATION DE LIGANDS A L'ALBUMINE : DOSAGE DES LIGANDS NON FIXÉS PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE A PLASMA A COUPLAGE INDUCTIF (ICP-MS) 47
IV.3.1. Plan d'expérience 47
IV.3.2. Appareillage 47
IV.3.3. Ultrafiltration du plasma 48
IV.3.4. Solvants et autres réactifs 48
IV.3.5. Solutions standards de travail 49
IV.3.6. Préparation de la gamme d'étalonnage 49
IV.3.7. Contrôles de qualité 49
IV.3.8. Préparation des échantillons (contrôles et patients/animaux) 49
IV.4. ÉTUDE DES DIFFÉRENTES ISOFORMES DE L'ALBUMINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À UN SPECTROMÈTRE DE MASSE HYBRIDE TANDEM/ANALYSEUR À TEMPS DE VOL (micro-LC-QTOF) 50
IV.4.1. Préparation des échantillons 50
IV.4.2. Conditions analytiques 50
IV.4.3. Estimation de l'abondance relative des isoformes 51
IV.5. ANALYSES STATISTIQUES 52
IV.5.1. Étude des modifications chimiques et structurelles de l'albumine 52
IV.5.2. Modèle expérimental 52

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V. RÉSULTATS DES TRAVAUX 53
V.1. EXPLORATION DE LA FIXATION DU CADMIUM SUR LE MULTIMETAL BINDING SITE (MBS) CHEZ L'HOMME 53
V.2. EXPLORATION DE LA FIXATION DE LA DANSYLSARCOSINE SUR LE DRUG BINDING SITE 2 (DBS-2) CHEZ L'HOMME 54
V.3. EXPLORATION DE LA FIXATION DES DIFFÉRENTS LIGANDS À L'HSA CHEZ L'HOMME 56
V.4. MODÈLE EXPÉRIMENTAL ANIMAL 57
V.4.1. Effets de la toxicité induite par EtOH sur les paramètres biochimiques ... 57
V.4.2. Étude des différentes isoformes de l'albumine 58
V.4.2.1. Identification des isoformes 58
V.4.2.2. Estimation de l'abondance relative des isoformes 60
V.4.2.2.1. Modèle de toxicité induite par EtOH 60
V.4.2.2.2. Modèle de toxicité induite par CCl_4 61
V.4.3. Analyse des capacités de fixation des ligands par l'albumine 62
V.4.3.1. Modèle de toxicité induite par EtOH 62
V.4.3.2. Modèle de toxicité induite par CCl_4 63
V.4.4. Analyse anatomopathologique du foie 63
V.5. ÉTUDE « ALCIR » 64
V.5.1. Étude des différentes isoformes de l'albumine (cohorte de développement et cohorte de validation 64
V.5.2. Analyse des capacités de fixation des ligands par l'albumine (SEB-Test) 65
V.5.2.1. Cohorte de développement 65
V.5.2.2. Cohorte de validation 66
V.5.2.3. Cohorte de développement et de validation 68
VI. DISCUSSION & CONCLUSION 69

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Table des illustrations

Figure 1 : Mécanisme à l'origine de l'hépatotoxicité du tétrachlorure de carbone (d'après Megarbane et al., 2007). 22

Figure 2 : Classification de Child-Turcotte-Pugh pour la gravité de la cirrhose. 26

Figure 3 : Score MELD (model for end-stage liver disease). 26

Figure 4 : Score ALBI (albumine-bilirubine). 27

Figure 5 : Les PTM les plus abondantes affectant la structure HSA (d'après Naldi et al., 2017). 34

Figure 6 : Les différents états redox de l'HSA (d'après Watanabe et al., 2017). 35

Figure 7 : Structure tertiaire de l'HSA avec ses sites de fixation (d'après Sand et al., 2015). 37

Figure 8 : Sites de fixation de la L-thyroxine sur l'HSA (d'après Fanali et al., 2012). 38

Figure 9 : Schéma expérimental. 44

Figure 10 : Fixation du cadmium à l'albumine sérique humaine (HSA) chez les sujets témoins (10-A : à gauche ; 10-B : à droite). 53

Figure 11 (à gauche) : Fixation du cadmium à l'HSA chez les témoins et les cirrhotiques, pour un rapport « cadmium ajouté sur la valeur d'HSA mesurée » de 50. 54

Figure 12 (à droite) : Courbe ROC représentant sensibilité en fonction de 1-spécificité pour la cirrhose en fonction du seuil de cadmium libre. 54

Figure 13 : Fixation de la dansylsarcosine à l'albumine sérique humaine (HSA) chez les sujets témoins. 55

Figure 14 (à gauche) : Fixation de la dansylsarcosine à l'HSA chez les témoins et les cirrhotiques, pour un rapport « dansylsarcosine ajoutée sur la valeur d'HSA mesurée » de 20. 55

Figure 15 (à droite) : Courbe ROC représentant sensibilité en fonction de 1-spécificité pour la cirrhose en fonction du seuil de la dansylsarcosine. 55

Figure 16 : Fixation de différents ligands à l'HSA chez des sujets sains (n = 12) et des sujets cirrhotiques (n = 12), un rapport « ligands ajouté sur la valeur d'HSA mesurée » de 5 pour le cuivre (A), cadmium (B) et thyroxine (C) et de 50 pour l'or (D). 56

Figure 17 : Pic chromatographique de l'albumine sérique du rat (à gauche) et son courant total ionique (TIC) (à droite). 58

Figure 18 : Spectre de déconvolution de l'albumine du rat dans le modèle d'hépatotoxicité induite par EtOH. 59

Figure 19 : Spectre de déconvolution de l'albumine du rat dans le modèle d'hépatotoxicité induite par CCl_4. 59

Figure 20 : Abondances relatives de chaque isoforme chez le modèle d'hépatotoxicité induite par EtOH (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). 60

Figure 21 : Abondances relatives de chaque isoforme chez le modèle d'hépatotoxicité induite par CCl_4 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). 61

Figure 22 : Évolution de la fixation de différents ligands à l'albumine chez des rats mâles Wistar albinos dans un modèle de toxicité induite par EtOH pour un rapport « ligands ajouté sur la valeur d'HSA mesurée » de 5 pour le cuivre (A), le cadmium (B) et la L-thyroxine (D) et de 50 pour l'or (C) (: $p < 0,01$).** 62

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Figure 23 : Évolution de la fixation de différents ligands à l'albumine chez des rats mâles Wistar albinos dans un modèle de toxicité induite par CCl_4 pour un rapport « ligands ajouté sur la valeur d'HSA mesurée » de 5 pour le cuivre (A), le cadmium (B) et la L-thyroxine (D) et de 50 pour l'or (C) (: *p* < 0,01).** 63

Figure 24 : Abondances relatives de chaque isoformes dans la cohorte de développement et la cohorte de validation. 64

Figure 25 : Évaluation de la capacité fixation de différents ligands à l'albumine dans la cohorte de développement (** : *p* < 0,0001).** 65

Figure 26 : Évaluation de la capacité fixation de différents ligands à l'albumine dans la cohorte de développement (** : *p* < 0,0001).** 66

Figure 27 : Courbes ROC représentant sensibilité en fonction de 1-spécificité pour la cirrhose en fonction du seuil des différents ligands (Se : sensibilité, Sp : spécificité). 67

Figure 28 : Discrimination des patients de la cohorte de développement par analyse en composantes principales sur tous les résultats obtenus avec le SEB-test (triangle vert : « témoins » ; cercle rouge : « cirrhotiques »). 68

Figure 29 : Discrimination des patients de la cohorte de validation par analyse en composantes principales sur tous les résultats obtenus avec le SEB-test (triangle vert : « témoins » ; cercle rouge : « cirrhotiques »). 68

Figure 30 : Localisation des sites spécifiques de fixation du cuivre, NTS et MBS-A, sur l'HSA (Di Meo et al., 2019) (à gauche). 70

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Table des tableaux

Tableau 1 : Effet de la toxicité de l'EtOH sur divers paramètres biochimiques exprimés sous la forme de médiane [min-max] (* p < 0,05). 57

Tableau 2 : Effet de la toxicité du CCl4 sur divers paramètres biochimiques exprimés sous la forme de médiane [min-max] (* p < 0,05 ; ** p < 0,01). 57

Tableau 3 : Masse correspondant à chaque isoforme identifiée. 58

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Table des abréviations et des acronymes

ACP : Analyse en composante principale
ALAT : Alanine aminotransférase
ALB : Albumine
ASAT : Aspartate aminotransférase
AUC : Aire sous la courbe
BILID : Bilirubine directe ou conjuguée
BILIT : Bilirubine totale
BSA : Albumine bovine sérique
CCl_4 : Tétrachlorure de carbone
CRP : Protéine C réactive
DBS : Drug binding sit
DHA : Déhydroalanine
DRC : Dynamic Reaction Cell
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
Et3PAuCl : Chloro(triethylphosphine)gold(I)
EtOH : Éthanol
FABP : Fatty Acid binding protein 1
GLDH : Glutamate Déshydrogénase
GST : Glutathion S-transférase
HGE : Hépatogastroentérologie
HMA : Mercaptalbumine
HMGB1 : High mobility Group Box-1
HNA-1 : Non-mercaptalbumine-1
HNA-2 : Non-mercaptalbumine-2
HSA : Albumine sérique humaine
ICP-MS : Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif
IMA : Albumine modifiée par l'ischémie
K18 : Kératine 18
LDH : Lactate déshydrogénase
MBS : Multimetal binding site
MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1
MELD : Model for end stage liver disease
mi-R 122 : Micro-ARN 122
NO : Monoxyde d'azote
NTA : Acide nitrilotriacétique
NTS : N-terminal binding site
OPN : Ostéopontine
PAL : Phosphatase alcaline
PBH : Ponction biopsie hépatique
PTM : Modification post-traductionnelle
ROC : Receiver Operating Characteristic
SDH : Sorbitol déshydrogénase
SEB Test : Serum Enhanced Binding Test
TGFβ : transforming growth factor
γGT : Gamma glutamyltransférases

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I. Introduction

La plupart des maladies hépatiques chroniques sont notoirement asymptomatiques, jusqu'à ce qu'une cirrhose avec décompensation clinique se produise (Domenicali et al., 2014). En France, la prévalence de la cirrhose est environ de 1 500 à 2 500 cas par million d'habitants, avec une incidence annuelle de 150 à 200 cas par million d'habitants. Le nombre de décès est environ de 15 000 par an. La prévention de la cirrhose et l'utilisation de stratégies de diagnostic précoce sont vitales pour maintenir les patients dans un état asymptomatique et pour retarder la décompensation, et ainsi améliorer la prise en charge et la qualité de vie des patients. Ceci est particulièrement critique chez les patients transplantés hépatiques. Dans la cirrhose précoce, l'imagerie conventionnelle et les tests de laboratoire, souvent combinés dans les scores, peuvent conduire à un diagnostic faussement négatif (Domenicali et al, 2014). Malgré leur manque de sensibilité et de spécificité, ces tests sont couramment utilisés pour explorer l'intégrité des hépatocytes (aspartate transaminase et alanine transaminase), ainsi que des voies biliaires (phosphatase alcaline et *gamma*-glutamyltransférase) et de synthèse (ammoniac, temps de prothrombine et albumine).

Puisque l'albumine sérique humaine (HSA) est exclusivement synthétisée dans le foie, non seulement sa quantité (60% de toutes les protéines sanguines normalement) mais également sa qualité peuvent refléter un dysfonctionnement hépatique. En effet, l'albumine présente une structure tridimensionnelle particulière, avec plusieurs sites de liaison pour plusieurs ligands endogènes et exogènes (agissant comme chélateur primaire dans le sang).

L'albumine subit plusieurs modifications post-traductionnelles dans les hépatocytes, notamment : acétylation, cystéinylation, homocystéinylation, glutathionylation, glycosylation, glycation, nitrosylation, nitration, phosphorylation et oxydation. La pertinence clinique de certaines de ces modifications a été récemment étudiée dans les maladies hépatiques avancées (Naldi et al., 2016, Domenicali et al., 2014, Oettl et al., 2013). De telles modifications de la structure de l'HSA se traduisent par des modifications de sa conformation et de ses propriétés de liaison (Kawakami et al, 2006). Cet aspect a été exploité par Bar-Or et al. dans l'ischémie cardiaque, qui a développé le test de liaison de l'albumine au cobalt également connu sous le nom de test d'albumine modifiée par ischémie (IMA) (Bar et al., 2000).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Le test IMA est basé sur le fait que la structure de l'HSA est modifiée par le stress ischémique en coupant les deux premiers résidus (Asp-Ala) au niveau du site N-terminal (Asp-Ala-His-Lys) ; un des sites supposés de fixation du cobalt. Depuis l'acceptation de l'IMA comme biomarqueur de l'ischémie cardiaque par la FDA, ce test a également été étudié dans les maladies hépatiques montrant une corrélation avec la sévérité de la cirrhose (Klammt et al., 2007).

En bref, le test IMA est effectué en ajoutant du cobalt ($CoCl_2$) et du dithiothréitol au sérum, suivi d'une mesure colorimétrique du complexe (free-Co) - dithiothréitol à 470 nm. Cependant, il existe toujours un besoin de biomarqueur supplémentaire de dysfonctionnement hépatique.

Des travaux réalisés au sein de notre équipe de recherche, l'UMR 1248 (IPPRITT), ont montré que les modifications structurales de l'albumine pourraient être utilisées comme biomarqueurs d'une atteinte précoce de la fonction hépatique en exploitant la capacité de l'albumine modifiée à fixer ou non certains ligands, tel que le cuivre, l'or ou la L-thyroxine. La capacité de fixation du cuivre, de l'or et la L-thyroxine sur l'HSA était significativement inférieure chez les patients cirrhotiques ; et certaines modifications post-traductionnelles de l'albumine, en identifiant et quantifiant cinq différentes isoformes, étaient significativement plus importantes chez les patients cirrhotiques.

À ce stade, les résultats obtenus par l'équipe de recherche sont donc en faveur de l'hypothèse que, dans des conditions de souffrance hépatique, la structure de l'albumine puisse subir des modifications post-traductionnelles, conduisant à une modification de fixation des ligands sur celle-ci.

Les objectifs principaux de mes travaux étaient divisés en trois parties. La première partie consistait à suivre l'évolution des modifications post-traductionnelles de l'albumine dès l'induction d'une atteinte hépatique toxique. La stratégie choisie a consisté à provoquer une souffrance hépatique dans plusieurs modèles animaux puis à suivre l'évolution de la structure de l'albumine. La seconde partie était d'explorer d'autres sites de fixation de l'albumine en étudiant la capacité de fixation du cadmium et de la dansylsarcosine. Enfin, la dernière partie a permis de valider les performances du SEB Test (Serum Enhanced Binding Test) dans la cirrhose hépatique via une cohorte de patients hospitalisés.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II. Contexte des travaux

II.1. HÉPATOTOXICITÉ

II.1.1. Hépatites toxiques

II.1.1.1. Généralités

Les hépatites toxiques aiguës correspondent à une atteinte hépatique secondaire à une substance exogène, médicamenteuse ou non. L'incidence globale des hépatites toxiques n'est pas connue, mais leur fréquence est probablement élevée car un effet indésirable médicamenteux sur 10 touche le foie. De plus, on estime qu'un grand nombre de cas d'atteinte hépatique toxique mineure passent inaperçus (Megarbane et al., 2007). Les hépatites aiguës toxiques sont responsables d'environ 10 % des insuffisances hépatiques aiguës et sont la première cause de transplantation hépatique aux États-Unis (Navarro et *al.*, 2006). Seules des données sur les formes symptomatiques, le plus souvent graves, provenant de déclarations de pharmacovigilance ou des registres des transplantations américains ou européens sont connues. Toute la gravité des hépatites aiguës toxiques repose sur le degré d'insuffisance hépatique, qui dans sa forme extrême est représentée par l'hépatite fulminante.

Une étude récente a recueilli, sur trois ans, tous les cas symptomatiques déclarés de toxicité hépatique aux alentours de la ville de Nevers (Sgro C et al., 2002). Elle a rapporté une incidence de 14 cas par an pour 100 000 habitants, un ratio femme/homme de 0,9 avant 49 ans et 2,6 après 50 ans, un taux d'hospitalisation de 12 % et une mortalité de 6 %.

Les principaux toxiques en cause sont médicamenteux (paracétamol, antibiotiques, antiépileptiques) ou non médicamenteux : champignons (amanite phalloïde), et plus rarement les produits de phytothérapie, les substances illicites et des produits chimiques industriels. Les mécanismes de l'atteinte hépatique sont bien entendu très différents en fonction du toxique, et l'hépatotoxicité peut être soit prévisible (elle est alors dose dépendante), soit imprévisible (elle est alors indépendante de la dose et dite « idiosyncrasique » ou « immuno-allergique »).

Les mécanismes responsables de l'hépatotoxicité sont divers et souvent multiples pour un même toxique : altération de la membrane cellulaire, inhibition de protéines de transport, formation d'un métabolite actif, immuno-toxicité ou atteinte mitochondriale (Lee et al., 2003).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Le diagnostic d'hépatite aiguë toxique, hormis le cas évident d'intoxication volontaire massive avec un produit connu pour ces effets hépatotoxiques comme le paracétamol, est avant tout un diagnostic d'élimination. Aucun examen biologique, ni même la biopsie hépatique ne sont assez spécifiques pour porter le diagnostic d'atteinte toxique. Avant d'en arriver à la conclusion que l'origine de l'intoxication est toxique, d'autres causes plus fréquentes doivent être éliminées.

De ce fait, devant toute hépatite aiguë, la démarche devra être rigoureuse, visant tout d'abord à évaluer la gravité de l'insuffisance hépatique, éviter son aggravation en débutant un traitement spécifique s'il y a lieu, évaluer son retentissement sur les principaux organes, établir l'étiologie, évaluer la nécessité de transférer ou non le patient vers un centre permettant une suppléance hépatique et/ou une transplantation (Amathieu et al., 2011).

II.1.1.2. Hépatite toxique alcoolique

La forme typique d'hépatite alcoolique présente un tableau subaigu fébrile avec ictère et hépatomégalie douloureuse (50% des cas) (Menon et *al.*, 2001). Elle peut également être asymptomatique ou responsable d'une décompensation d'une cirrhose éthylique sous-jacente (40% des cas), avec ses complications habituelles (encéphalopathie, syndrome hémorragique ou ascite). Les transaminases excèdent rarement 300 UI/L, avec un rapport ASAT/ALAT supérieur à deux mais l'hyperbilirubinémie peut être très marquée, atteignant 300-500 µM. Il s'y associe souvent une hyperleucocytose (jusqu'à 50 g/L), un allongement du TP et une hypoalbuminémie (Megarbane et al., 2007).

Les lésions hépatiques résultent de la toxicité de l'acétaldéhyde ainsi que de la production locale de cytokines pro-inflammatoires (TNFalpha, IL-1, IL-6 et IL-8) et de radicaux libres à l'origine d'une altération mitochondriale (Tilg et al., 2000). Le diagnostic de certitude est obtenu par la biopsie hépatique (souvent réalisée par voie transjugulaire), montrant une ballonisation avec nécrose acidophile des hépatocytes dans la région centrolobulaire associée à une infiltration diffuse, mais modérée par des polynucléaires neutrophiles et une fibrose périsinusoïdale. Les hépatocytes contiennent des mitochondries géantes et des corps hyalins de Mallory. La stéatose hépatique macrovacuolaire est quasi-constante (Megarbane et al., 2007). L'hépatite alcoolique s'aggrave généralement durant les premières semaines d'hospitalisation. Le taux de mortalité peut atteindre 40 %. La guérison est lente (jusqu'à six mois), malgré l'arrêt définitif de l'alcool. Une alimentation hypercalorique est généralement recommandée.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

L'efficacité des corticoïdes est controversée. En l'absence de contexte infectieux ou d'hémorragie digestive, la méthylprednisolone à 32 mg/jour pendant un mois pourrait améliorer la survie à court terme des patients présentant une hépatite alcoolique grave (Mathurin et al., 2002).

II.1.1.3. Hépatite toxique chimique

Les hydrocarbures halogénés (chloroforme, trichloroéthylène, perchloroéthylène, etc.) sont pourvoyeurs d'hépatotoxicité. Le plus emblématique d'entre eux est le tétrachlorure de carbone (CCl_4), autrefois utilisé par les industries chimiques (agent dégraissant) et agricoles (insecticide utilisé en fumigation pour le grain) et même abusé en sniff par certains toxicomanes. La molécule est transformée en métabolites hautement toxiques, inducteurs de radicaux libres et d'adduits **(figure 1)**. L'action de ces métabolites toxiques conduit à une nécrose hépatocytaire suivi par des réactions de peroxydation des lipides des membranes cellulaires, des réactions d'inhibition enzymatique et des réactions de liaison covalente avec les macromolécules cellulaires (Ouattara, 1999).

Le CCl_4, via son mécanisme de toxicité indirecte, est à l'origine d'une nécrose hépatocytaire centrolobulaire accompagnée d'ictère et de nécrose tubulaire rénale, généralement précédée de manifestations transitoires neurologiques (vertiges, troubles visuels, confusion) et digestives (douleurs abdominales, vomissements, diarrhées). La N-acétylcystéine a été proposée avec efficacité dans cette intoxication (Megarbane et al., 2007). Les expositions chroniques aux solvants sont à l'origine de cirrhose micro- et macronodulaire. Après une phase initiale de troubles digestifs, il induit une hépatite stéatosique médiolobulaire associée à une nécrose tubulaire rénale et à une psychose toxique. L'exposition chronique à cet agent peut être à l'origine d'évolution vers une cirrhose (Megarbane et al., 2007).

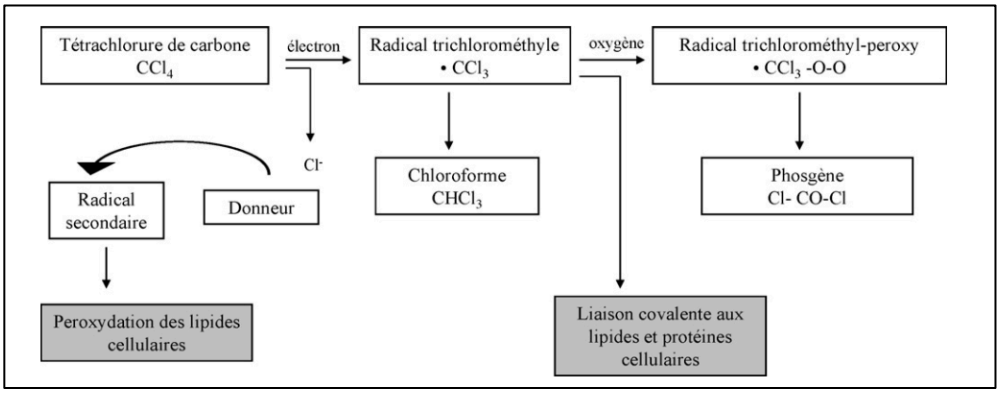

Figure 1 : Mécanisme à l'origine de l'hépatotoxicité du tétrachlorure de carbone (d'après Megarbane et al., 2007).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II.1.2. Cirrhose

II.1.2.1. Définition & épidémiologie de la cirrhose

La cirrhose est définie par des critères histologiques et résulte d'un processus diffus, caractérisé par une fibrose mutilante et une transformation de l'architecture normale du foie conduisant à des nodules de régénération hépatocytaire de structure anormale (définition OMS, 1977). Stade ultime et évolué de la fibrose, la cirrhose progresse vers une insuffisance hépatocellulaire due à la diminution du nombre des hépatocytes fonctionnels et une hypertension portale secondaire à des modifications de la microcirculation hépatique.

L'apparition d'une cirrhose est la conséquence d'une hépatopathie chronique. Chez l'adulte, dans les pays occidentaux, les principales étiologies de la cirrhose sont l'alcool (50 à 75 %) et les infections par le virus de l'hépatite C (15 à 25 %) ou le virus de l'hépatite B (5 %). Les autres causes sont plus rares (5 %) : maladies métaboliques (hémochromatose, maladie de Wilson, déficit en alpha1-antitrypsine), maladies auto-immunes (hépatite auto-immune, cirrhose biliaire primitive, cholangite sclérosante primitive), thrombose des veines hépatiques (syndrome de Budd-Chiari), intoxications médicamenteuses (Voitot, 2006).

La cirrhose est une maladie fréquente dont l'incidence est probablement sous-estimée par l'absence de signes cliniques et biologiques spécifiques. En France, la prévalence de la cirrhose est environ de 1 500 à 2 500 cas par million d'habitants, avec une incidence annuelle de 150 à 200 cas par million d'habitants. Le nombre de décès est environ à 15 000 par an. Ils sont en grande partie liés à l'une des complications possibles de la cirrhose, telles que des hémorragies digestives, des infections, une insuffisance hépatique terminale et, de plus en plus, un carcinome hépatocellulaire.

II.1.2.2. De la fibrose à la cirrhose : Physiopathologie & diagnostic

Les critères pathologiques de la cirrhose sont des lésions chroniques irréversibles du parenchyme hépatique et une fibrose extensive associées à la formation de nodules de régénération (Brawn Wold et al., 2002).

Plusieurs phénomènes participent aux lésions des cellules hépatiques : la formation accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (O_2^{--}, OH_2^{-}, H_2O_2), associée à une carence simultanée en antioxydant (glutathion) et/ou à un dysfonctionnement des enzymes protectrices (glutathion peroxydase, super-oxyde dismutase).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Les ERO réagissent, entre autres, avec les acides gras insaturés des phospholipides (peroxydation lipidique), ce qui conduit à une lésion de la membrane plasmique et des organites cellulaires (lysosomes, réticulum endoplasmique). Ceci provoque à son tour une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, avec une activation de protéases et d'autres enzymes, induisant finalement des lésions cellulaires irréversibles (Mac Sween et al., 1994).

La fibrose hépatique, résulte d'un déséquilibre entre fibrogenèse et fibrolyse au profit de la fibrogenèse, et cela se déroule en plusieurs étapes. Lors de la mort des hépatocytes lésés, les enzymes lysosomiales déversées libèrent, entre autres, des cytokines issues de la matrice extracellulaire. Les cytokines et les débris cellulaires provenant des cellules mortes provoquent l'activation des cellules de Küpffer dans les sinusoïdes hépatiques et attirent des cellules inflammatoires. Les cellules de Küpffer et les cellules inflammatoires recrutées secrètent des cytokines (TGFβ, MCP-1) qui vont transformer les cellules stellaires (ou cellules de Ito) hépatiques en myofibroblastes, convertissent les monocytes circulants en macrophages activés et déclenchent la prolifération des fibroblastes. De cela résulte une augmentation de la synthèse de la matrice extracellulaire par les myofibroblastes et les fibroblastes, avec un dépôt accru dans l'espace de Disse, de collagènes (type I, III, IV) de protéoglycanes et de glycoprotéines (Siberngal et al., 2000).

Pour compenser la destruction des hépatocytes, il se produit une régénération des hépatocytes restants. Du fait de la fibrose, cette régénération des hépatocytes n'aboutit plus à la reconstitution de lobules normaux, mais à la formation d'amas d'hépatocytes ayant perdu leurs connexions vasculaires et biliaires ; c'est à ces amas d'hépatocytes qu'on donne le nom de nodules de régénération. Le stade le plus avancé de la fibrose hépatique est la cirrhose (Bataller et al., 2005).

La cirrhose peut évoluer silencieusement sur plusieurs années par des stades intermédiaires selon le degré d'inflammation (hépatique chronique) et de fibrose. Elle est insidieuse et reste longtemps asymptomatique. La vitesse d'évolution de la maladie et la survenue de complications sont très souvent imprévisibles.

La cirrhose est souvent diagnostiquée au stade des complications, car elle peut ne présenter aucun signe à ses débuts et les premières plaintes sont généralement peu spécifiques (fatigue, nausées, vagues douleurs dans l'hypochondre droit, perte d'appétit, amaigrissement, etc.). Le diagnostic aux stades précoces est difficile et repose sur des signes cliniques évocateurs tels qu'un foie de consistance dure, des angiomes stellaires, une splénomégalie, une ascite ou un ictère.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Les examens biologiques de dépistage et de suivi de la cirrhose sont basés sur l'évaluation de fonctions essentielles assurées exclusivement par le foie comme la synthèse des facteurs de coagulation (taux de prothrombine, facteur V) et de l'albumine, ou encore le catabolisme et l'élimination de molécules telles que les immunoglobulines A polyclonales ou la bilirubine. La cytolyse des hépatocytes est évaluée par la libération des transaminases dans la circulation sanguine, la cholestase par une augmentation des phosphatases alcalines (PAL) et des *gamma*-glutamyltransférases (γGT).

Le diagnostic de certitude est fait par l'analyse anatomo-pathologique du tissu hépatique via une biopsie hépatique. La biopsie hépatique est utile pour affirmer le diagnostic de cirrhose et contribue à la recherche de la cause de celle-ci. En France, la Haute Autorité de Santé (HAS) recommande, dans certaines circonstances, l'utilisation des tests diagnostiques non invasifs pour le diagnostic de fibrose hépatique et la cirrhose, qui incluent un examen physique avec mesure de l'élasticité hépatique par ultrasons (FibroScan®) ainsi que des tests sanguins sous forme de score (FibroTest®, FibroMètre®, HepaScore®). Cependant, le manque de spécificité et de sensibilité de l'ensemble de ces examens limite l'amélioration attendue de la prise en charge thérapeutique des patients.

Afin d'évaluer la sévérité et le pronostic de la cirrhose, l'existence de scores fiables est d'importance capitale dans la prise en charge de la cirrhose.

Le score Child-Pugh (figure 2) est utilisé depuis plus de 40 ans. Il a été initialement proposé afin d'évaluer les résultats des patients cirrhotiques après une chirurgie de l'hypertension portale et a progressivement été plus largement accepté (Pugh et al., 1973). Deux types modifiés de score Child-Pugh englobant la créatinine sérique ont également été évalués (Angermayr et al., 2002).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Child-Turcotte-Pugh Classification for Severity of Cirrhosis			
Clinical and Lab Criteria	Points*		
	1	2	3
Encephalopathy	None	Grade 1 or 2	Grade 3 or 4
Ascites	None	Mild to moderate (diuretic responsive)	Severe (diuretic refractory)
Bilirubin (mg/dL)	< 2	2-3	>3
Albumin (g/dL)	> 3.5	2.8-3.5	<2.8
Prothrombin time			
Seconds prolonged *or*	<4	4-6	>6
International normalized ratio	<1.7	1.7-2.3	>2.3
*Child-Turcotte-Pugh Class obtained by adding score for each parameter (total points)			
Class A = 5 to 6 points			
Class B = 7 to 9 points			
Class C = 10 to 15 points			

Figure 2 : Classification de Child-Turcotte-Pugh pour la gravité de la cirrhose.
Le score de CTP utilise 2 paramètres cliniques (encéphalopathie et ascite) et 3 paramètres biologiques (bilirubine, albumine et temps de prothrombine). Les patients sont classés en classe A, B et C en fonction de leurs points totaux (Pugh et al., 1973).

Le MELD (model for end-stage liver disease) (figure 3) a été appliqué pour la première fois aux patients subissant des shunts porto-systémiques intrahépatiques transjugulaires (Malinchoc et al., 2000), mais depuis 2002, il est utilisé pour évaluer les candidats à une transplantation hépatique (Wiesner et al.,2003). Le MELD-Na, un score MELD modifié incorporant le sodium sérique, a été utilisé pour la prédiction de la survie, en tenant compte de l'importance de l'hyponatrémie dans la mortalité précoce par cirrhose (Londoño et al., 2007, Biggins et al, 2005).

Model for End Stage Liver Disease (MELD) Score

$$\textbf{MELD} = 3.78 \times \log_e \text{serum bilirubin (mg/dL)} + 11.20 \times \log_e \text{INR} + 9.57 \times \log_e \text{serum creatinine (mg/dL)} + 6.43 \text{ (constant for liver disease etiology)}$$

Figure 3 : Score MELD (model for end-stage liver disease).
Le calcul du score MELD est complexe comme le montre la formule ci-dessus et doit être réalisé via un calculateur. De nombreux ressources en ligne gratuites proposent de le calculer.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Le score ALBI (albumine-bilirubine) (figure 4) a été récemment proposé. Il s'agit d'un score très simple qui incorpore seulement ces 2 paramètres, disponibles usuellement pour chaque patient cirrhotique. Le score ALBI a été rapporté pour évaluer le dysfonctionnement hépatique et le pronostic chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire, chez les patients atteints de cholangite biliaire primitive, chez les patients cirrhotiques avec hémorragie gastro-intestinale haute et dans diverses hépatites B maladies du foie liées au virus (Johnson et al., 2015, Fragaki et al., 2019).

ALBI Score = ($\log_{10}$ Bilirubine x 0.66) (Albumine x 0.085)

ALBI Grade 1 : score ⩽ - 2.60
ALBI Grade 2 : score > - 2.60 à ⩽ -1.39
ALBI Grade 3 : score > -1.39

Figure 4 : Score ALBI (albumine-bilirubine).
Le score ALBI utilise 2 paramètres 2 paramètres biologiques (bilirubine, albumine). Les patients sont classés en grade 1, 2 et 3 selon une formule (Johnson et al., 2015).

II.2. LES CANDIDATS BIOMARQUEURS DE L'HÉPATOTOXICITÉ

Les biomarqueurs utilisés en routine manquent de spécificité et de sensibilité pour prévenir l'évolution clinique de la maladie. Plusieurs marqueurs sont prometteurs et pourraient améliorer la prévention des atteintes hépatique. Parmi eux, la glutamate déshydrogénase, la kératine 18, la sorbitol déshydrogénase, la glutathion S-transférase, les acides biliaires, l'ostéopontine et le miR-122.

II.2.1. Glutamate Déshydrogénase (GLDH)

La GLDH est une protéine mitochondriale codée par un gène nucléaire. Elle est impliquée dans l'oxydation des acides aminés et la production d'urée. Elle est spécifique du foie car elle est localisée uniquement dans la matrice mitochondriale des hépatocytes. Cette localisation permet de refléter la perte d'intégrité mitochondriale des cellules hépatiques (Singhal et al., 2014). Elle n'est pas augmentée lors d'un exercice physique comparé aux transaminases (Schmidt and Schmidt, 1988).

D'après Schomaker et al., les taux de GLDH ne sont pas différents entre des sujets sains et des sujets ayant une atteinte chronique du foie (Schomaker et al., 2013). Cependant, une nécrose n'entraîne pas forcément de toxicité mitochondriale. Cela s'appuie sur une expérience dans laquelle une dose élevée de furosémide administrée chez des souris provoquerait une nécrose hépatocytaire, avec des taux d'ALAT élevé mais sans augmentation des niveaux sériques de GLDH et d'ADN mitochondrial (Wong et al., 2000).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Dans une autre expérience, des taux de GLDH élevés ont été mesurés chez des patients traités par de l'héparine, molécule sans hépatotoxicité apparente (Harril et al., 2012 ; Singhal et al., 2014).

II.2.2. Kératine 18 (K18)

La K18 est une protéine du cytosquelette impliquée dans la structure et l'intégrité de la cellule. Elle est exprimée par toutes les cellules épithéliales y compris les hépatocytes (Thulin et al., 2014 ; Ku et al., 2016). Lors de l'apoptose, une caspase va cliver la kératine 18 en un fragment stable, la ccK18 (Koelink et al., 2009). Ainsi, les taux sériques de K18 et de ccK18 peuvent représenter les marqueurs de nécrose et d'apoptose (Galluzzi et al., 2012). Comme la GLDH, les taux de K18 et de ccK18 ne sont pas influencés par l'exercice physique (Thulin et al., 2014).

Cependant, de nombreuses maladies sont associées à des taux élevés de K18 et ccK18 comme le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer des voies biliaires, les infections à VHB et à VHC, et la stéatose hépatique non alcoolique (Kronenberger et al. 2005 ; Joka et al., 2012 ; Chu et al. 2017 ; Wei et al., 2017 ; Sugimoto et al., 2018).

Par conséquent, K18 et ccK18 ne sont pas très spécifiques d'une atteinte hépatique ; vu que la protéine est exprimée par toutes les cellules épithéliales simples. Néanmoins diverses maladies hépatiques entraînent des taux élevés de K18 et de ccK18 reflétant une inflammation hépatique.

II.2.3. Sorbitol déshydrogénase (SDH)

La SDH est une enzyme cytoplasmique localisée principalement dans le foie et les testicules. Elle a été proposée comme marqueur diagnostique des maladies hépatiques et testiculaires depuis de nombreuses années (Asada et Galambos ; 1963). C'est un indicateur sensible des dommages hépatocellulaires parce que ses augmentations sont plus importantes que celles des transaminases (Hogden et Sherins, 1973).

Il a été rapporté que certains médicaments inhibent l'expression de l'ALAT et peuvent masquer les lésions hépatiques qui pourraient être révélées par la SDH. De faibles doses de D-pénicillamine ont provoqué une légère augmentation des activités de SDH et de GLDH, alors qu'aucune augmentation de la concentration d'ALAT n'a été observée dans une hépatite granulomateuse induite par la D-pénicillamine chez la souris (Metushi et al., 2014).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II.2.4. Glutathion S-transférase (GST)

La GST est une enzyme cytosolique abondante dans le foie. Une atteinte hépatique entraîne sa libération dans le plasma à partir du cytosol hépatique (Yamamoto et Yamada, 2016 ; Zhang et al. 2017) et les taux de GST augmentent de façon plus importante que ceux des transaminases (Giffen et al., 2002).

D'autres travaux ont démontré que les taux plasmatiques de GST seraient liés aux dépôts de lipides dans le foie, suggérant la possibilité de diagnostiquer une NASH grâce à ce biomarqueur (Tsai 2017).

Il a également été montré que des polymorphismes génétiques de la GST étaient associés à diverses maladies du foie. Ainsi, chez les patients atteints d'insuffisance hépatique à hépatite B aiguë à chronique, les niveaux de méthylation du promoteur du gène GSTM3 seraient significativement plus ou moins élevés que ceux de sujets sains. Enfin, il a été proposé d'utiliser ce taux de méthylation pour évaluer le pronostic d'hépatite aiguë à chronique de l'hépatite B (Sun et al. 2017).

II.2.5. Acides biliaires

Les acides biliaires sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol et sont sécrétés dans les canalicules biliaires. Ce sont des biomarqueurs des atteintes hépatiques induites par les médicaments car ils ont des propriétés détergentes, amphiphiles et émulsifiantes qui endommagent l'intégrité de la membrane cellulaire et entraînent des effets cytotoxiques.

L'accumulation des acides biliaires dans les hépatocytes peut déclencher des mécanismes de régulation adaptatifs. Les effets toxiques des acides biliaires pourraient apparaître quand certains médicaments entraînent l'arrêt de la régulation des acides biliaires (Qiu et al, 2016).

Malheureusement, des niveaux élevés d'acides biliaires peuvent être détectés dans de multiples maladies hépatobiliaires, ce qui laisse présager une spécificité limitée dans les atteintes hépatiques induites par les médicaments.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II.2.6. Ostéopontine (OPN)

Les taux d'OPN seraient associés au degré de nécrose hépatique dans les lésions hépatiques aiguës. Plusieurs études suggèrent que l'OPN agisse comme une cytokine pro-inflammatoire dans les maladies inflammatoires du foie et attire les neutrophiles, les lymphocytes et les macrophages vers les sites de lésion hépatique (Arai et al., 2006, He et al. 2012). L'ostéopontine (OPN) est une protéine multifonctionnelle dont l'expression est régulée par l'interleukine-1b et d'autres médiateurs inflammatoires aigus (Serlin et al. 2006 ; Kahles et al., 2014). Elle est sécrétée par plusieurs tissus et cellules, notamment les macrophages, les cellules musculaires lisses et les cellules épithéliales et endothéliales.

II.2.7. « High mobility Group Box-1 » (HMGB1)

L'HMGB1 est une protéine nucléaire présente dans la plupart des tissus et qui est principalement impliquée dans la réplication, la recombinaison, la réparation et la régulation transcriptionnelle de l'ADN. Elle est libérée dans l'espace extracellulaire suite à des dommages cellulaires (Rovere-Querini et al., 2004 ; Gardella et al., 2002).

Dans les conditions normales, les formes non acétylées et les formes thiol de l'HMGB1 restent localisées dans le noyau, mais peuvent être libérées en cas de lyse. De plus, une forme acétylée de l'HMGB1 peut être sécrétée par les cellules immunitaires et être facilement oxydée dans l'espace extracellulaire (Venereau et al., 2016). Lorsqu'elle est libérée dans l'espace extracellulaire, l'HMGB1 peut se lier aux récepteurs des produits finaux de glycation ce qui induit un phénomène pro-inflammatoire avec recrutement cellulaire sur le site de l'atteinte (Fiuza et al. 2003 ; Palumbo et al., 2004).

Lors d'une hépatotoxicité aiguë, les taux sériques d'HMGB1 augmentent considérablement et plus rapidement que ceux de l'ALAT. Il a également été constaté qu'ils revenaient rapidement au niveau de base lors de la reprise de fonction hépatique (Antoine et al., 2009). De plus, les taux d'HMGB1 acétylée n'augmenteraient que chez les patients ayant un mauvais pronostic suite au développement de l'atteinte hépatique, suggérant que l'HMGB1 puisse être un biomarqueur pronostique (Antoine et al., 2012).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II.2.8. « Fatty Acid binding protein 1 » (FABP1)

La FABP1 est une protéine principalement exprimée dans le foie et les reins, mais faiblement exprimée dans le cœur et les muscles squelettiques (Mikus et al., 2017). Plus précisément, elle est abondamment exprimée dans le cytosol des cellules parenchymateuses hépatiques et elle est associée au métabolisme, au stockage, au transport et à l'utilisation des acides gras (Bass, 1988).

Comme la plupart des biomarqueurs présentés précédemment, il a été démontré que les taux de FABP1 augmentent plus rapidement et reviennent plus rapidement à la normale que ceux des ALAT lors d'atteintes hépatiques (Mikus et al., 2017). Des niveaux accrus de FABP1 ont également été observés dans les atteintes virales au virus de l'hépatite B et les atteintes hépatiques non alcooliques, alors qu'une expression réduite a servi à protéger efficacement contre la stéatose et les lésions hépatocytaires permettant peut-être une stratégie de traitement des atteintes hépatiques (Wu et al., 2016b ; Wu et al., 2017). La FABP1 est impliquée dans de nombreux processus de maladies métaboliques, y compris ceux de la maladie du foie, du cancer, du diabète, de l'obésité et de l'athérosclérose.

II.2.9. Micro-ARN 122 (miR-122)

Deux études menées chez le rat et la souris ont montré que les taux de miR-122 augmentaient très significativement en présence de substances hépatotoxiques (Starckx et al, 2012). Les micro-ARN (miARN) sont des petits ARN régulateurs non codants. Ils sont impliqués dans la régulation de l'expression de certains gènes. Plusieurs études de séquençage des micro-ARN ont identifié le miR-122 comme très spécifique du foie chez plusieurs espèces (rats, souris, humains, etc.). Le miR-122 représente jusqu'à 70% des miARN hépatiques. Ils présentent plusieurs fonctions comme la régulation de la différenciation des hépatocytes, la régulation du métabolisme du cholestérol ; et, contrairement à l'ALAT, il n'augmente pas lors d'une blessure musculaire.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II.3. LA MOLÉCULE D'ALBUMINE

II.3.1. Synthèse, structure & principaux rôles de l'albumine

II.3.1.1. Synthèse

L'albumine sérique humaine (HSA) est synthétisée dans le foie, principalement par des hépatocytes, sous la forme de pré-pro-albumine qui subit l'élimination du peptide N-terminal dans le réticulum endoplasmique et le clivage dans l'appareil de Golgi d'un oligopeptide 6-amino acide en position N-terminale afin d'obtenir la protéine plasmatique mature. L'HSA est sécrétée dans le système circulatoire à un taux de 10-15 g/jour (Quinlan et al., 2005). Chez les adultes en bonne santé, la demi-vie de l'HSA est relativement longue (environ 16-20 jours) (Roche et al., 2008). La dégradation de l'HSA se produit principalement dans les muscles, la peau, le foie et les reins (Arroyo et al., 2014).

II.3.1.2. Structure générale

La forme native de l'HSA est constituée d'une macromolécule non glycosylée multi-domaine composée de 585 résidus d'acides aminés et d'un poids moléculaire (PM) de 66438 Da (Fanali et al., 2012).

La séquence primaire protéique contient un résidu de tryptophane (Trp214) et plusieurs résidus d'acides aminés chargés (lysines, arginines, acides glutamiques et aspartiques), responsables de sa forte solubilité dans l'eau (Quinlan et al., 2005). En outre, l'HSA contient 35 résidus de cystéine, dont 34 sont impliqués dans la formation de 17 liaisons disulfure, qui contribuent à la stabilité et la flexibilité de la protéine.

En revanche, le résidu cystéine en position 34 (Cys34) reste libre et peut réagir avec d'autres molécules circulantes. Dans un faible pourcentage de l'HSA circulante, ce résidu est impliqué dans la formation de ponts disulfures intermoléculaires conduisant à la formation de dimères d'HSA (Castellanos et al., 2013). L'HSA est composée de trois domaines homologues : le domaine I (du résidu 1 au résidu 195), le domaine II (du résidu 196 au résidu 383) et le domaine III (du résidu 384 au résidu 585) ; chaque domaine contient 10 α-hélices et peut être divisé en deux sous-domaines (A et B) composés respectivement de 4 et 6 α -hélices (Dockal et al., 2000).

En solution, l'HSA adopte une conformation globulaire en forme de cœur, bien que des études physicochimiques aient révélé qu'il s'agisse d'une protéine très flexible qui change facilement de forme (Ferrer et al., 2001 ; Sugio & al., 1999 ; Dockal et al., 1999).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II.3.1.3. Rôles & fonctions

Les fonctions physiologiques de l'albumine peuvent être subdivisées en propriété oncotique et non oncotique ; cette dernière étant étroitement liée à la structure particulière de la protéine (Evans, 2002 ; Quinlan et al., 2005 ; Fanali et al., 2012). L'HSA est le principal modulateur de la distribution des liquides dans les différents compartiments du corps., Elle participe à hauteur d'environ 70 à 80% de la pression oncotique plasmatique (Fernandez et al., 2005).

Concernant les propriétés non oncotiques, l'HSA est capable de fixer de manière réversible des composés endogènes et exogènes structurellement divers, y compris des acides gras, des hormones, des ions, des médicaments et des métabolites de médicaments (Bertucci et al., 2002). Plusieurs sites de liaison ont été identifiés, parmi lesquels les sites I et II de Sudlow, situés respectivement dans les sous-domaines IIA et IIIA, sont les plus importants et les plus caractérisés.

La liaison à l'HSA augmente la solubilité du ligand dans le plasma, favorisant ainsi sa distribution au site d'action dans les tissus et les organes. Enfin, l'HSA est capable de lier la bilirubine et de favoriser sa clairance (Wu et al., 1991).

L'une des propriétés non oncotiques les plus importantes de l'HSA est son activité anti-oxydante qui dépend principalement de la présence d'acides aminés soufrés et de la capacité de liaison de la partie N-terminale. En effet, la Cys34 est le plus grand réservoir de thiols libres dans le plasma (80%) et le plus important capteur d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Carballal et al., 2003 ; Nagumo et al., 2014). L'activité anti-oxydante de l'HSA est renforcée par la présence de résidus de méthionine (Taverna et al., 2013 ; Levine et al., 1996) et par les propriétés de chélation des métaux du site N-terminal (Medina-Navarro et al., 2010). Le N-terminal est capable de chélater les ions de métaux de transition tels que le Cu (II) et le Fe (II), empêchant ainsi leur participation à la formation de radicaux libres (Lipinski et al., 2011).

L'HSA est également dotée de propriétés anti-inflammatoires. En effet, les preuves expérimentales indiquent que la capacité de l'HSA à lier certains composants de surface des bactéries Gram-positives et Gram-négatives, responsables de l'activation du système immunitaire par l'interaction avec le récepteur Toll-like 4 (TLR4), est un mécanisme important de l'activité anti-inflammatoire de l'HSA (Arroyo et al., 2014). Enfin, le résidu Cys34 de l'HSA est capable de lier le monoxyde d'azote (NO) avec la formation de S-nitroso-albumine. Cette liaison prolonge l'activité biologique du NO et, du fait du rôle régulateur du NO vis-à-vis de la thrombose, exerce un effet anti-thrombotique (Spinella et al., 2016).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II.3.2. Modifications post-traductionnelles de l'albumine

Les propriétés non oncotiques de l'HSA sont strictement liées à sa structure dynamique. Des changements structurels minimes peuvent affecter de manière significative l'activité de l'HSA.

En effet, les altérations structurelles et conformationnelles de l'HSA résultent de modifications post-traductionnelles (PTM). Les PTM les plus fréquents de l'HSA sont présentés ci-dessous (**figure 5**).

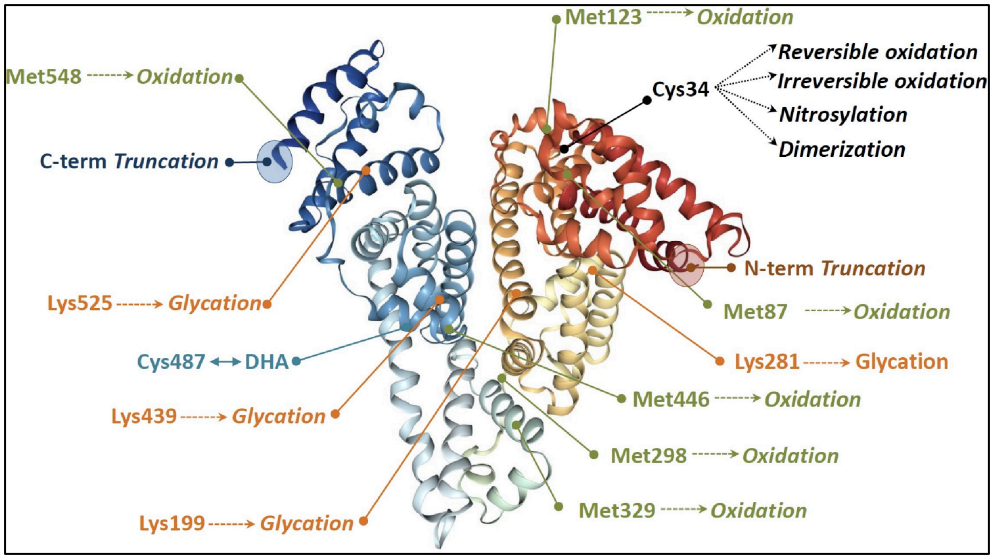

Figure 5 : Les PTM les plus abondantes affectant la structure HSA (d'après Naldi et al., 2017).

II.3.2.1. Oxydation

Le stress oxydatif peut endommager gravement les protéines, les lipides et l'ADN. L'oxydation des protéines peut être provoquée par des espèces réactives de l'oxygène (ERO), des produits de peroxydation lipidique, des molécules spécifiques redox-actives (acide ascorbique) ou des ions divalents, tels que le fer ou le cuivre, qui augmentent la production de radicaux libres hydroxyles (Monacelli et al., 2013). L'oxydation de la Cys34 sensible à l'oxydo-réduction est la PTM la plus fréquente affectant l'HSA.

Dans des conditions physiologiques, la forme native de l'HSA prédomine (70-80%). Cette forme est habituellement identifiée comme mercaptoalbumine (HMA). Elle est présente sous forme réduite avec un groupe thiol libre au niveau du résidu Cys34 (**figure 6**). Évidemment, ces changements altèrent l'état redox et, par conséquent, la capacité anti-oxydante de l'HSA (Oettl et al., 2010 ; Turell et al., 2014). Les PTM oxydatifs peuvent également impliquer d'autres résidus d'acides aminés, tels que la méthionine, la lysine, l'arginine et la proline (Naldi et al., 2016 ; Temple et al., 2006).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

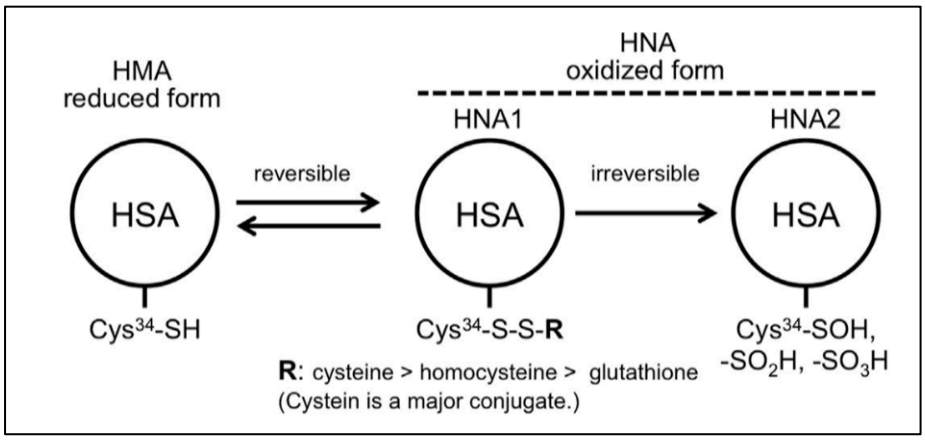

Figure 6 : Les différents états redox de l'HSA (d'après Watanabe et al., 2017).

Le résidu Cys34 est oxydé de manière réversible et se lie à de petites molécules de thiols telles que la cystéine, l'homocystéine ou le glutathion (forme non oxydée de la mercaptoalbumine 1 [HNA1]). HNA1 est en outre oxydée en non mercaptoalbumine 2 (HNA2 : forme oxydée), avec le résidu Cys-34 oxydé de manière irréversible en acides sulfiniques ou sulfoniques, conduisant ainsi à la perte permanente de sa fonction anti-oxydante.

II.3.2.2. Dimérisation

L'HSA peut subir une dimérisation par la formation d'une liaison disulfure intermoléculaire à la Cys34 en raison d'une augmentation du stress oxydatif (Naldi et al., 2015 ; Baldassarre et al., 2016).

D'une part, la dimérisation réduit la quantité de résidu Cys34 libre et affecte négativement les capacités anti-oxydantes et les capacités de liaison de l'HSA. D'autre part, la dimérisation peut améliorer la capacité d'expansion du plasma et le transport du médicament en raison de la masse moléculaire doublée et de la demi-vie plasmatique plus longue (Taguchi et al., 2012 ; Matsushita et al., 2006).

II.3.2.3. S-nitrosylation

La Cys34 peut réagir avec le NO endogène et exogène de manière prédominante lorsque l'HSA est exposée à la S-nitrosoglutathione. La S-nitrosylation de la Cys34 diminue de manière allostérique l'affinité des ions Cu (II) pour l'HSA (Kashiba-Iwatsuki et *al.*, 1997).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II.3.2.4. Glycation

La glycation, également appelée glycosylation non enzymatique, est une modification non enzymatique et covalente de la protéine. L'HSA native peut subir une glycation non spécifique en réagissant avec des sucres réducteurs et/ou avec leurs produits de dégradation réactifs. Les premières étapes du processus de glycation peuvent impliquer le site N-terminal et plusieurs résidus de lysine (Naldi et al., 2017) **(figure 5)**. L'albumine glyquée chez les patients atteints de diabète sucré altère ses capacités de liaison ainsi que ces propriétés anti-oxydantes. Par exemple, la capacité de fixation du Cu (II) sur l'albumine glyquée est inférieure à celle de l'albumine saine (Bourdon et al., 1999 ; Sakata et al., 2002). Enfin, la capacité de liaison et les propriétés anti-oxydantes du Fe (III) sont considérablement réduites chez les patients atteints de diabète sucré (Van Campenhout et al., 2006).

II.3.2.5. Troncature

Un petit pourcentage de l'HSA circulante peut être tronqué à la fois sur les sites N- et C-terminaux **(figure 5)**. La forme tronquée N-terminal la plus abondante est celle qui manque des résidus Asp-Ala (Bar-Or et al., 2005 ; Naldi et al., 2013). Puisque ces résidus d'acides aminés sont impliqués dans la chélation des ions métalliques libres, cette troncature affecte la capacité anti-oxydante de l'HSA (Taverna et al., 2013). La forme tronquée au niveau C-terminal la plus abondante est dépourvue de résidu leucine et présente une demi-vie réduite (Bar-Or et al., 2006).

II.3.2.6. Déhydroalanine conversion

La conversion d'une cystéine en déhydroalanine (DHA) est une PTM commune qui peut résulter de l'exposition à des conditions alcalines et/ou à la chaleur.

La présence de résidus d'acides aminés basiques à proximité d'un pont disulfure pourrait conduire à la formation de DHA par un processus d'élimination. Ce dernier mécanisme a été mis en évidence au niveau de la Cys487 et prédispose à la formation d'une liaison disulfure avec la Cys486 **(figure 5)**. Cette PTM modifie certaines fonctions physiologiques, telles que les propriétés de liaison et anti-oxydantes (Bar-Or et al., 2008). De plus, la conversion d'une cystéine en DHA pourrait modifier le taux de dégradation de l'HSA (Bar-or et al., 2008).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II.3.2.7. Acétylation

En raison de l'absence de chaîne hydrocarbonée au niveau de l'HSA, cela rend ses résidus aminés plus accessible à l'acétylation. La réaction entre l'aspirine (acide acétylsalicylique) et l'HSA résulte une acétylation via une liaison covalente du groupe acétyle de l'aspirine aux groupements N-amino des résidus lysines de l'HSA. Cette acétylation réduirait l'affinité des prostaglandines, servant de mécanisme supplémentaire de l'action anti-inflammatoire de l'aspirine (Liyasova et al., 2010). Les propriétés de liaison du ligand à l'HSA pourraient être modulées par acétylation. En effet, l'affinité de l'HSA pour la phénylbutazone est augmentée pour l'HSA acétylée alors que celle pour la bilirubine est inhibée (Liyasova et al., 2010).

II.3.3. Propriétés de fixation de l'albumine

II.3.3.1. Sites de liaison des métaux à l'albumine

L'HSA présente une grande variété de sites de liaison pour plusieurs ions métalliques, y compris Mg (II), Al (III), Ca (II), Mn (II), Co (II / III), Ni (II), Cu (I / II), Zn (II), Cd (II), Pt (II), Au (I / II), Hg (II) et Tb (III) (Fanali et *al.*, 2011). Jusqu'à présent, trois principaux sites de liaison correspondant aux différentes géométries métalliques ont été observés (**figure 7**).

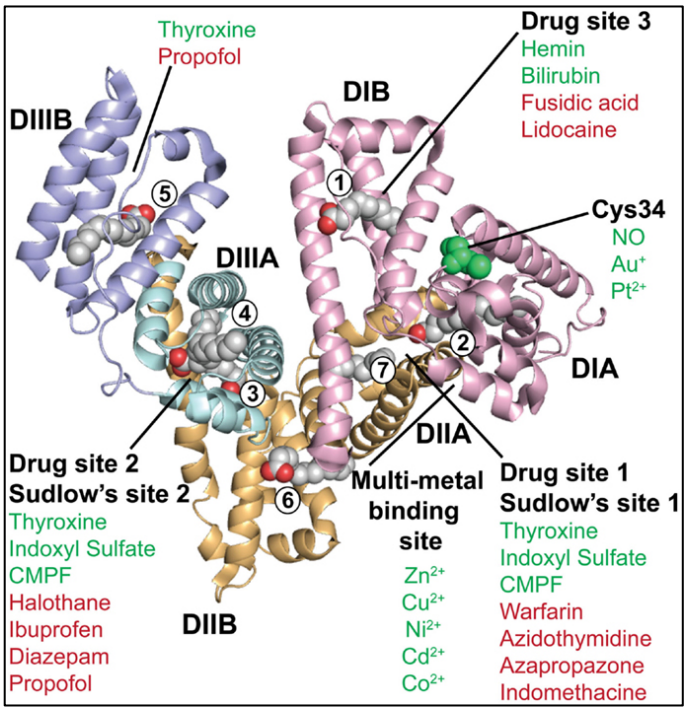

Figure 7 : Structure tertiaire de l'HSA avec ses sites de fixation (d'après Sand et al., 2015).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Le premier site, habituellement étiqueté comme **site de liaison N-terminal (NTS)**, est situé à l'extrémité N-terminale, où se lient les ions Cu (II), Co (II) et Ni (II) (Sadler & al., 2005). Le second site est représenté par **le thiol Cys34 libre** qui lie les ions Au (I), Hg (II) et Pt (II) (Shaw, 1989, Peters, 1996). Le troisième site de liaison métallique est le **site de liaison multi-métallique dit primaire ou site de cadmium A (MBS-A)**. En effet, il a été suggéré que le MBS-A serait le site primaire de Zn (II) et de Cd (II) et le site secondaire du Cu (II) et du Ni (II) (Blindauer et al., 2009).

Malgré l'absence de preuves expérimentales, l'existence d'un site secondaire de liaison au Cd (II), appelé site de liaison multi-métallique secondaire ou site de cadmium B (MBS-B), a été suggérée (Mothes & Faller, 2007). Enfin, d'autres ions métalliques se lient de façon non spécifique ou à des régions indéfinies (Peters, 1996).

II.3.3.2. Sites de fixation de la thyroxine à l'albumine

La thyroxine ou LT4 se lie à l'HSA via quatre sites, marqués Tr-1 à Tr-4 ; Tr-1 est situé dans le sous-domaine IIA, Tr-2 dans le sous-domaine IIIA, et Tr-3 et Tr-4 dans le sous-domaine IIIB **(figure 8)** (Petitpas et al., 2003).

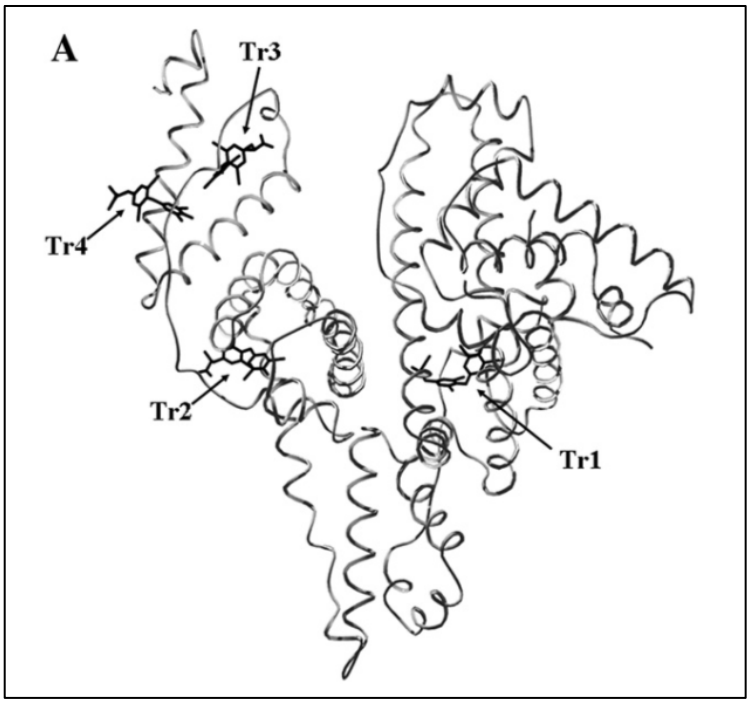

Figure 8 : Sites de fixation de la L-thyroxine sur l'HSA (d'après Fanali et al., 2012).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II.3.3.3. Interactions de différents métaux aux divers sites de liaison

II.3.3.3.1. Cuivre

Les tous premiers travaux datant de près de 50 ans suggèrent que l'HSA puisse lier jusqu'à 4 équivalents de Cu (II) (Appleton et al., 1971). Des études plus récentes ont étudié la liaison de Cu (II) au site N-terminal, pour lequel il a été montré à l'aide de titrages compétitifs avec l'acide nitrilotriacétique (NTA) qu'il aurait une constante de dissociation de 1,0 pM (Rozga et al., 2007).

Il existe également un deuxième site de liaison spécifique de Cu (II) à l'HSA (Zgirski et al., 1990). En utilisant des titrages compétitifs de Cu (II) contre d'autres ions métalliques, il a été démontré qu'il s'agit du site A, également appelé site de liaison multi-métal (MBS-A). Ce site peut fixer d'autres cations métalliques divalents avec des affinités similaires (Bal et al., 1998). Toutefois, la différence d'un facteur 10 000 des affinités de Cu (II) entre NTS et MBS-A signifie que seul le NTS est peuplé par Cu (II) dans des conditions physiologiques, la constante de dissociation étant de 10 nM (Sokolowska et al., 2010).

II.3.3.3.2. Cadmium

La liaison du Cd (II) à l'HSA et à la BSA est analogue à celle de Zn (II) ; et jusqu'à deux ions Cd (II) peuvent être liés au titrage direct au MBS-A et au MBS-B. Les noms de ces sites ont été suggérés pour décrire les résultats RMN 111 / 113Cd (II). L'addition d'un équivalent de 111 / 113Cd (II) à l'albumine présentait deux pics de RMN 111 / 113Cd (II), l'un d'environ 130 ppm (site A) et l'autre d'environ 20 ppm (site B) (Martins et *al.*, 1982). Des expériences de compétition du Cu (II) ont indiqué que la liaison du Cd (II) au MBS-A de l'HSA et de la BSA est trois fois et neuf fois plus faible de la liaison Zn (II), respectivement (Bal et *al.*, 1998). La constante de dissociation est estimée à 3 µM pour les sites de liaison Cd (II).

II.3.3.3.3. Or

Les études de la liaison d'Au (I) à l'albumine sont essentiellement des études d'échange de ligands dans des complexes ternaires, en raison de l'hydrolyse immédiate de l'Au (II) et de l'Au (III). En raison de l'intérêt pour les médicaments à base d'or, de tels complexes ont été étudiés principalement. Cys34 s'est avéré être le seul site de liaison pour Au (I) dans l'albumine (Dhubhghaill et al., 1992 ; Christodoulou et al., 1994).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

En effet, l'étude de Et3PAuCl avait montré que ce complexe phosphine analogue aux médicaments à base d'or n'avait aucune affinité avec le NTS ou le MBS-A (Bal et *al.*, 1998). Les constantes de stabilité n'ont pas été déterminées à ce jour, mais on peut estimer qu'elles sont très élevées, de sorte que la liaison d'Au (I) à l'HSA était pratiquement irréversible dans des conditions expérimentales imitant le sérum sanguin (Christodoulou et al., 1994). Les complexes d'Au (III) subissent une réduction rapide en présence d'albumine, ce qui entraîne la liaison d'Au (I) à l'HSA (Messori et *al.*, 2011).

II.4. ALTÉRATIONS DE L'ALBUMINE DANS LA CIRRHOSE

Des études récentes ont montré que l'albumine présente différentes modifications post-traductionnelles en cas de cirrhose, qui peuvent être mises en avant par plusieurs techniques :

II.4.1. Isoforme tronquée N-terminale & cystéinylée de HSA dans la cirrhose

Domenicali et al. (2014) ont tenté d'identifier les altérations structurelles de l'HSA chez 168 patients cirrhotiques dont l'état avait été stabilisé ou avec des complications cliniques aiguës et ont déterminé leur relation avec des complications cliniques spécifiques et la survie du patient. En utilisant HPLC / ESI-TOF-MS, ils ont identifié 7 isoformes de l'HSA. Chez les patients atteints de cirrhose, les taux de la forme native de HSA ont été significativement réduits au profit de certaines isoformes (isoformes cystéinylées, cystéinylées tronquées, glycosylées). Parmi ces isoformes, les résultats ont indiqué que la forme inchangée de l'HSA et l'isoforme HSA cystéinylée étaient des bons prédicteurs de la survie à 1 an, avec une plus grande capacité pronostique que la concentration totale de l'HSA.

II.4.2. Albumine modifiée par l'ischémie dans la cirrhose

La méthode de détection de l'albumine modifiée par ischémie (IMA) a été développée et homologuée pour des applications cliniques de routine en tant que biomarqueur cardiaque dans l'Union Européenne et aux États-Unis. Le test IMA mesure la capacité de liaison au cobalt de l'HSA. Jalan et al. (2009) ont démontré que la capacité fonctionnelle de l'HSA est altérée chez les patients atteints de cirrhose. Ils ont montré que le rapport IMA / Albumine (IMAR) était significativement plus élevé dans l'insuffisance hépatique chronique aiguë que chez les patients sains ou cirrhotiques, et une analyse de Kaplan-Meier a confirmé une mortalité accrue dans le groupe avec un IMAR > 0,02. Ainsi, IMAR est corrélé avec la gravité de la maladie et peut avoir un usage pronostique dans l'insuffisance hépatique chronique aiguë.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II.4.3. Formes dimériques de HSA dans la cirrhose

Il a été rapporté que le rapport dimère / monomère de l'HSA était également augmenté dans le plasma obtenu chez les patients cirrhotiques comparé à celui des sujets sains, suggérant que le rapport dimère / monomère pourrait être utile comme biomarqueur de la maladie hépatique (Naldi et *al.*, 2015). La forme dimère de l'HSA a été caractérisée par la technique ESI-TOF et MALDI-TOF-MS. Le site de dimérisation s'est révélé être au niveau de la Cys-34 et comprend un pont disulfure entre deux molécules HSA.

II.4.4. État redox de la Cys-34 dans la cirrhose

Il a été montré qu'une augmentation de la sévérité de la maladie (augmentation du score Child-Pugh) était associée à une augmentation de la fraction Cys-Cys34-HSA, suggérant l'existence d'une association entre la progression de la maladie hépatique chronique et le stress oxydatif (Nagumo et *al.*, 2014). La fraction Cys-Cys34-HSA a été caractérisée par la technique ESI-TOF-MS chez 139 patients atteints d'une maladie hépatique chronique (cirrhose).

II.4.5. Capacité de liaison des ligands et capacités anti-oxydantes de HSA dans la cirrhose

Il a été signalé des altérations marquées de l'état redox de l'HSA et une altération significative de la capacité de liaison à l'HSA chez les patients atteints de cirrhose décompensée (Oettl et *al.*, 2013). Une augmentation de HNA1 ou de HNA2 accompagnée d'une diminution de HMA et une altération de la liaison de la dansylsarcosine ont été observées chez ces patients. Les patients atteints de cirrhose présentent une tendance et une sensibilité accrues aux infections en développement en raison de leur système immunitaire inné altéré. O'Brien et *al.* (2014) ont rapporté des preuves montrant que la prostaglandine E2 entraîne une immunosuppression associée à la cirrhose. Fait important, ils ont démontré que les taux réduits de l'HSA dans la cirrhose contribuaient à l'immunosuppression et augmentaient le risque d'infection en augmentant la fraction non liée de la prostaglandine E2.

Il est donc clair que l'HSA de façon plus générale apparaît comme un outil essentiel dans la recherche de biomarqueurs de pathologie hépatique. En effet, il a pu être démontré par les études citées ci-dessus qu'il existe un parallèle entre les modifications post-traductionnelles de l'albumine et la cirrhose et qu'elles pourraient être des potentiels biomarqueurs. Les techniques précédemment utilisées sont cependant très lourdes à mettre en œuvre et difficilement utilisable en routine.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

III. OBJECTIFS & STRATÉGIE

Comme explicité plus haut dans ce manuscrit, les travaux menés jusqu'ici par l'équipe de recherche avaient montré que : (i) la capacité de fixation du cuivre, de l'or et de la L-thyroxine sur l'HSA est significativement inférieure chez les patients cirrhotiques ; (ii) certaines modifications post-traductionnelles de l'albumine sont significativement plus importantes chez les patients cirrhotiques.

Au cours de mes travaux, afin d'étudier plus en profondeur les observations décrites précédemment chez l'homme, des modèles expérimentaux animaux ont été développés, en utilisant de l'éthanol (EtOH) et du tétrachlorure de carbone (CCl_4) capables de provoquer une toxicité hépatique.

Les objectifs principaux de notre étude étaient de suivre l'évolution des modifications post-traductionnelles de l'albumine dès l'induction d'une atteinte hépatique toxique, mais également de valider les performances du SEB Test (Serum Enhanced Binding Test) dans une cohorte de patients hospitalisés.

Mes travaux personnels peuvent être séparés en trois études :

1. **Le développement de modèles expérimentaux de toxicité induite par l'EtOH et le CCl_4 :** Des travaux ont été menés chez des rats Wistar mâles albinos avec un schéma expérimental pour lequel l'hépatotoxicité a été confirmée par des examens biochimiques. Afin de suivre l'évolution de l'atteinte hépatique, une étude des isoformes de l'albumine sérique des rats par spectrométrie de masse à temps de vol (LC-QTOF) a été réalisée, en parallèle d'une exploration de la fixation de certains ligands (cuivre, cadmium, or, L-thyroxine) par ICP-MS.

2. **L'étude exploratoire complémentaire sur la capacité de fixation de ligands à l'albumine (SEB Test) :** Pour ces travaux, une exploration complémentaire de la fixation du cadmium et de la dansylsarcosine à l'albumine sérique humaine chez le sujet sain et le sujet cirrhotique ont été menés. Ceci nous a permis de compléter la liste des sites de fixation de l'albumine explorés par notre approche. Nous avons également réévalué les ratios « ligand/albumine » pouvant servir de valeurs seuils discriminant un sujet sain d'un sujet cirrhotique. Ces analyses se sont appuyées sur des méthodes de dosage par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS).

3. **La validation des performances diagnostiques du SEB-Test et des modifications de l'HSA pour la cirrhose hépatique dans un cohorte de patients hospitalisés (étude ALCIR)**

Ces travaux ont été possibles grâce à des collaborations avec le service de Biochimie et Génétique moléculaire et avec le service d'Hépatologie et de Gastro-Entérologie (HGE) du CHU de Limoges.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

IV. MATÉRIELS & MÉTHODES

IV.1. DÉVELOPPEMENT DU MODÈLE ANIMAL D'INSUFFISANCE HÉPATOCELLULAIRE

IV.1.1. Animaux

L'ensemble des procédures expérimentales a été réalisé chez des rats mâles albinos de souche Wistar (Janvier Labs, France) adultes (de 6 semaines) pesant en moyenne 250 grammes, et maintenus dans des conditions normales de température (21°C) et d'humidité et un cycle de lumière-obscurité de 12 heures avec un accès illimité à la nourriture et à l'eau. Dans le cas spécifique de ce protocole, les rats ont été acclimatés aux conditions de notre animalerie pendant 1 semaine avant le début des investigations. Tous les protocoles concernant cette étude ont été approuvés par le comité d'éthique institutionnelle local et menés conformément à la ligne directrice éthique pour l'utilisation des animaux dans les expériences de laboratoire.

IV.1.2. Procédure expérimentale

La complexité des mécanismes impliqués dans l'induction des atteintes hépatiques pouvant aboutir à une cirrhose nous a amenés à tester notre hypothèse avec différents modèles décrits dans la littérature (Nipanikar et al, 2017).

Modèle par administration d'éthanol (EtOH) : une hépatotoxicité a été induite par administration par voie orale (gavage) de 2 mL d'une solution d'EtOH à 50% préparée dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%) à chaque prise afin d'évaluer la cinétique de survenue d'atteintes hépatiques sur une période de 14 jours **(figure 9)**.

Modèle par administration du tétrachlorure de carbone (CCl_4) : une hépatotoxicité a été induite par administration par voie orale (gavage) de 1 mL/kg de poids corporel d'une solution de CCl_4 à 30% diluée dans de l'huile d'olive à chaque prise afin d'évaluer la cinétique de survenue d'atteintes hépatiques sur une période de 10 jours **(figure 9)**.

Un groupe contrôle a été mis en place. Les rats du groupe contrôle ont été suivis pendant toute la durée du protocole, soit 14 jours, et ont reçu par gavage uniquement du sérum physiologique (NaCl 0,9%).

Schéma expérimental : les protocoles d'expérience ont été définis pour mimer les modalités de survenue de l'insuffisance hépatocellulaire dans un contexte de maladie hépatique chez l'homme.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Six groupes de rats ont été suivis pour chaque toxique utilisé. L'effectif pour chaque groupe a été estimé entre 6 à 9 rats afin d'avoir une puissance statistique suffisante lors de l'analyse des résultats. Les rats, répartis en différents groupes expérimentaux pour chaque modèle, devaient recevoir, pendant un maximum de 14 jours, une dose quotidienne d'EtOH ou de CCl_4. Nous avons suivi la cinétique d'apparition des atteintes jusqu'au 14ème jour d'administration pour le modèle EtOH (1, 3, 7, 10, 14 jours) et jusqu'au 10ème jour pour le modèle CCl_4. Les animaux ont été sacrifiés à chaque fois, 24 heures après la dernière prise (**figure 9**).

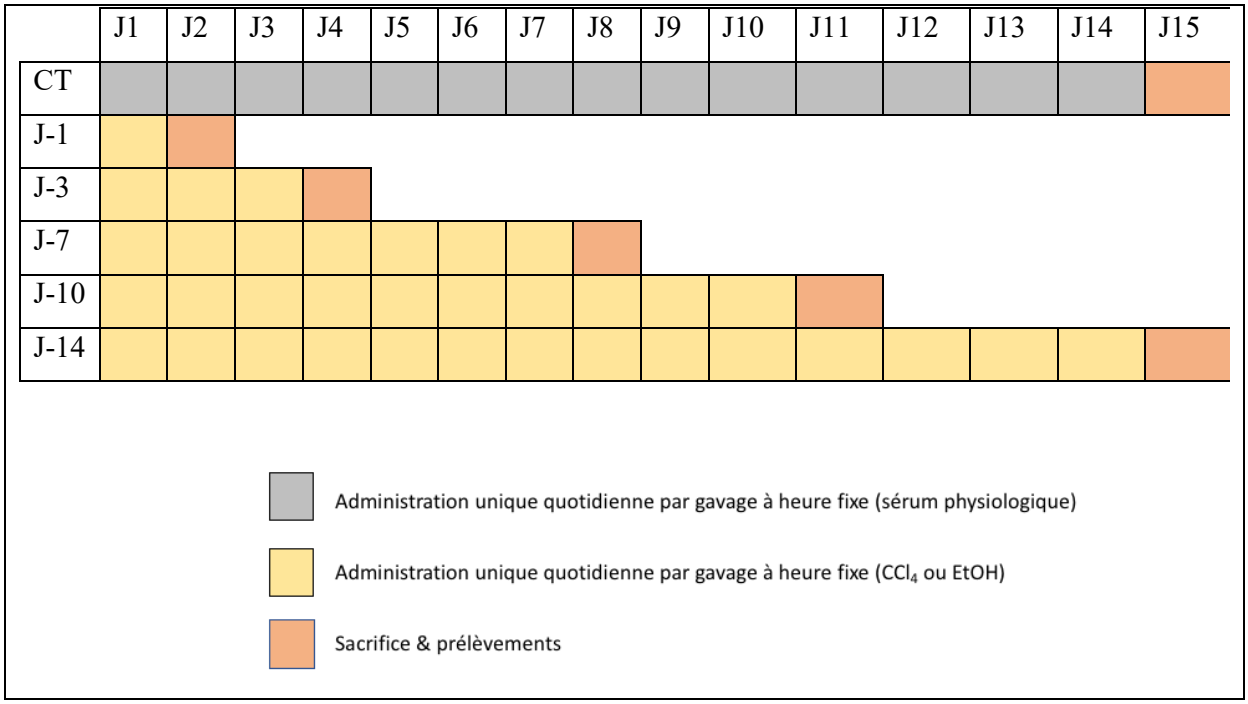

Figure 9 : Schéma expérimental.
(J = jour) ; CT : groupe contrôle/témoin ; J-1 : administration unique du toxique ; J-3 : administration pendant 3 jours ; J-7 : administration pendant 7 jours ; J-10 : administration pendant 10 jours ; J-14 : administration pendant 14 jours.

Tous les rats ont été pesés avant et après le traitement hépatotoxique. À la fin du traitement, les animaux ont été sacrifiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital (150 mg/kg).

Les échantillons sanguins ont été prélevés sur un tube héparinate de lithium pour éléments traces de type « Vacutainer® » (Beckton Dickinson, France) puis centrifugés à 3000 tpm pendant 10 minutes. Les prélèvements ont ensuite été conservés au congélateur à -80°C jusqu'à l'analyse. Le foie a été rapidement prélevé et pesé. Un petit morceau de foie a été fixé dans du formol pour des études histo-pathologiques.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

IV.1.3. Analyses biochimiques du plasma

À partir du plasma recueilli, des mesures de divers paramètres biochimiques tels que l'albumine (ALB), la bilirubine totale (BILIT) et conjuguée (BILID), les aspartate aminotransférases (ASAT), les alanine aminotransférases (ALAT) et les phosphatases alcalines (PAL) ont été évaluées au laboratoire de Biochimie et de Génétique moléculaire du CHU de Limoges en utilisant un automate COBAS® 6000 (Roche, Allemagne).

IV.1.4. Analyse anatomo-pathologique du foie

À la fin de chaque sacrifice, les foies ont été coupés en tronçons de 1 à 1,5 cm perpendiculairement au grand axe de manière à permettre une fixation homogène dans une solution de formol à 4 % pendant 7 jours maximum. Les échantillons ont été colorés pour la microscopie optique avec une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine et une coloration au trichrome de Masson. L'anatomo-pathologiste réalisera l'analyse histologique en aveugle, sans avoir connaissance des différents groupes expérimentaux.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

IV.2. RECRUTEMENT DE PATIENTS

IV.2.1. Patients

La sélection des patients « témoins » s'est basée sur la présence d'un bilan hépatique normal (validé par un biologiste) avec une protéine C réactive (CRP) normale et n'avaient jamais étaient admis dans le service de maladies infectieuses et d'hépato-gastro-entérologie du CHU de Limoges. Le bilan hépatique comprenait un dosage des transaminases (ASAT, ALAT), des phosphatases alcalines (ALP), des *gamma*-glutamyl-transférases (GGT), des bilirubines totales et conjuguées (BILIT, BILID) et de lactate déshydrogénase (LDH).

La sélection des patients « cirrhotiques » s'est faite grâce à la coopération des médecins et internes du service d'hépato-gastro-entérologie du CHU de Limoges, qui devaient avoir posé un diagnostic de cirrhose. Le logiciel CROSSWAY® (Cegedim, France), logiciel de prescription et de suivi des dossiers médicaux du CHU de Limoges, a été utilisé pour collecter rétrospectivement l'étiologie de la cirrhose, le Child Pugh Score et le MELD Score pour chaque patient.

Dans le respect de la réglementation (Code de la Santé Publique, Art. L1211-2), les échantillons de plasma des patients ne s'opposant pas à l'utilisation de leurs matériels biologiques ont été obtenus à partir de reliquats de tube prélevés pour les soins courants. Les tubes collectés étaient des tubes héparinate de lithium de type « Vacutainer® » (Beckton Dickinson, France) centrifugés (à 3000 tpm, pendant 10 minutes) de la routine hospitalière du laboratoire de Biochimie et Génétique moléculaire du CHU de Limoges

IV.2.2. Étude ALCIR

Il s'agit d'une étude observationnelle mono-centrique sur collection biologique constituées de reliquats de prélèvements réalisée au CHU de Limoges réalisée entre Janvier 2019 et Octobre 2019. Deux cohortes ont été mises en place : une cohorte de développement et une cohorte de validation.

La cohorte de développement est composée de 45 patients « témoins » et de 45 patients « cirrhotiques » tous stades confondus. La cohorte de validation est composée de 35 patients du service d'hépato-gastro-entérologie recrutés en simple aveugle.

Les patients à exclure étaient des patients souffrant de diabète (de type 1 ou 2), des patients dialysés ou des patients ayant reçu un produit de contraste, un chélateur ou une transfusion d'albumine dans le mois précédant le prélèvement.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

IV.3. ÉTUDE DE LA CAPACITÉ DE FIXATION DE LIGANDS A L'ALBUMINE : DOSAGE DES LIGANDS NON FIXÉS PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE A PLASMA A COUPLAGE INDUCTIF (ICP-MS)

IV.3.1. Plan d'expérience

Le dosage de la L-thyroxine se fait par dosage de l'iode par ICP-MS. L'ensemble des métaux (cuivre, cadmium, or) sont directement dosés par ICP-MS. La concentration en métal libre a été mesurée dans chacune de ces conditions par ICP-MS (6 plasmas différents par « rapport » et 5 mesures par plasma). Pour l'analyse de chaque ligand, un pool de patients « témoins » différent a été étudié.

Dans un premier temps, afin d'explorer la fixation du cadmium à l'albumine, des concentrations croissantes en cadmium ont été ajoutés aux plasmas des patients sains, puis des patients cirrhotiques, pour obtenir des rapports « albumine / métal » de 1 molécule d'albumine pour n atomes de métal (1/1, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/150).

Dans un second temps, afin de déterminer le seuil discriminant un sujet sain d'un sujet cirrhotique, des concentrations décroissantes en ligands ont été ajoutées aux plasmas des patients sains, puis des patients cirrhotiques, pour obtenir des rapports « albumine / métal » de 1 molécule d'albumine pour n atomes de métal (1/50, 1/40, 1/30, 1/20, 1/15, 1/10, 1/5, 1/1).

Finalement, les seuils discriminants qui ont été déterminés chez l'homme ont été utilisés pour explorer la fixation des ligands à l'albumine chez l'animal.

IV.3.2. Appareillage

L'analyse est réalisée sur un spectromètre de masse avec source d'ionisation par plasma induit haute fréquence (ICP-MS Nexion® 350D, Perkin Elmer, France). L'ICP-MS est pilotée par un logiciel informatique Syngistix for ICP (Perkin Elmer, France). L'élimination des interférences dues aux ions poly-atomiques est réalisée par le biais d'une chambre de réaction dynamique ou DRC (Dynamic Reaction Cell). Les échantillons prépares sont placés sur un passeur d'échantillon de type ESI SC4 DX piloté par le logiciel ESI SC/FAST et introduits directement dans le plasma par un nébuliseur. En fonction du métal à doser, les tubulures du système sont rincées avec de l'acide nitrique ou avec l'ammoniaque avant et après chaque injection.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

IV.3.3. Ultrafiltration du plasma

Pour le dosage des métaux (cuivre, cadmium, or), 200 µL de plasma sont ajoutés à 500 µL d'une solution de concentration définie en métal à tester. Pour le dosage de la L-thyroxine, 50 µL de plasma sont ajoutés à 2 000 µL d'une solution de concentration définie en L-thyroxine.

Les volumes ont été définis afin de garder les mêmes ordres de grandeur qu'avec les métaux tout en prenant en compte la faible solubilité du produit dans l'eau. Les solutions mères des différents composés sont préparées à partir de la poudre de substance pure diluée dans de l'eau purifiée de façon à obtenir un pH neutre pour ne pas altérer la structure de l'albumine. Le mélange subit une incubation à 4°C, pendant 30 minutes, suivi d'un transfert dans un filtre Amicon 30 kDa (afin de retenir sur le filtre le couple albumine-ligand). Après une centrifugation à 4000 tpm, à 4°C, pendant 40 minutes, l'ultrafiltrat est récupéré pour le dosage.

IV.3.4. Solvants et autres réactifs

La source de plasma utilisée est de l'argon ultrapur présentant un haut degré de pureté, supérieur à 99,999 % (Air Liquide Santé, France). La DRC est alimentée par de l'ammoniac anhydre (99,995 %) (Air Liquide Santé, France). Tous les réactifs requis sont de qualité pour analyse. L'eau utilisée est purifiée extemporanément sur Milli-QPLUS 185 (Millipore, France). L'acide nitrique à 65 % de qualité suprapur, le 1-butanol, le triton X-100 et l'éthylène diamine tétracétate de sodium dihydraté (EDTA, 2 H2O) proviennent de chez Merck (Allemagne).

Des solutions étalons individuels de 1 000 mg/L de L-cystéine, d'or, de cuivre, de cadmium, d'iode sont utilisées pour réaliser la gamme d'étalonnage (Merck, Allemagne).

L'étalonnage interne de l'appareil est réalisé avec des solutions préparées extemporanément contenant du Tellure (Te 130) pour le dosage de l'Iode, de l'Yttrium (Y 89) pour le dosage du cuivre, du Rhénium (Re 187) pour le dosage de l'Or et de l'Indium (In 115) pour le dosage du Cadmium. Des substances pures, provenant de chez Sigma-Aldrich (États-Unis), sont utilisées pour réaliser les solutions de métal indispensable durant la phase d'ultrafiltration : Gold(III) chloride trihydrate (CAS : 16961-25-4), Copper(II) chloride (CAS : 7447-39-4), Cadmium(II) chloride (CAS : 10108-64-2), L-thyroxine sodium salt pentahydrate (CAS : 6106-07-6), Dansylsarcosine piperidinium salt (CAS : 72517-44-3).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

IV.3.5. Solutions standards de travail

Pour le dosage du cadmium, du cuivre, de l'or et de la dansylsarcosine, des solutions de travail ont été préparées (concentrations de 100 et 1000 µg/L) après une dilution dans de l'eau purifiée.

Pour le dosage de l'iode, des solutions de travail ont été préparées (concentrations de 10 et 100 µg/L) après dilution dans de l'eau purifiée. Chacune de ces solutions de travail est utilisée pour réaliser l'étalonnage. Les solutions d'étalon interne sont toutes titrées à 150 µg/L après dilution dans de l'eau purifiée. Ces solutions sont utilisées pour tous les échantillons (calibration, contrôles et patients).

IV.3.6. Préparation de la gamme d'étalonnage

Les gammes d'étalonnage permettant le dosage des éléments dans le plasma sont réalisées en solution aqueuse, directement dans la solution diluante. La quantification des ligands dans le plasma est effectuée par la méthode des ajouts dosés. L'étalonnage se fait par l'intermédiaire d'une gamme de concentrations en 7 points, préparée avec une solution d'étalon interne dans une solution aqueuse acide (Eau/HNO_3/EDTA ; v/v/v) ou une solution aqueuse basique (Eau/NH_4OH/1-butanol/Triton/EDTA ; v/v/v), s'échelonnant de x à x+100 µg/L (0-5-10-20-50-100) ou de x à x+20 µg/L (0-0,5-1-5-10-20) selon l'élément à doser. Plusieurs blancs sont préparés de façon à vérifier si une contamination éventuelle s'est produite durant les manipulations de nos échantillons et déceler toute pollution accidentelle liée aux acides utilisés.

IV.3.7. Contrôles de qualité

La validité des dosages est vérifiée pour le plasma par des contrôles de qualité titrés par ICP-MS Clinchek niveau 1 & niveau 2 (Trace elements level 1 ; Trace elements level 2 ; RECIPE, France).

IV.3.8. Préparation des échantillons (contrôles et patients/animaux)

Pour le dosage de l'or, du cadmium, du cuivre et de la dansylsarcosine, les ultrafiltrats sont préalablement dilués cent fois dans une solution aqueuse acide (HNO_3/EDTA/Eau ; 85/10/5 ; v/v/v). Après dilution, ces échantillons sont complétés par 500 µL d'une solution d'étalon interne titrée à 150 µg/L. Le volume d'ultrafiltrat nécessaire est de 50 µL.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Pour le dosage de l'iode, les ultrafiltrats sont préalablement dilués vingt fois dans une solution aqueuse basique (Eau/EDTA/1-Butanol/Triton/NH_4OH ; 60/15/10/10/5 ; v/v/v/v/v). Après dilution, ces échantillons sont complétés par 500 µL d'une solution d'étalon interne titrée à 150 µg/L. Le volume d'ultrafiltrat nécessaire est de 200 µL.

IV.4. ÉTUDE DES DIFFÉRENTES ISOFORMES DE L'ALBUMINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À UN SPECTROMÈTRE DE MASSE HYBRIDE TANDEM/ANALYSEUR À TEMPS DE VOL (micro-LC-QTOF)

IV.4.1. Préparation des échantillons

La procédure analytique prévoit que les échantillons de plasma soient dilués au 1 : 2000 avec l'eau ultrapure et filtrés avec un filtre de 0,22 µm à base d'acétate de cellulose (Agilent, États-Unis). Le mélange obtenu est vortexé, pendant 10 secondes, puis centrifugé à 15 000 tpm, à 10°C, pendant 5 minutes. 150 µL de surnageant sont transférés dans un vial pour analyse. Le volume d'injection est de 5 µL.

IV.4.2. Conditions analytiques

Les analyses en MicroLC ont été réalisées en utilisant un chromatographe en phase liquide Sciex Eksigent micro-débit nano LC 425 (Sciex, États-Unis) couplé à un spectromètre de masse Triple-TOF 5600 Plus (Sciex, États-Unis).

La séparation chromatographique de l'albumine a été effectuée sur une colonne C4 Chrom XP (100 mm x 0,3 mm ; 3 µm) (Sciex, Canada). La phase mobile consistait en 0,1% d'acide formique: eau (phase aqueuse, A) et d'acétonitrile: eau (phase organique, B) avec un débit de 5 µL / min. Le gradient d'élution a été fixé comme suit : A/B (%) 80/20, à 1 minutes, A/B (%) 50/50, à 5 minutes ; A/B (%) 5/95, à 8 minutes ; A/B (%) 80/20, à 12 minutes. La durée de l'élution est de 13 minutes.

La colonne a été équilibrée avec la composition de phase mobile des conditions de départ pendant 3 minutes avant l'injection suivante. Des analyses de blanc ont été effectuées entre les différents échantillons pour éliminer tout effet mémoire. Le système était équipé d'un auto-échantillonneur et le volume d'injection d'échantillon était de 5 µL.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Pour la détection, le spectromètre de masse fonctionnait en mode électronébulisation à ions positifs. Les chromatogrammes de masse ont été enregistrés en courant d'ionisation total (TIC, total ion current) avec une gamme de masse, exprimée en masse/charge (m / z), entre 900 et 2200 uma avec un temps de balayage fixé à 2,0 s. Les conditions pour le détecteur Triple-TOF étaient les suivantes : tension de pulvérisation d'ions, 5500 V ; température de pulvérisation turbo, 200 °C ; potentiel de désamorçage (DP), 200 V ; énergie de collision (CE), 5 eV.

L'azote a été utilisé comme nébuliseur et gaz auxiliaire, et le gaz du nébuliseur (gaz 1), le gaz de chauffage (gaz 2) et le gaz du rideau ont été réglés respectivement à 70, 10 et 40 unités arbitraires.

Afin d'identifier et de caractériser les différents isoformes de HSA selon leur poids moléculaire, l'acquisition du spectre de masse a été réalisée sur le sommet du pic identifié. Les spectres de HSA ont été déconvolués grâce au logiciel PeakView 2.1 (Sciex, États-Unis). Ceci permettait, via un procédé mathématique, d'obtenir des spectres de masse épurés à partir d'un signal d'une matrice complexe.

IV.4.3. Estimation de l'abondance relative des isoformes

En analysant les masses comprises entre 60 000 et 70 000 Da, il est possible d'identifier, en plus de l'isoforme native, toutes les potentielles modifications post-traductionnelles. L'abondance relative (AR) a été calculée par la formule suivante : AR (%) = (AUC isoforme/AUC albumine non modifiée ou native) x 100 ; AUC = aire sous la courbe du signal analytique correspondant à chaque protéine détectée. Afin de minimiser les variabilités d'ionisation entre les isoformes, 10 états de charge différents entre 1100 et 1300 uma ont été considérés pour la quantification des abondances relatives des différentes isoformes.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

IV.5. ANALYSES STATISTIQUES

IV.5.1. Étude des modifications chimiques et structurelles de l'albumine

Des tests U non paramétriques de Mann-Whitney ont été utilisés pour la comparaison de groupes. Les valeurs entre les groupes ont été présentées sous forme de médiane [min-max]. Des courbes ROC ont été construites afin de rechercher le seuil optimal du rapport ligand libre/albumine pour discriminer les patients. L'index de Youden a été utilisé pour le choix du meilleur seuil (sensibilité + spécificité -1). Une analyse multivariée par analyse en composantes principales (ACP) a été utilisée pour étudier la combinaison de tous les ligands entre eux (R package).

Les probabilités statistiques de $p < 0,01$(*) et $p < 0,05$(**) ont été considérées comme significatives. Toutes les analyses et figures ont été réalisées à l'aide de logiciel GraphPad Prism 7.0a (GraphPad Software, San Diego, États-Unis).

IV.5.2. Modèle expérimental

Les résultats sont présentés sous la forme de médiane [min-max]. Les différences entre les groupes ont été évaluées par un test non paramétrique de Kruskall-Wallis avec des post-tests comparant chaque groupe par rapport au groupe contrôle et une correction statistique FDR (False Discovery Rate).

Les probabilités statistiques de $p < 0,01$(*) et $p < 0,05$(**) ont été considérées comme significatives. Toutes les analyses et figures ont été réalisées à l'aide de logiciel GraphPad Prism 7.0a (GraphPad Software, San Diego, États-Unis).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V. RÉSULTATS DES TRAVAUX

V.1. EXPLORATION DE LA FIXATION DU CADMIUM SUR LE MULTIMETAL BINDING SITE (MBS) CHEZ L'HOMME

Après l'ajout de concentrations croissantes de cadmium sur des plasmas de sujets témoins, on remarque une décroissance sous forme sigmoïdale du pourcentage de cadmium retenu par l'HSA en fonction du rapport « atomes de cadmium ajoutés sur le nombre de molécule d'HSA mesurée ». La **figure 10-A**, représente la fixation du cadmium à l'HSA, Les albuminémies mesurées chez les 50 patients témoins variaient de 37,6 à 45,7 g/L.

La **figure 10-B**, représente la distribution du rapport « cadmium fixé à l'HSA sur la valeur d'HSA mesurée » pour des pourcentages de rétention supérieurs à 95% et inférieurs à 85%. Nous pouvons remarquer qu'un ratio Cd/HSA inférieur à 60 permet d'obtenir un taux de rétention supérieur à 95% (valeur médiane du ratio = 8,05 [0,9-59,9] ; n = 28). Cependant, au-delà de ce ratio, le taux de rétention chute très rapidement jusqu'à un taux de rétention inférieur à 85% (valeur médiane du ratio = 149,4 [87,3-231,9] ; n = 22).

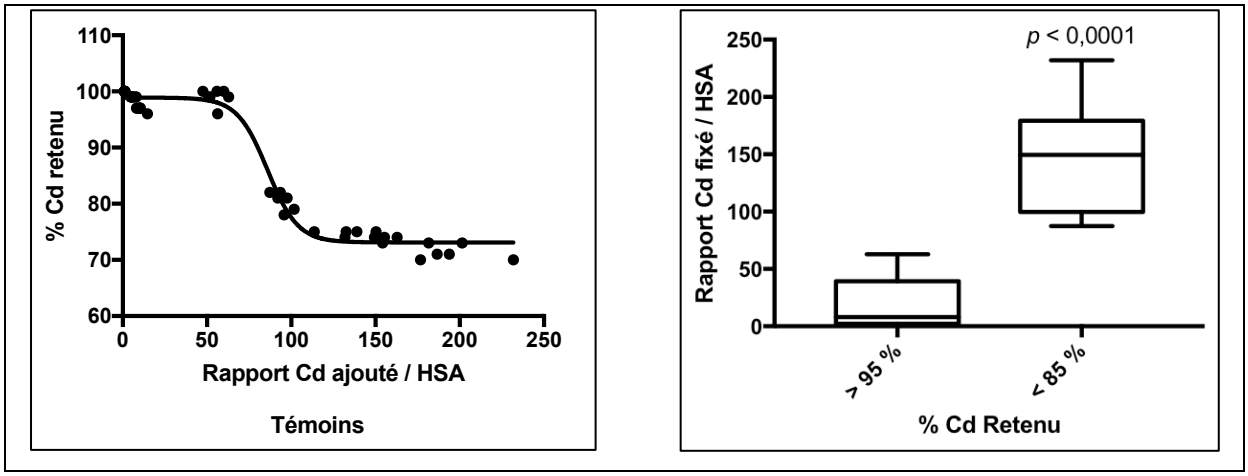

Figure 10 : Fixation du cadmium à l'albumine sérique humaine (HSA) chez les sujets témoins (10-A : à gauche ; 10-B : à droite).

Dans nos conditions et à la suite des résultats obtenus, un ratio Cd/HSA de 50 a été retenu comme seuil exprimant la capacité maximale de fixation de Cd par une molécule d'HSA. De plus, ce dernier permet d'éviter un phénomène de précipitation qui apparaît lorsque la quantité de métal devient trop importante. Des sujets témoins ont été comparés avec des sujets cirrhotiques, en incluant 16 patients cirrhotiques. Les étiologies de cirrhose étaient les suivantes : alcoolique (n = 5), métabolique (n = 5), virale (n = 2), mixte (alcoolique et métabolique ou virale) (n = 4). Les albuminémies mesurées chez ces patients cirrhotiques variaient de 23,8 à 31,8 g/L.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

La **figure 11** nous montre un rapport cadmium libre/HSA significativement plus élevé chez les patients cirrhotiques que chez les patients témoins (médiane = 0,003 [0,0013-0,0042] versus médiane = 0,0151 [0,007-0,0267]).

La différence significative observée a été vérifiée pour des rapports « cadmium ajouté sur la valeur d'HSA mesurée » allant jusqu'à 70. La **figure 12**, représentant une courbe ROC (Receiver Operating Characteristic), nous montre qu'une excellente sensibilité et spécificité de 100% pour un seuil de cadmium libre/HSA supérieur à 0,0056.

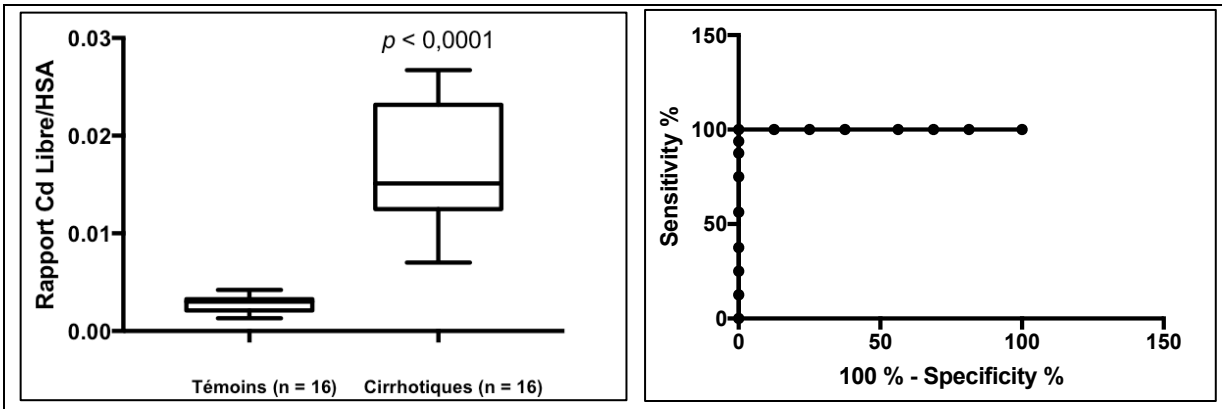

Figure 11 (à gauche) : Fixation du cadmium à l'HSA chez les témoins et les cirrhotiques, pour un rapport « cadmium ajouté sur la valeur d'HSA mesurée » de 50.
Figure 12 (à droite) : Courbe ROC représentant sensibilité en fonction de 1-spécificité pour la cirrhose en fonction du seuil de cadmium libre.

V.2. EXPLORATION DE LA FIXATION DE LA DANSYLSARCOSINE SUR LE DRUG BINDING SITE 2 (DBS-2) CHEZ L'HOMME

L'ajout de concentrations croissantes de dansylsarcosine sur des plasmas issus de sujets témoins, montre une décroissance sous forme exponentielle du pourcentage de dansylsarcosine retenue par l'HSA en fonction du rapport « atomes de dansylsarcosine ajoutés sur le nombre de molécule d'HSA mesurée » chez des sujets témoins (**figure 13-A)**. Les albuminémies mesurées chez les 90 patients témoins variaient de 36,4 à 47,8 g/L.

Sur la **figure 13-B**, représentant la distribution du rapport « dansylsarcosine fixé à l'HSA sur la valeur d'HSA mesurée » pour des pourcentages de rétention supérieurs à 75% et inférieurs à 70%, on remarque qu'un ratio Ds/HSA inférieur à 25 permet d'obtenir un taux de rétention supérieur à 75% (valeur médiane du ratio = 9,0 [4,1-21,6] ; n = 30). Cependant, au-delà de ce ratio, le taux de rétention chute très rapidement jusqu'à un taux de rétention inférieur à 70% (valeur médiane du ratio = 125,0 [42,3-304,2] ; n = 60).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

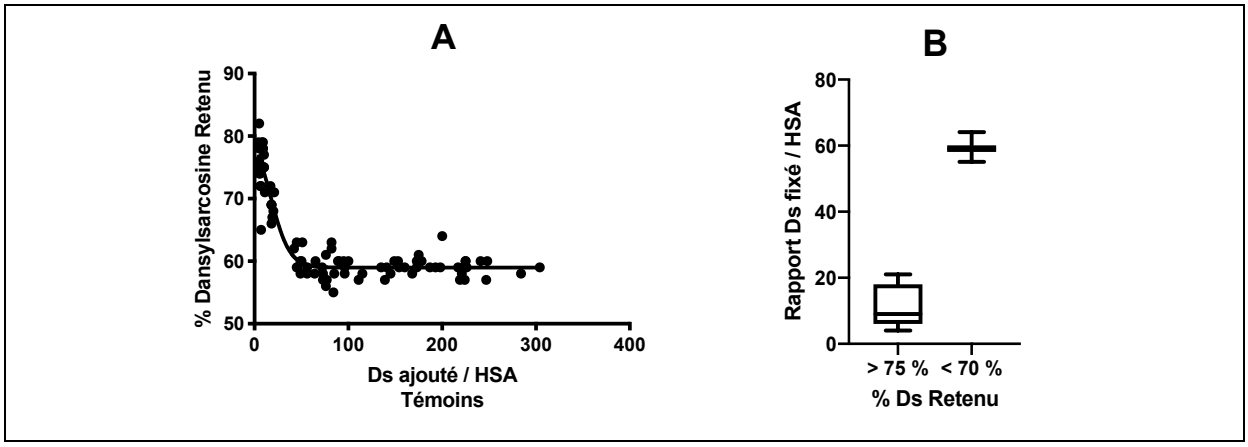

Figure 13 : Fixation de la dansylsarcosine à l'albumine sérique humaine (HSA) chez les sujets témoins.

À la suite des résultats obtenus, un ratio Ds/HSA de 20 a été retenu. Des sujets témoins ont été comparés avec des sujets cirrhotiques, en incluant 15 patients cirrhotiques. Les étiologies de cirrhose étaient les suivantes : alcoolique (n = 7), métabolique (n = 2), virale (n = 2), mixte (alcoolique et métabolique ou virale) (n = 4). Les albuminémies mesurées chez ces patients cirrhotiques variaient de 21,9 à 29,8 g/L.

La **figure 14** nous montre un rapport dansylsarcosine libre/HSA significativement plus élevé chez les patients cirrhotiques que chez les patients témoins (médiane = 0,124 [0,076-0,143] versus médiane = 0,0184 [0,162-0,210]).

La différence significative observée a été vérifiée pour des rapports « dansylsarcosine ajouté sur la valeur d'HSA mesurée » allant jusqu'à 20. La **figure 15**, représentant une courbe ROC (Receiver Operating Characteristic), nous montre qu'une excellente sensibilité et spécificité de 100% pour un seuil de dansylsarcosine libre/HSA supérieur à 0,153.

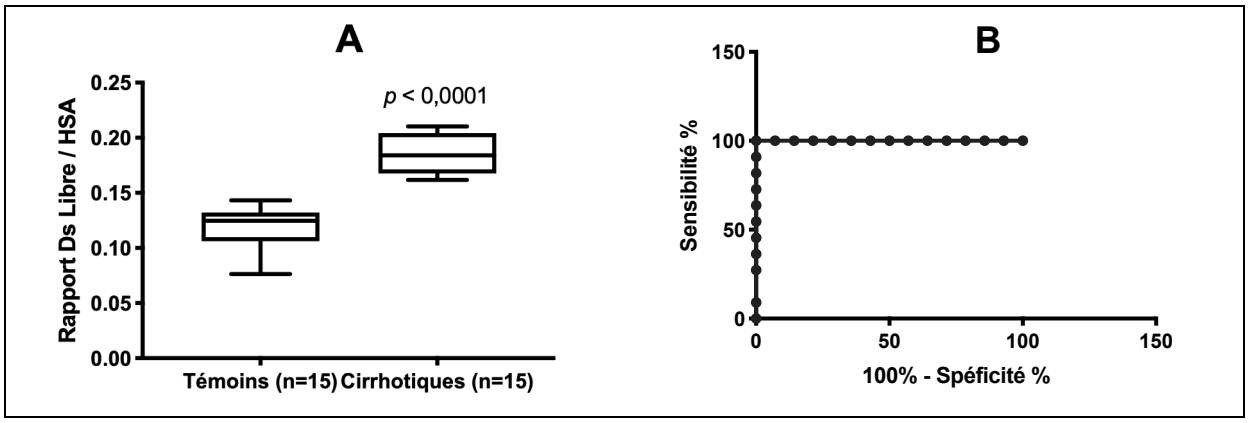

Figure 14 (à gauche) : Fixation de la dansylsarcosine à l'HSA chez les témoins et les cirrhotiques, pour un rapport « dansylsarcosine ajoutée sur la valeur d'HSA mesurée » de 20. Figure 15 (à droite) : Courbe ROC représentant sensibilité en fonction de 1-spécificité pour la cirrhose en fonction du seuil de la dansylsarcosine.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V.3. EXPLORATION DE LA FIXATION DES DIFFÉRENTS LIGANDS À L'HSA CHEZ L'HOMME

Des valeurs seuils (rapport « atomes de ligand ajoutés sur la valeur d'HSA mesurée ») ont été déterminées à la suite des résultats obtenus dans notre étude et dans une étude précédente : 12 pour le cuivre, 70 pour cadmium, 150 pour l'or, 10 pour la thyroxine et 20 pour la dansylsarcosine.

Des sujets témoins ont été comparés avec des sujets cirrhotiques, en incluant 12 patients cirrhotiques. Les étiologies de cirrhose étaient les suivantes : alcoolique (n=4), métabolique (n=4), virale (n=2), mixte (alcoolique et métabolique ou virale) (n=2). Les albuminémies mesurées des patients cirrhotiques variaient de 17,1 à 39,8 g/L. Pour chaque ligand, le même pool de patients a été utilisé.

Les valeurs seuils discriminant un patient sain d'un patient cirrhotique ont été fixées pour chaque ligand (cuivre, cadmium, or, thyroxine) à : 5 pour le cuivre, le cadmium et la thyroxine, et 50 pour l'or (**figure 16**).

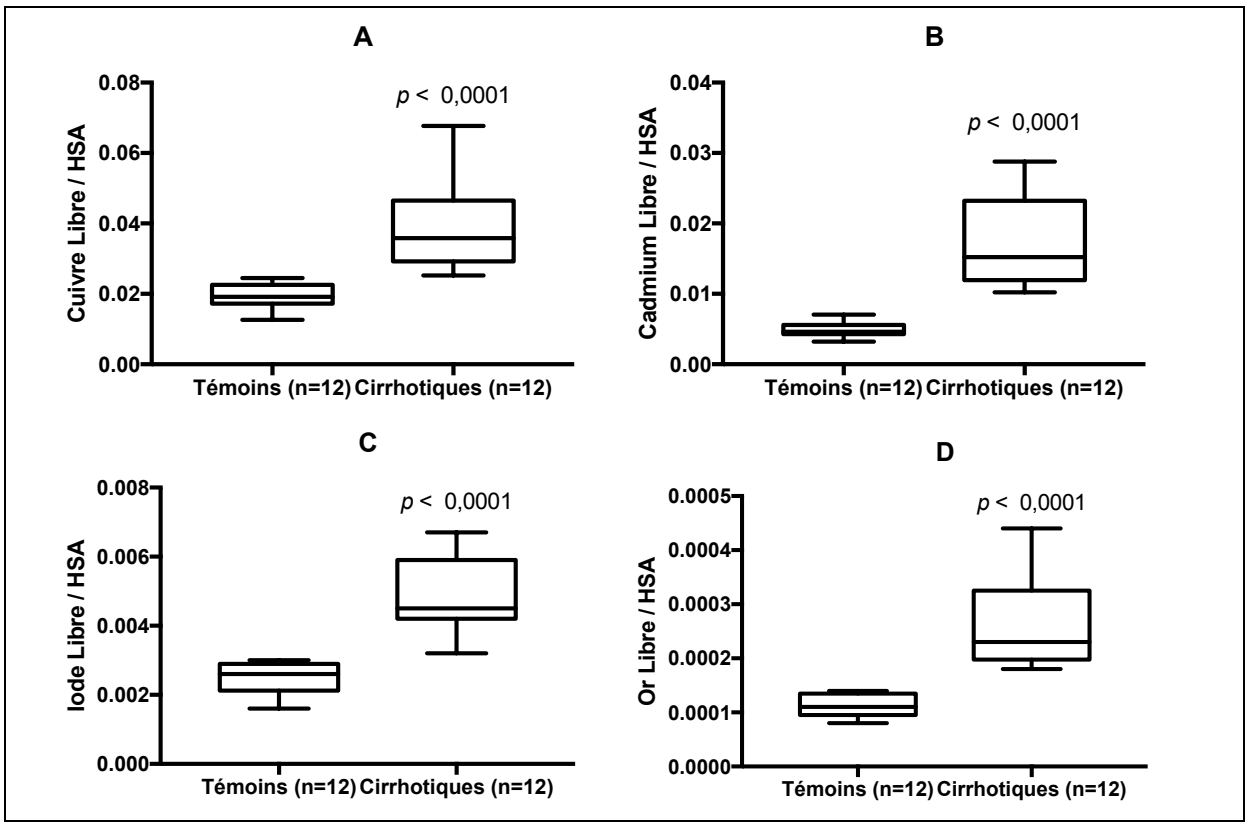

Figure 16 : Fixation de différents ligands à l'HSA chez des sujets sains (n = 12) et des sujets cirrhotiques (n = 12), un rapport « ligands ajouté sur la valeur d'HSA mesurée » de 5 pour le cuivre (A), cadmium (B) et thyroxine (C) et de 50 pour l'or (D).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V.4. MODÈLE EXPÉRIMENTAL ANIMAL

V.4.1. Effets de la toxicité induite par EtOH sur les paramètres biochimiques

À la suite d'une administration de 0,4 g d'EtOH aux groupes J-1, J-3, J-7, J-10 et J-14 pendant 1, 3, 7, 10 et 14 jours respectivement, nous avons obtenu les résultats ci-dessous (**tableau 1**) montrant une augmentation significative ($p < 0,05$) des ALAT dans les groupes J-10 et J-14 et une augmentation significative ($p < 0,05$) des ASAT dans les groupes J-7, J-10 et J-14.

Tableau 1 : Effet de la toxicité de l'EtOH sur divers paramètres biochimiques exprimés sous la forme de médiane [min-max] (* p < 0,05).

Paramètres	Contrôle	J-1	J-3	J-7	J-10	J-14
ALB (g/L)	14,4 [12,7-17,6]	13,8 [13,2-14,1]	**12,4* [11,8-14,2]**	**12,2* [11,0-13,8]**	16,35 [12,4-17,7]	**12,9* [10,2-13,5]**
ASAT (UI/L)	70,8 [61-75]	78 [70-85]	80 [52-144]	**96* [75-157]**	**92* [81-157]**	**90* [85-294]**
ALAT (UI/L)	57 [46-61]	63 [52-71]	62 [46-123]	69 [52-97]	**78* [68-98]**	**82* [65-104]**
PAL (UI/L)	196 [101-325]	232 [153-304]	180 [121-329]	159 [84-263]	172 [100-222]	230 [110-327]
BILID (µM)	0,75 [0,6-1]	0,7 [0,3-1]	0,7 [0,5-1,3]	0,7 [0,4-4,4]	0,8 [0,5-1,1]	0,6 [0,4-0,7]
BILIT (µM)	0,75 [0,4-1,3]	0,8 [0,4-1,6]	0,8 [0,2-1,7]	1,0 [0,2-1,9]	1,0 [0,8-1,6]	0,9 [0,5-1,8]

À la suite d'une administration de 1 mg/kg de poids corporel de CCl_4 aux groupes J-1, J-3 et J-10 pendant 1, 3, 7 et 10 jours respectivement, nous avons obtenu les résultats ci-dessous (**tableau 2**) montrant une augmentation significative des transaminases (ASAT & ALAT) dans tous les groupes et une augmentation significative des bilirubines (BILIT & BILID) dans les groupes J-7 et J-10.

Tableau 2 : Effet de la toxicité du CCl_4 sur divers paramètres biochimiques exprimés sous la forme de médiane [min-max] (* p < 0,05 ; ** p < 0,01).

Paramètres	Contrôle	J-1	J-3	J-7	J-10
ALB (g/L)	14,4 [12,7-17,6]	14,2 [12,9-14,5]	**13,0* [11,8-14,2]**	**12,9* [10,4-14,5]**	16,0 [15,9-16,7]
ASAT (UI/L)	70,8 [61-75]	**123* [90-251]**	**151* [82-214]**	**232** [168-305]**	**337** [192-473]**
ALAT (UI/L)	57 [46-61]	**77* [67-181]**	**90* [78-208]**	**200** [107-638]**	**355** [166-538]**
PAL (UI/L)	196 [101-325]	232 [192-270]	237 [174-329]	248 [117-341]	205 [149-250]
BILID (µM)	0,75 [0,6-1,0]	1,1 [0,7-1,5]	1,2 [0,3-1,3]	**1,6** [1,2-2,0]**	**2,5** [1,8-2,9]**
BILIT (µM)	0,75 [0,4-1,3]	1,4 [0,4-2,0]	1,3 [0,6-3,5]	**2,3** [1,8-4,5]**	**3,5** [2,4-5,3]**

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V.4.2. Étude des différentes isoformes de l'albumine

V.4.2.1. Identification des isoformes

Quel que soit le modèle expérimental (EtOH ou CCl_4), un seul pic chromatographique a été obtenu pour l'albumine dans les sérums des rats avec un temps de rétention de l'ordre de 6,4 minutes (figure 17). Le courant d'ionisation total est montré dans la **figure 17.**

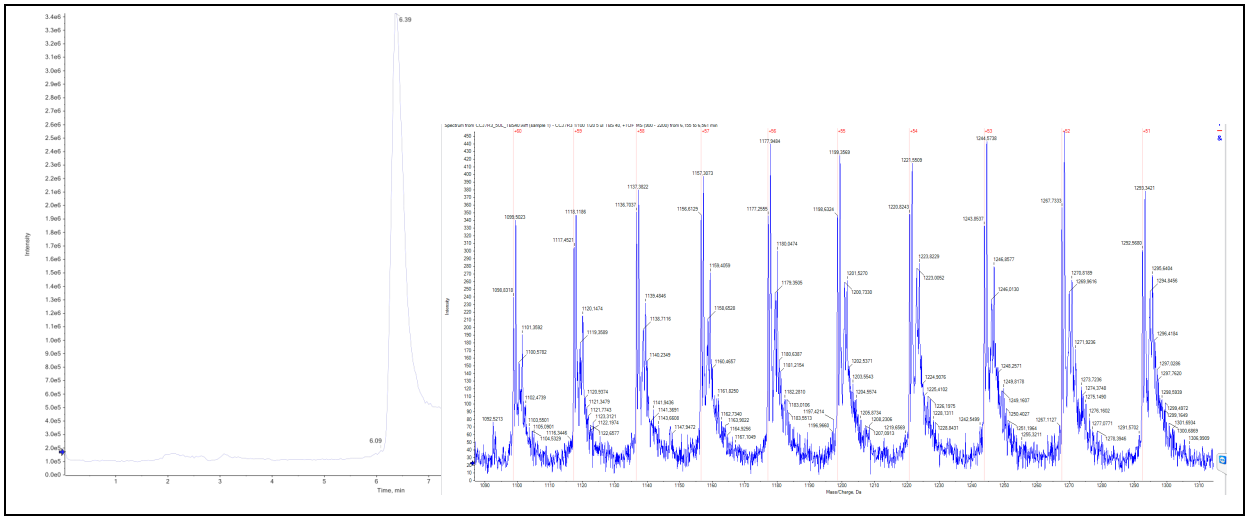

Figure 17 : Pic chromatographique de l'albumine sérique du rat (à gauche) et son courant total ionique (TIC) (à droite).

Après déconvolution du spectre de l'albumine du rat, nous avons pu identifier cinq isoformes dans les différents groupes de chaque modèle expérimental (EtOH & CCl_4) correspondant aux modifications post-traductionnelles de l'albumine **(figures 18 et 19)**. La tableau 3 illustre les masses correspondant à chaque isoforme.

Tableau 3 : Masse correspondant à chaque isoforme identifiée.

Isoformes		Masse moléculaire	Gain de masse expérimental	Gain de masse théorique
Native	HSA-Native	65869	0	0
Acétylée	HSA-Acet	65910	41	41
Cystéinylée	HSA-Cys	65988	119	120
Glycosylée	HSA-Gly	66027	158	160
Glutathion	HSA-Glut	66176	307	305

.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

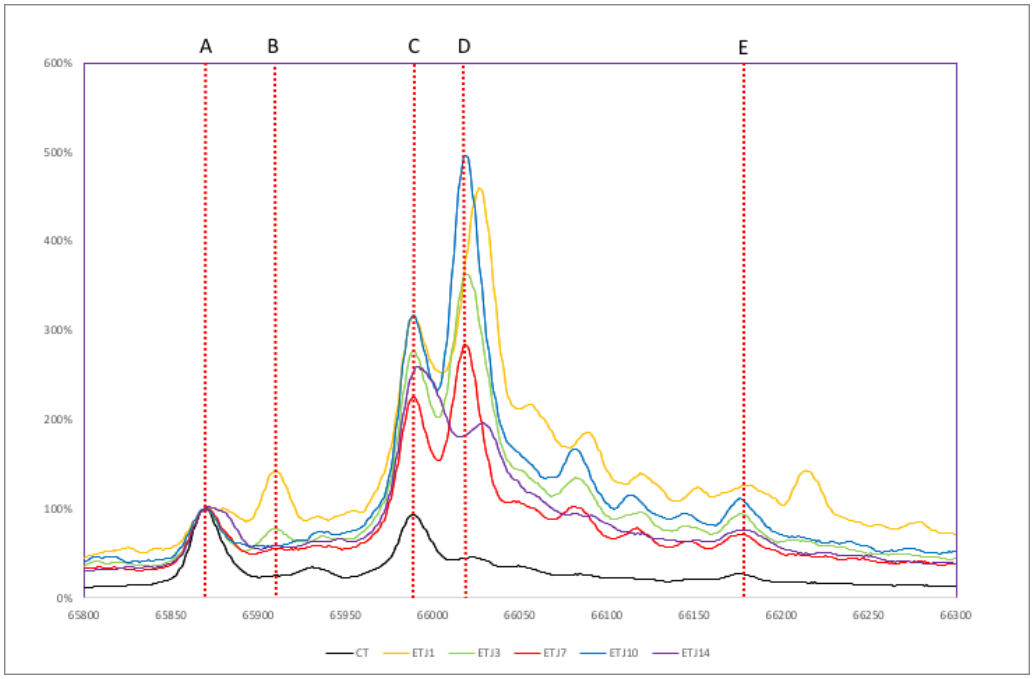

Figure 18 : Spectre de déconvolution de l'albumine du rat dans le modèle d'hépatotoxicité induite par EtOH.

(HSA-native (A), HSA-Acet (B), HSA-Cys (C), HSA-Gly (D), HSA-Glut (E) ; CT = groupe contrôle (noir), ETJ1 = groupe J-1 (jaune), ETJ3 = groupe J-3 (vert), ETJ7 = groupe J-7 (rouge), ETJ10 = groupe J-10 (bleu), ETJ14 = groupe J-14 (violet))

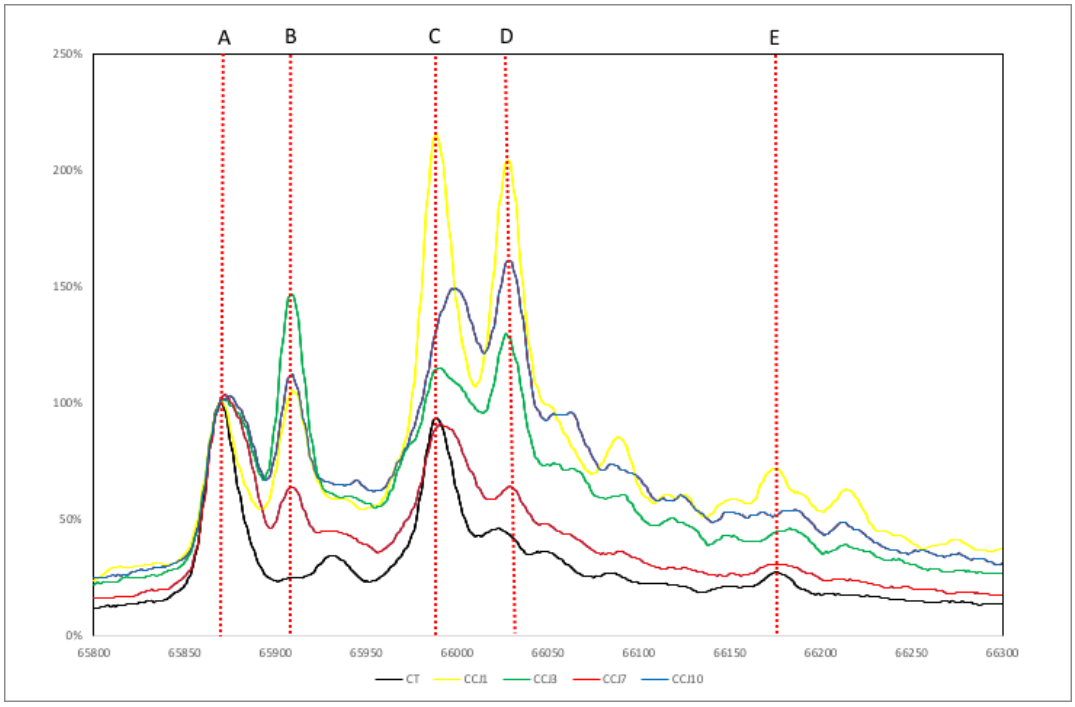

Figure 19 : Spectre de déconvolution de l'albumine du rat dans le modèle d'hépatotoxicité induite par CCl_4.

(HSA-native (A), HSA-Acet (B), HSA-Cys (C), HSA-Gly (D), HSA-Glut (E) ; CT = groupe contrôle (noir), ETJ1 = groupe J-1 (jaune), ETJ3 = groupe J-3 (vert), ETJ7 = groupe J-7 (bleu), ETJ10 = groupe J-10 (rouge)

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V.4.2.2. Estimation de l'abondance relative des isoformes

V.4.2.2.1. Modèle de toxicité induite par EtOH

Les abondances relatives obtenues pour toutes les isoformes identifiées ont significativement augmenté par rapport à la forme native de l'albumine (**figure 20**). Une variabilité intergroupe a aussi été observée avec une élévation rapide et significative des isoformes HSA-Acet, HSA-Gly et HSA-Glu dans tous les groupes. L'isoforme HSA-Cys augmente significativement dans tous les groupes, sauf le groupe J-7 (**figure 20**).

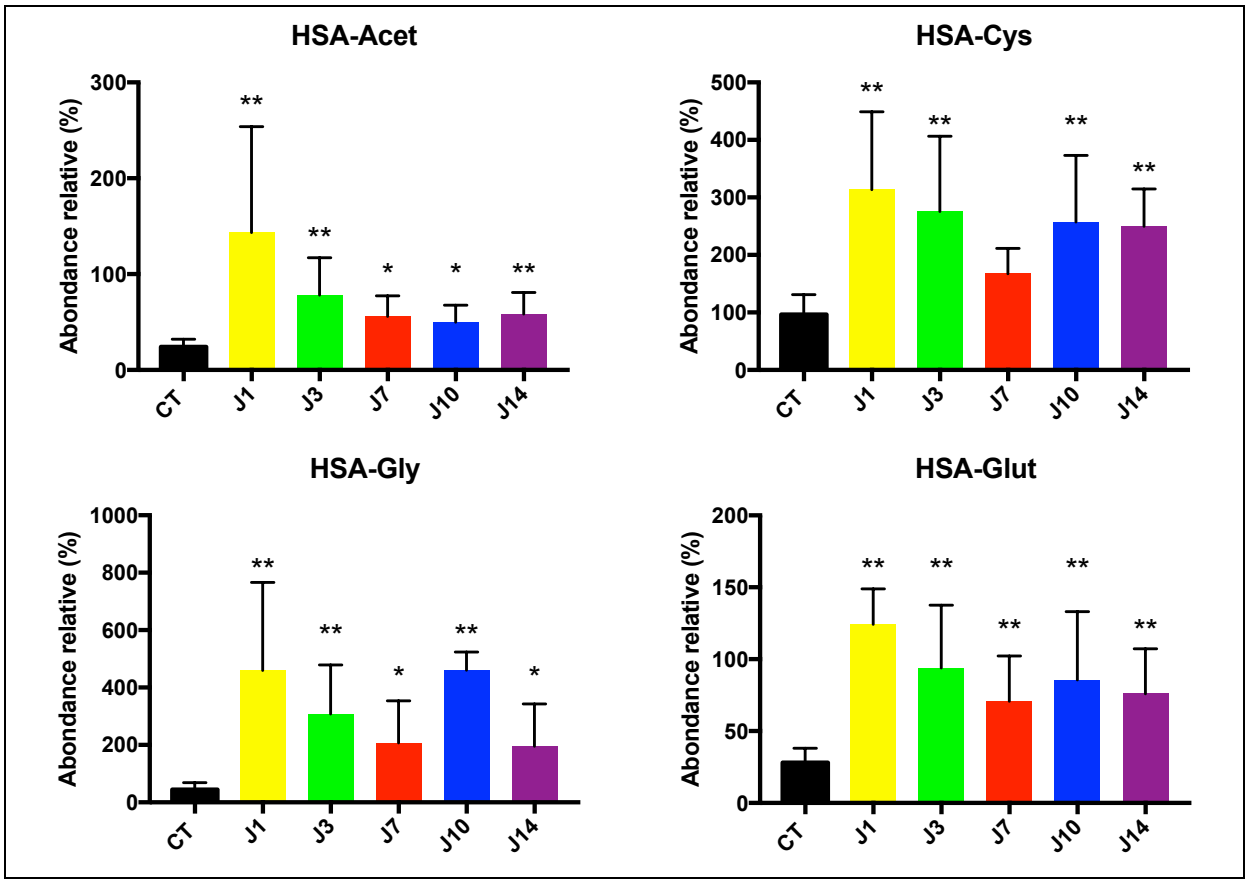

Figure 20 : Abondances relatives de chaque isoforme chez le modèle d'hépatotoxicité induite par EtOH (* *p* < 0,05 ; ** *p* < 0,01).

CT = groupe contrôle (noir), J1 = groupe J-1 (jaune), J3 = groupe J-3 (vert), J7 = groupe J-7 (rouge), J10 = groupe J-10 (bleu), J14 = groupe J-14 (violet)

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V.4.2.2.2. Modèle de toxicité induite par CCl_4

Les abondances relatives obtenues pour toutes les isoformes identifiées ont significativement augmenté par rapport à la forme native de l'albumine (**figure 21**). Une variabilité intergroupe a aussi été observée avec une élévation rapide et significative de l'isoforme HSA-Cys et HSA-Gly dans les groupes J1 et J10. L'isoforme HSA-Acet augmente significativement dans tous les groupes, alors que l'isoforme HSA-Glu augmente significativement dans les groupes J-1 et J-7 (**figure 21**).

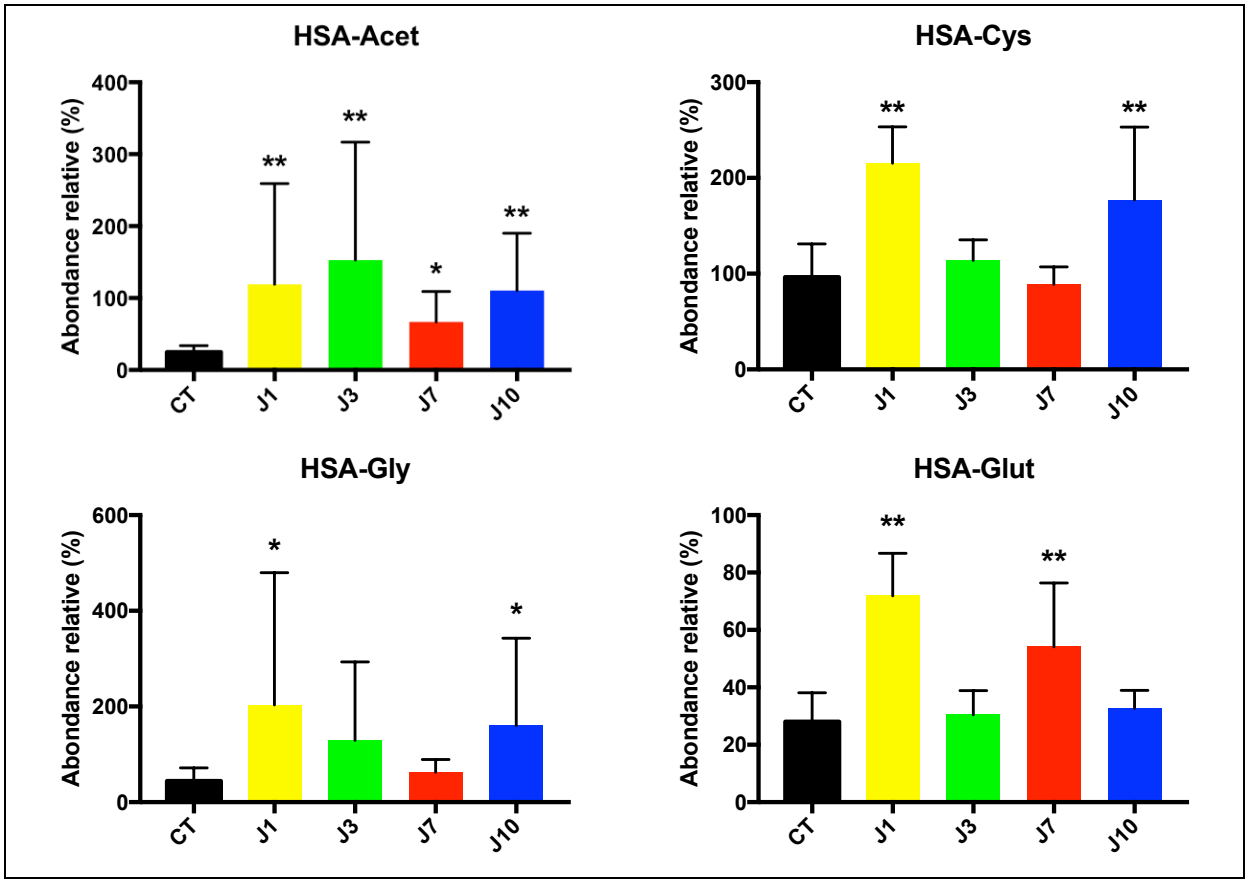

Figure 21 : Abondances relatives de chaque isoforme chez le modèle d'hépatotoxicité induite par CCl_4 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).
CT = groupe contrôle (noir), J1 = groupe J-1 (jaune), J3 = groupe J-3 (vert), J7 = groupe J-7 (rouge), J10 = groupe J-10 (bleu)

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V.4.3. Analyse des capacités de fixation des ligands par l'albumine

Les sérums des rats issus des différents groupes ont été incubés avec du cuivre, du cadmium, de l'or et de la L-thyroxine, en utilisant les nouvelles valeurs seuils déterminées précédemment chez l'homme, dans le but étudier la fixation de ces différents ligands sur l'albumine du rat.

V.4.3.1. Modèle de toxicité induite par EtOH

Par comparaison au groupe contrôle, la capacité de fixation de l'or était diminuée significativement dans les groupes J-1, J-3 et J-14 (**figure 22-C**) alors que la capacité de fixation de la L-thyroxine (par dosage de l'iode libre) était diminuée significativement dans les groupes J-1, J-3, J-10 et J-14 (**figure 22-D**). On a également observé une baisse significative de la capacité de fixation du cadmium dans le groupe J-14 (**figure 22-B**). Toutefois, aucune modification significative de la capacité de fixation du cuivre n'a été observée (**figure 22-A**).

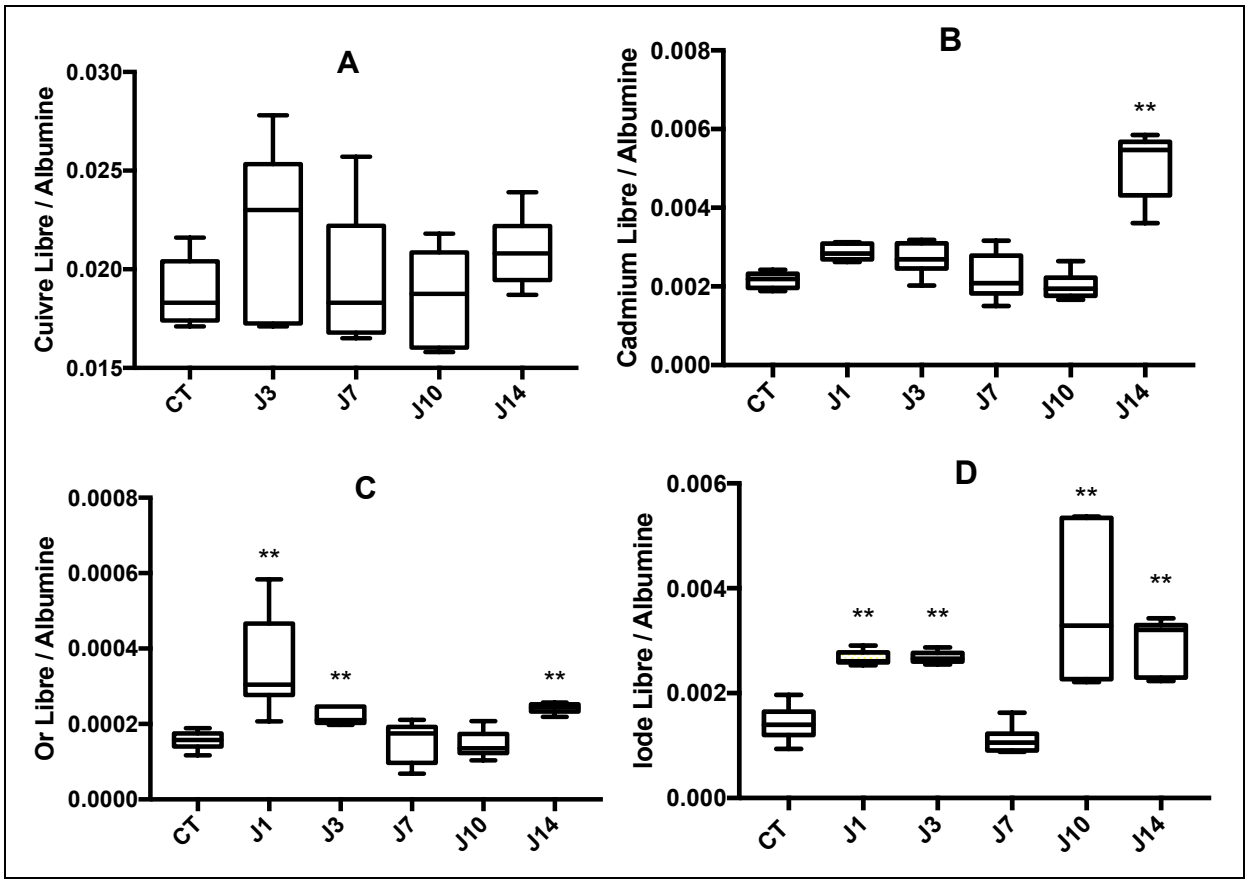

Figure 22 : Évolution de la fixation de différents ligands à l'albumine chez des rats mâles Wistar albinos dans un modèle de toxicité induite par EtOH pour un rapport « ligands ajouté sur la valeur d'HSA mesurée » de 5 pour le cuivre (A), le cadmium (B) et la L-thyroxine (D) et de 50 pour l'or (C) (: $p < 0,01$).**

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V.4.3.2. Modèle de toxicité induite par CCl_4

Par comparaison au groupe contrôle, la capacité de fixation de l'or était diminuée significativement dans les groupes J-1, J-3 et J-10 (**figure 23-C**) alors que la capacité de fixation du cuivre était diminuée significativement dans tous les groupes (**figure 23-A**). Toutefois, aucune modification significative des capacités de fixation du cadmium et de la L-thyroxine n'a été observée (**figure 23-B et 23-D**).

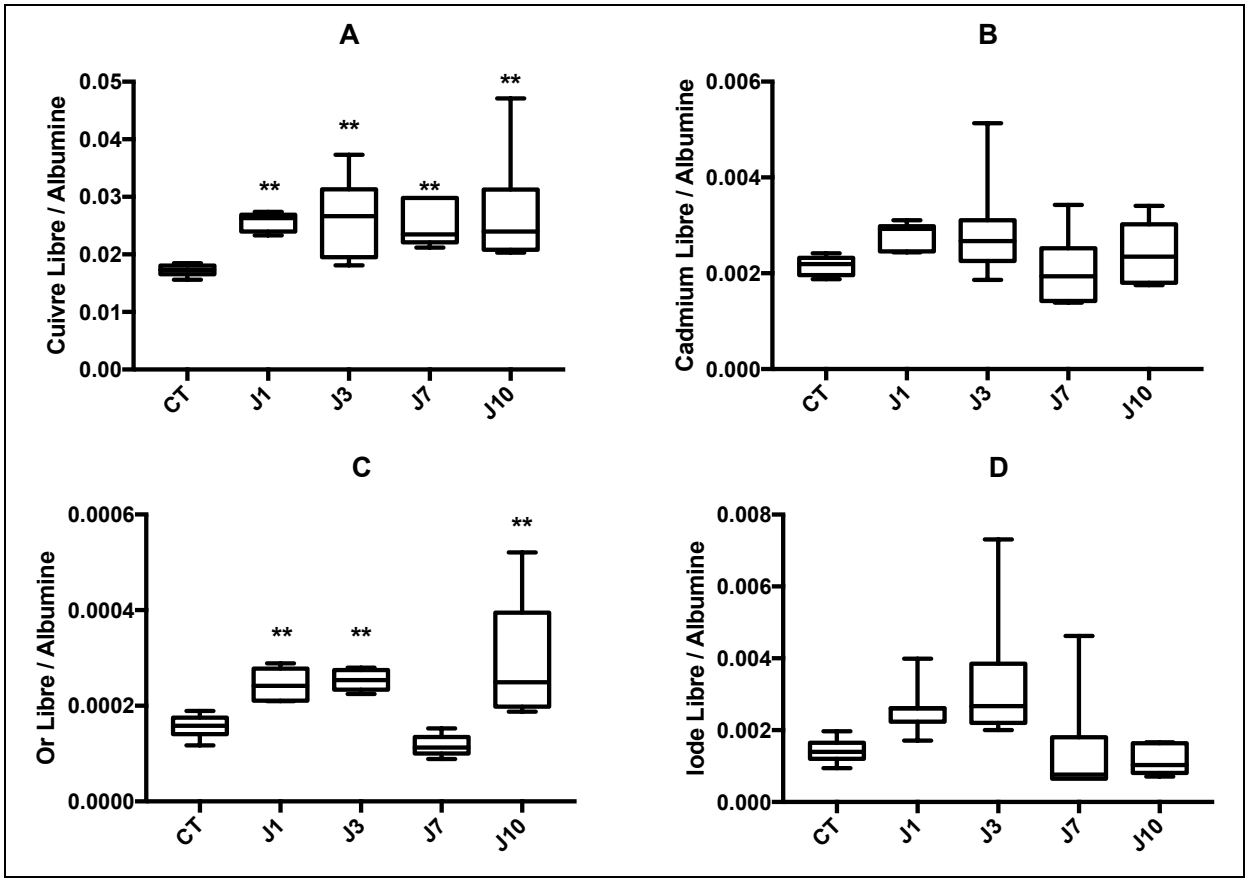

Figure 23 : Évolution de la fixation de différents ligands à l'albumine chez des rats mâles Wistar albinos dans un modèle de toxicité induite par CCl_4 pour un rapport « ligands ajouté sur la valeur d'HSA mesurée » de 5 pour le cuivre (A), le cadmium (B) et la L-thyroxine (D) et de 50 pour l'or (C) (: $p < 0,01$).**

V.4.4. Analyse anatomo-pathologique du foie

Dans le modèle d'hépatotoxicité induite par EtOH, nous avons observé une faible inflammation lobulaire des hépatocytes dès le 10ème jour. Alors que dans le modèle d'hépatotoxicité induite par CCl_4, nous avons observé une inflammation lobulaire majeure des hépatocytes avec une stéatose centrolobulaire mixte significative dès le 3ème jour. Cependant, nous n'avons jamais atteint le stade fibrose ou le stade cirrhose quel que soit le modèle animal.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V.5. ÉTUDE « ALCIR »

V.5.1. Étude des différentes isoformes de l'albumine (cohorte de développement et cohorte de validation

En plus de l'isoforme HSA native, plusieurs isoformes supplémentaires ont été détectées chez les « témoins » : cystéinylation (HSA-CYS), glycosylation (HSA-GLY). En outre, une isoforme supplémentaire de l'HSA a été générée à partir de la combinaison de la forme cystéinylée avec la forme glycosylée (HSA-CYS-GLYC). Par conséquent, en plus de l'isoforme native HSA, nous avons pu identifier trois isoformes majeures.

Les mêmes isoformes que celles identifiées dans des échantillons de plasma de sujets « témoins » ont été détectées chez des patients atteints de cirrhose (**figure 24**). L'analyse du spectre de masse a révélé que l'étendue de la plupart des altérations structurelles était significativement plus grande que celle des « témoins » que ce soit dans la cohorte de développement ou la cohorte de validation (**figure 24**). En conséquence, l'abondance relative de l'isoforme HSA native inchangée a été significativement réduite chez les patients atteints de cirrhose.

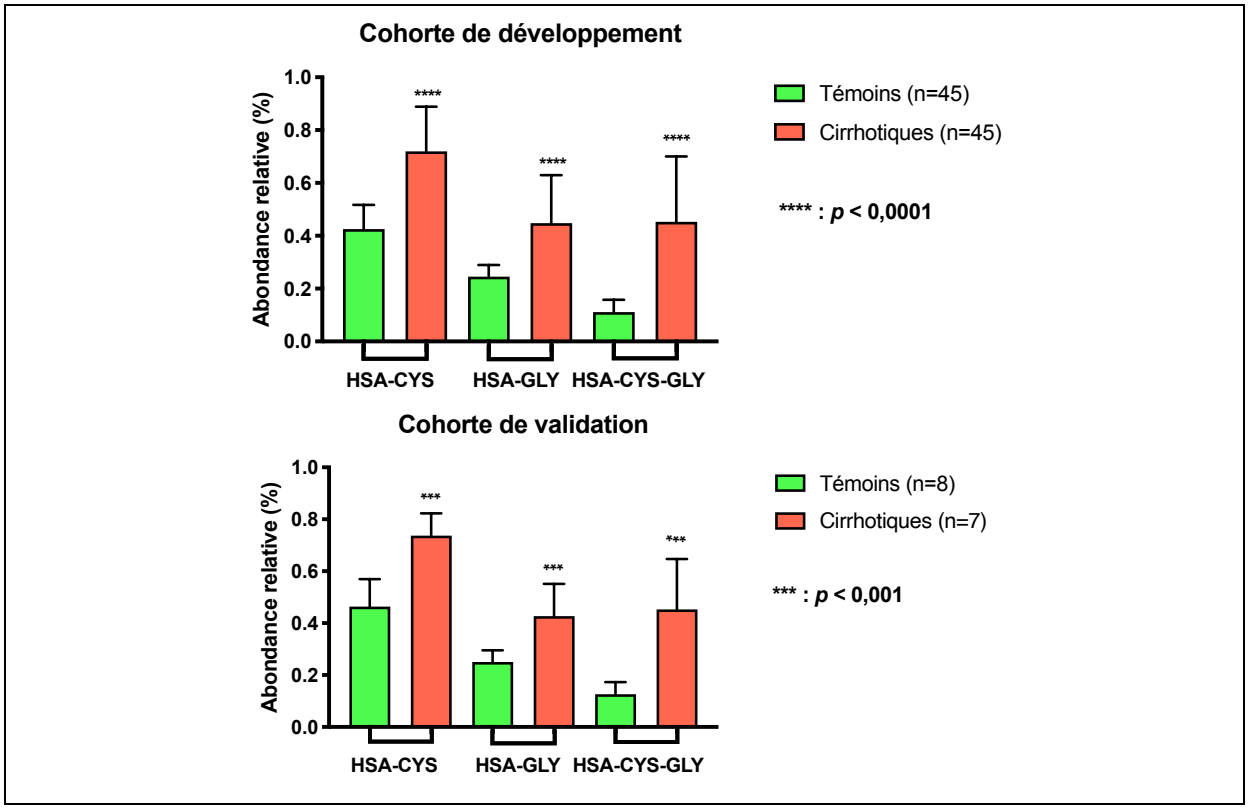

Figure 24 : Abondances relatives de chaque isoforme dans la cohorte de développement et la cohorte de validation.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V.5.2. Analyse des capacités de fixation des ligands par l'albumine (SEB-Test)

V.5.2.1. Cohorte de développement

Par comparaison aux patients « témoins », les capacités de fixation de tous les ligands (cuivre, cadmium, or, dansylsarcosine, L-thyroxine) étaient diminuées significativement chez les patients « cirrhotiques » ($p < 0,0001$) **(figure 25)**.

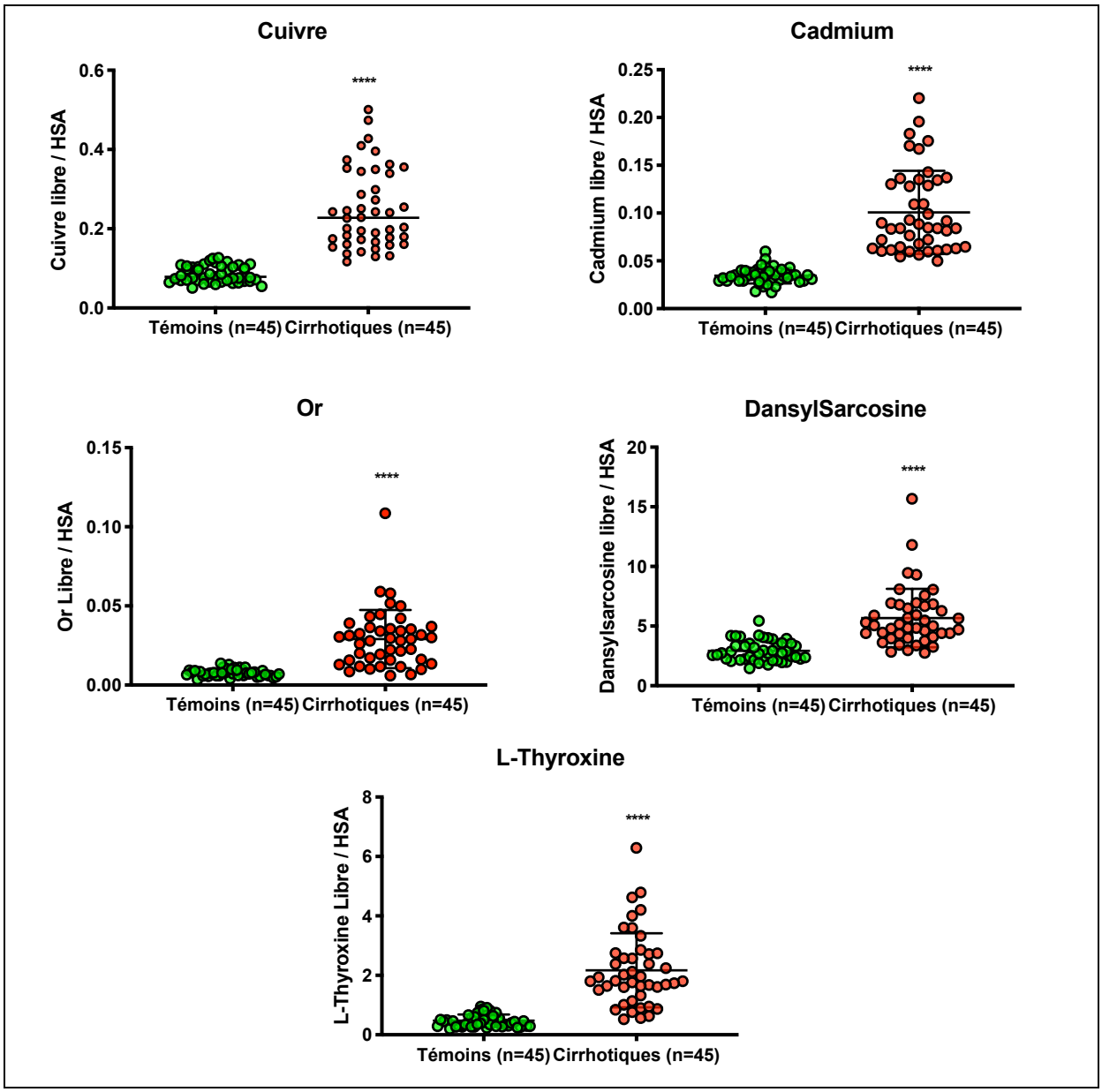

Figure 25 : Évaluation de la capacité fixation de différents ligands à l'albumine dans la cohorte de développement (** : $p < 0,0001$).**

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V.5.2.2. Cohorte de validation

Après la levée de l'aveugle, il est apparu que les capacités de fixation de tous les ligands (cuivre, cadmium, or, dansylsarcosine, L-thyroxine) étaient diminuées avec une augmentation significative du rapport ligand sur albumine chez les patients « cirrhotiques » par rapport aux patients « témoins » ($p < 0,0001$) **(figure 26)**.

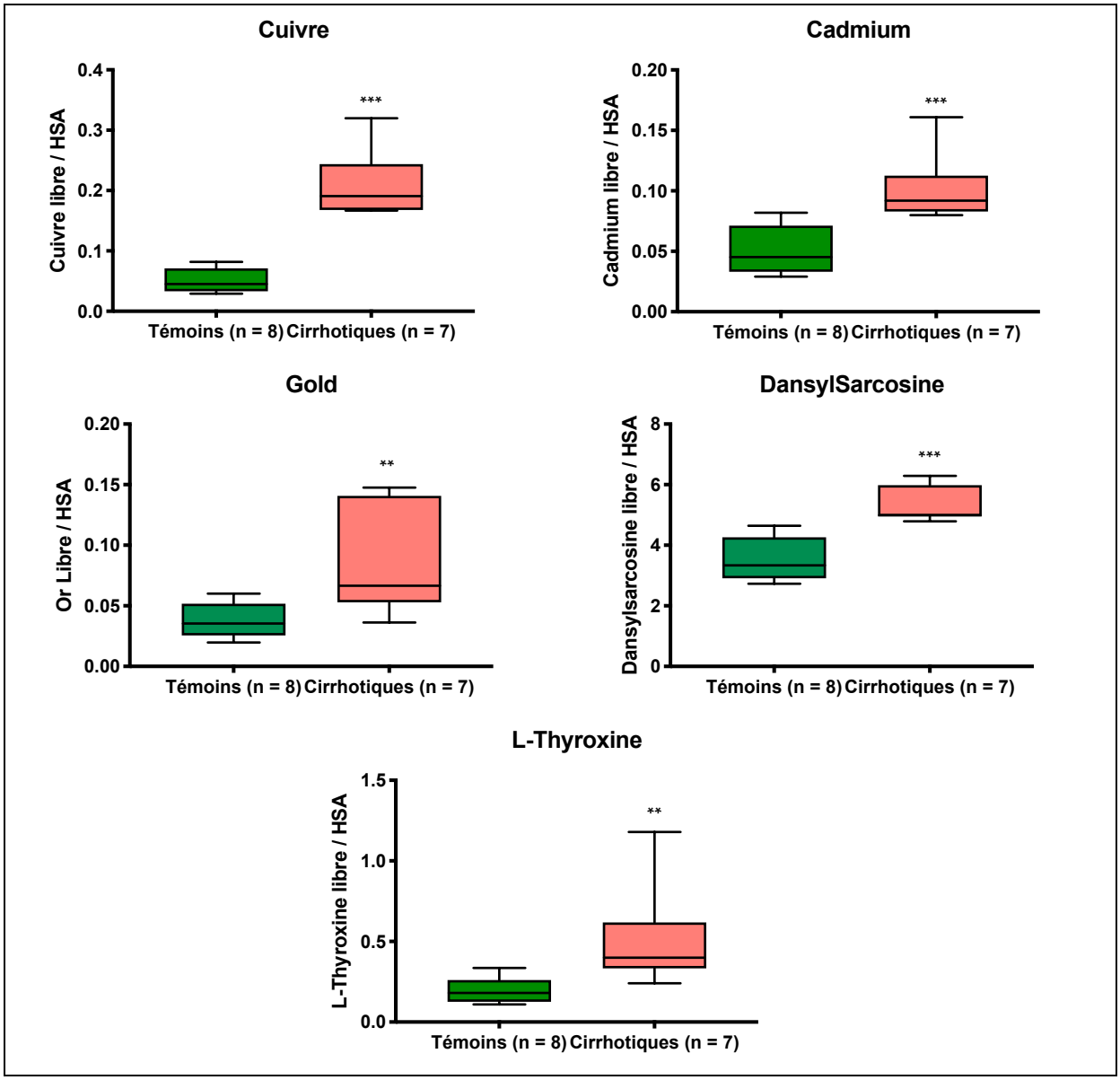

Figure 26 : Évaluation de la capacité fixation de différents ligands à l'albumine dans la cohorte de développement (** : $p < 0,0001$).**

Licence CC BY-NC-ND 3.0

La **figure 27**, représentant des courbes ROC (Receiver Operating Characteristic), nous montre les performances du SEB-Test avec d'excellentes sensibilités et spécificités.

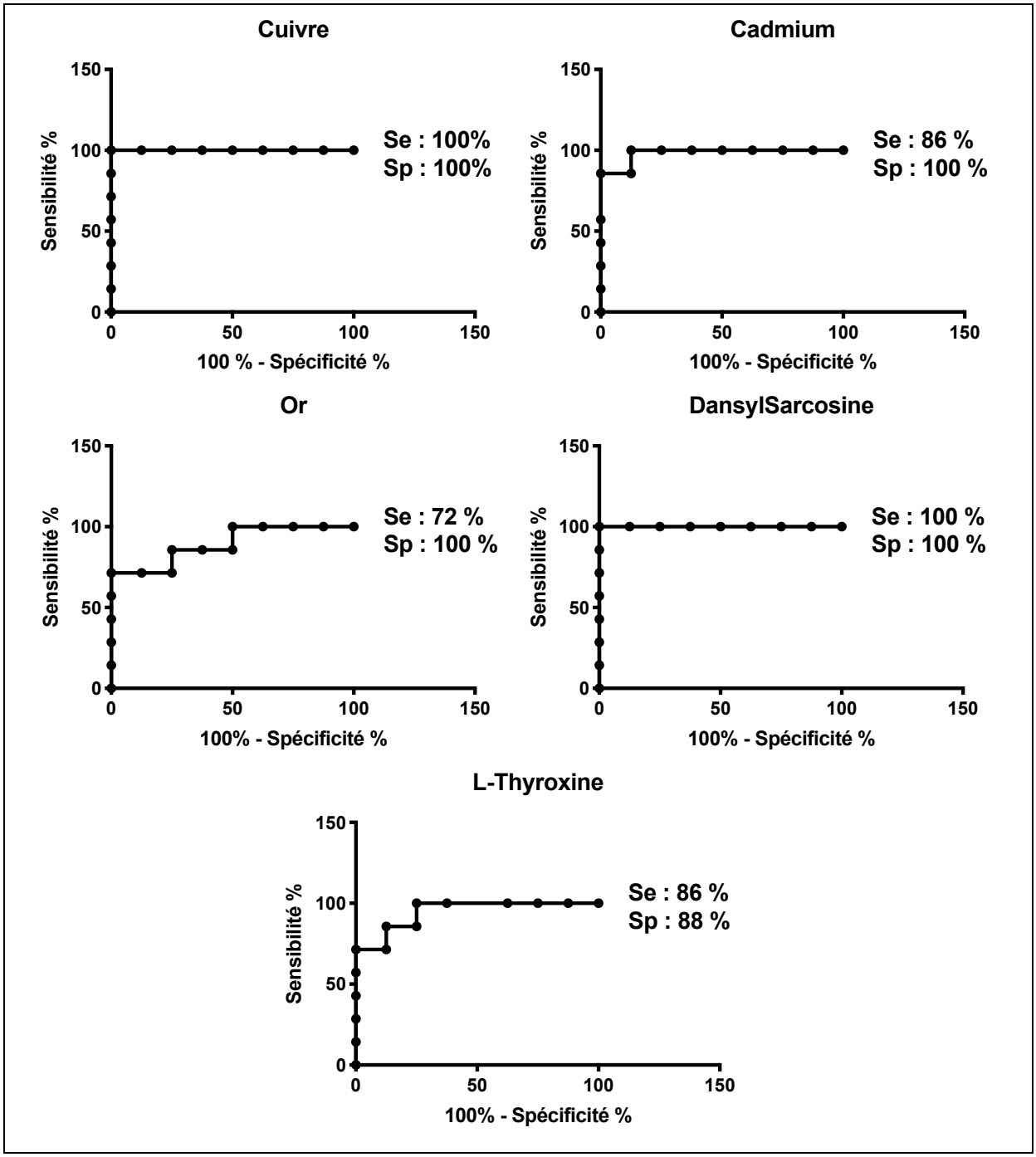

Figure 27 : Courbes ROC représentant sensibilité en fonction de 1-spécificité pour la cirrhose en fonction du seuil des différents ligands (Se : sensibilité, Sp : spécificité).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V.5.2.3. Cohorte de développement et de validation

L'utilisation de l'analyse en composantes principales (ACP) a permis d'explorer la combinaison des résultats obtenus avec tous les ligands. Les **figures 28 et 29** nous montrent, de façon nette, une séparation entre les « témoins et les « cirrhotiques » dans la cohorte de développement et de validation.

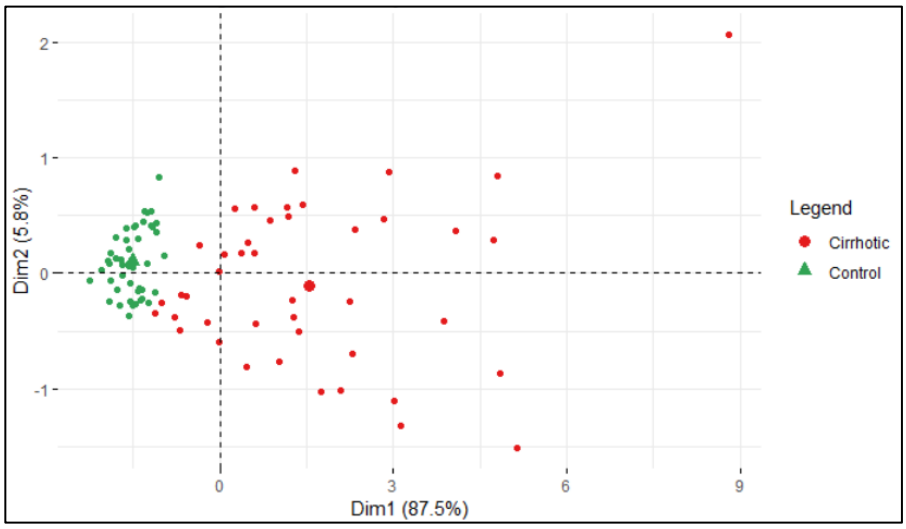

Figure 28 : Discrimination des patients de la cohorte de développement par analyse en composantes principales sur tous les résultats obtenus avec le SEB-test (triangle vert : « témoins » ; cercle rouge : « cirrhotiques »).

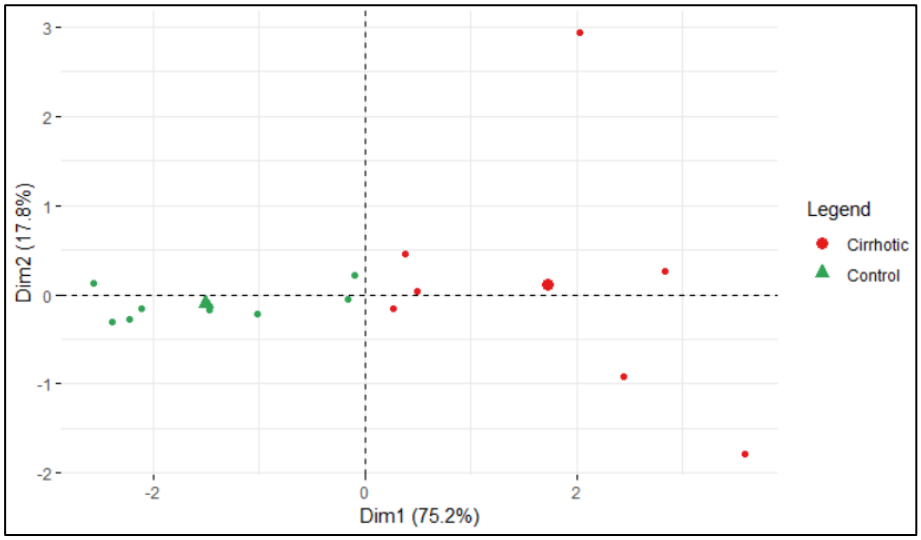

Figure 29 : Discrimination des patients de la cohorte de validation par analyse en composantes principales sur tous les résultats obtenus avec le SEB-test (triangle vert : « témoins » ; cercle rouge : « cirrhotiques »).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

VI. DISCUSSION & CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus au sein de notre équipe de recherche (UMR 1248 Inserm), montre le potentiel de l'utilisation des modifications structurales de l'albumine comme biomarqueurs d'une atteinte précoce de la fonction hépatique, en exploitant les modifications de la capacité de l'albumine à fixer certains ligands, tel que le cuivre, le cadmium, l'or, la L-thyroxine et la dansylsarcosine.

Les objectifs principaux de nos travaux étaient de suivre l'évolution des modifications de l'albumine dans l'atteinte hépatique, jusqu'à l'apparition d'une fibrose/cirrhose, en développant des modèles de toxicité hépatique induite par EtOH et par CCl_4 chez des rats mâles albinos Wistar, mais également de valider les performances diagnostiques du SEB-test dans une cohorte de patients hospitalisés. Une des originalités de nos travaux est l'utilisation de l'ICP-MS pour étudier ces phénomènes, avec une mesure en parallèle des différentes isoformes de l'albumine afin de confirmer ces phénomènes. Mais avant de développer les modèles expérimentaux et de valider les performances diagnostiques du notre test, nous avons procédé à quelques travaux préalables liés à l'élaboration du SEB-Test qui étaient nécessaires au bon déroulement de la suite.

Pour élaborer le SEB-Test, nous avons sélectionné plusieurs ligands avec des sites de liaison spécifiques connus sur l'albumine. Les sites de liaison ont été choisis afin de couvrir les modifications les plus importantes de l'HSA avec une pertinence clinique rapportée dans les dysfonctionnements hépatiques. Sur ces bases, l'or (Au) a été sélectionné pour révéler les modifications de Cys34 (Shen et al., 2003, Li et al., 2007, Sokolawska et al, 2009), le cuivre (Cu) pour sa forte affinité avec le site N-terminal (NTS) et le multiple-metal binding site B (MBS-B) (Peters et al., 1995), la L-thyroxine pour ses 4 sites de liaison distribués dans les 4 cavités de l'HSA (Tr1 à Tr4) (Petitpas et al., 2003), la dansylsarcosine (Ds) pour son affinité avec le drug binding site 2 (DBS-2) (ou site de liaison du diazépam), qui est également le site de liaison de la bilirubine (Kawakami et al., 2006), et le cadmium (Cd) pour son affinité pour le multiple-metal binding site A (ou site de liaison du cadmium) (Bal et al., 1998). À l'heure actuelle, aucune donnée n'a été mentionnée dans la littérature concernant le nombre d'atomes d'or (Au) pouvant se fixer sur la Cys34.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Nous avons observé que le sérum humain est capable de lier jusqu'à 12 atomes de Cu, 150 atomes d'Au, 70 atomes de Cd, 20 molécules de dansylsarcosine et au moins 10 molécules de L-thyroxine par molécules d'albumine. Ces valeurs étaient bien supérieures aux valeurs théoriques et expérimentales rapportées dans la littérature.

Il a été rapporté que l'HSA est capable de lier moins de 2 atomes de Cu (Appleton et al., 1971). Il a été confirmé plus tard, par modélisation *in silico*, qu'un seul site de liaison spécifique, à savoir le NTS, est capable de se lier au cuivre, et que le MBS-B présente une très faible affinité pour le cuivre (**figure 30**). Dans ces études, des chélates de faible poids moléculaire ont été utilisés pour prévenir l'hydrolyse du ligand et la polymérisation ultérieure, empêchant ainsi les liaisons non spécifiques. Dans les conditions expérimentales utilisées dans le SEB-Test, une hydrolyse des ligands pourrait évidemment se produire, ce qui pourrait être responsable de liaisons non spécifiques dues aux forces de Van der Waals (Sendzik et al., 2017). Dans un modèle *in silico*, nous avons pu démontrer que l'HSA est capable de lier de manière covalente 2 atomes de cuivre dans 2 sites de liaison spécifiques et jusqu'à 40 atomes de cuivre sur différents sites de liaison non spécifiques (**figure 30**). Par conséquent, nous avons décidé d'appliquer le SEB-Test avec des concentrations de ligands plus faibles. De nouvelles valeurs seuils pouvant discriminer un patient sain d'un patient cirrhotique ont été déterminées pour chaque ligand (cuivre, cadmium, or, L-thyroxine, dansylsarcosine) avec une significativité élevée.

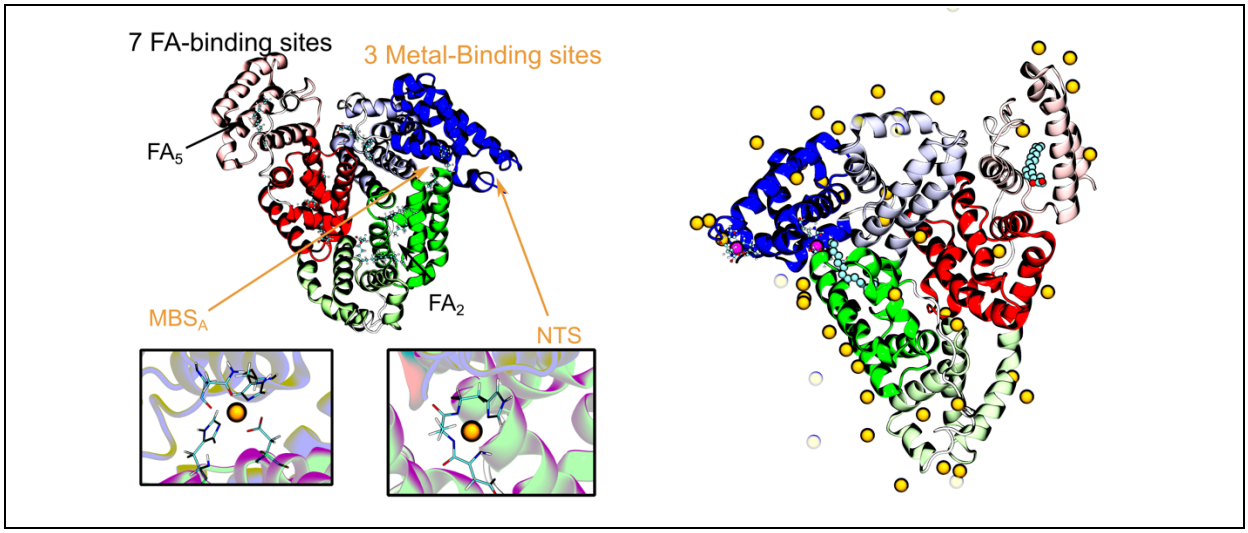

Figure 30 : Localisation des sites spécifiques de fixation du cuivre, NTS et MBS-A, sur l'HSA (Di Meo et al., 2019) (à gauche).
Les sites de fixation spécifiques sont **en violet** et les non spécifiques sont **en jaune** (**à droite**).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Toutes ces étapes étaient primordiales pour débuter l'exploration des modifications de l'albumine chez l'animal et valider les performances du SEB-Test. En raison de la synthèse exclusive de l'albumine dans le foie, notre hypothèse était que les modifications de l'albumine soient d'une apparition assez précoce au cours de l'atteinte hépatique.

Le développement et l'utilisation de modèles animaux nous a permis d'étudier et de suivre l'évolution des modifications de l'albumine dès l'induction d'une toxicité. Dans ce cadre, nous avons choisi de suivre le protocole d'induction de la cirrhose rapporté par Nipanikar et al. (Nipanikar et al., 2017), basé sur l'administration orale quotidienne d'EtOH ou de CCl_4 à des rats mâles albinos Wistar. L'atteinte hépatique a été confirmée par des examens biologiques. La séparation des différentes isoformes de l'albumine du rat nous a permis d'identifier quatre isoformes majoritaires montrant une variation significative dans le temps.

Concernant le modèle de toxicité induite par EtOH, l'hépatotoxicité a été confirmée par une cytolyse hépatique (augmentation des transaminases, ALAT et ASAT) significative dès le 7ème jour (pour les ASAT) et 8ème jour (pour les ALAT) d'administration. Aucun signe de cholestase significative (augmentation des bilirubines totales et conjuguées, des PAL) n'a été observée.

Nous avons également remarqué une baisse significative de fixation de la L-thyroxine de façon très précoce chez les rats sous EtOH. Notre hypothèse, ici, est que les modifications périphériques de l'albumine (Cys34, N terminal et C-terminal) modifient la structure conformationnelle de l'albumine, empêchant ainsi la fixation de la L-thyroxine. La L-thyroxine possède 4 sites de fixation (Tr1 à Tr4) sans qu'il soit rapporté des modifications propres sur ses sites. En effet, Kawakami et al. ont rapporté qu'une modification de la Cys34 induit un changement de conformation de l'albumine empêchant ainsi la fixation de la Céfazoline et du Vérapamil (Kawakami et al., 2006).

D'autre part, chez les rats sous EtOH, le cadmium montrait une fixation comparable aux témoins sauf à J-14. Ceci suggérerait que le MBS (site de fixation préférentiel du cadmium) ne soit modifié qu'à un stade avancé de l'atteinte hépatique ou que la fixation du cadmium ne soit impactée que lorsque l'albumine native devient très minoritaire.

Enfin, la capacité de fixation du cuivre n'était pas impactée par l'atteinte hépatique et l'albumine était capable de fixer le cuivre dans tous les groupes de rats sous EtOH. Cela est expliquée par l'absence de PTM touchant le site de fixation du cuivre, le NTS. Quant à la glycosylation significative de l'albumine observée dans ce modèle, elle s'opère sur des résidus lysines (Naldi et al., 2017) n'affectant pas les sites de fixation des ligands étudiée ici.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Concernant le modèle de toxicité induite par CCl_4, l'hépatotoxicité a été confirmée par une cytolyse hépatique significative dès le 1ème jour d'administration. Une cholestase significative a été observée à partir du 7ème jour d'administration. Nous avons observé que la fixation de la L-thyroxine chez les rats sous CCl_4 n'était pas impactée. Nous pensons que ce résultat contradictoire est lié à la dilution du CCl_4 avec de l'huile d'olive (riche en acides gras). En effet, les acides gras sont responsables de changements conformationnels, qui produisent un réarrangement de la structure tridimensionnelle de l'albumine avec la formation d'un cinquième site de liaison de la L-thyroxine, appelé Tr-5 (Fanali et al.,2012), permettant à la L-thyroxine de s'y fixer.

Nous avons également remarqué que la fixation du cadmium chez les rats sous CCl_4 n'était pas impactée. Cela s'explique probablement par le fait que les acides gras, contenus dans l'huile d'olive, induisent un réarrangement de la structure tridimensionnelle de l'HSA, avec un dégagement du site de fixation du Cadmium, le MBS (Fanali et al.,2012). Chez ces mêmes rats, il a été démontré que les modifications de capacité de fixation de l'HSA ne touchaient que l'or et le cuivre. Cela est expliquée probablement par une acétylation significative de l'albumine au niveau du NTS pour le cuivre et une cystéinylation significative au niveau de Cys34 pour l'or.

Concernant les deux modèles de toxicité, nous avons observé que les capacités de fixation à J7 n'étaient plus significativement différentes chez les rats recevant de l'EtOH ou du CCl_4. Cela pourrait s'expliquer par une régénération des hépatocytes associée à la production d'HSA « non modifiée » (Mao et al., 2014). Cette constatation est cohérente avec la baisse des abondances relatives des isoformes par rapport à l'HSA native. La ré-augmentation à J-10 des abondances relatives des isoformes serait alors due à l'incapacité du foie à se régénérer après l'exposition prolongée aux toxiques (Mao et *al.*, 2014).

Quel que soit le modèle (EtOH ou CCl_4), la capacité de fixation de l'or est significativement diminuée. Cela peut s'expliquer par la présence importante de la forme cystéinylée de l'albumine. Cette PTM s'observe au niveau de la Cys34, le site de fixation préférentiel de l'or. On peut également remarquer la présence de l'isoforme glutathionylée qui augmente significativement. Cette PTM s'observe au niveau de la Cys34, mais ne semble pas affecter les sites de fixation des ligands étudiés ici. Nous pensons que la production de l'isoforme glutathionylée pourrait induire un effet hépato-protecteur vis-à-vis des toxiques, car il augmente significativement dans les groupes J-7, groupes dans lesquels les autres isoformes impliquées dans l'atteinte hépatique sont diminuées.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Après l'étude chez l'animal, la mise en place de l'étude ALCIR a été primordiale pour valider les performances diagnostiques du SEB Test (Serum Enhanced Binding Test). Dans cette étude, nous avons démontré que les capacités de liaison des ligands sélectionnés sont significativement différentes entre les patients cirrhotiques et les patients sans dysfonctionnement hépatique (**figure 26**).

En effet, par rapport aux patients ayant des fonctions hépatiques normales, tous les patients cirrhotiques présentaient des taux élevés de HSA modifiée (cystéinylation, glycosylation, cystéinylation-glycosylation). Cela nous permet de confirmer que les modifications les plus importantes de la structure de l'albumine dues à un dysfonctionnement hépatique pourraient être révélées en mesurant la fraction non liée de ligands spécifiques enrichis dans le sérum. Plusieurs études ont rapporté des modifications chimiques et / ou structurelles de la HSA dans des maladies hépatiques avancées (Domenicali et al., 2014, Oettl et al., 2013, Das et al, 2018). Tous les ligands testés ont ensuite été capables de discriminer les patients cirrhotiques des individus non cirrhotiques avec d'excellentes sensibilité et spécificité dans la cohorte de validation. La performance du SEB-Test était excellente dans la cohorte de validation (**figure 27**).

Les résultats obtenus présentent toutefois des limites. Premièrement, nos résultats ne reflètent pas l'ensemble des différents types d'atteintes hépatiques. Deuxièmement, l'identification que nous proposons pour les différentes isoformes repose sur les différences de masse observées lors des analyses de LC-Triple TOF. Une digestion trypsique serait nécessaire pour une identification formelle. Troisièmement, dans la gamme de masse (entre 60 000 et 70 000 Da) que nous avons analysée, certains pics représentant des isoformes « non typées » ont été observés en plus des quatre isoformes déjà connues. Ces pics ont été exclus de l'analyse mais pourraient être d'intérêt. Enfin, seulement 15 patients parmi les 30 patients recrutés ont été éligibles pour l'analyse en aveugle dans la cohorte de validation après l'application des critères d'exclusion. En raison du faible échantillonnage (seulement 7 patients cirrhotiques), nous n'avons pu discriminer significativement les patients en fonction de leur stade de cirrhose ou de leur étiologie.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

En conclusion, nous avons observé et identifié des altérations post-traductionnelles, impliquant différents sites de l'albumine, qui conduisent à des conséquences fonctionnelles et à une réduction progressive de l'albumine native, la seule isoforme dotée d'intégrité structurelle et fonctionnelle. Nous avons également montré qu'il serait possible de révéler une souffrance hépatocytaire précoce, avant les biomarqueurs biochimiques actuels, par une simple mesure de la fraction non liée de certains ligands de l'albumine (SEB-Test). Ayant prouvé son excellente performance diagnostique, le SEB-Test a fait l'objet d'un dépôt de brevet international publié en Juin 2020.

En perspectives, nous envisageons le développement d'autres modèles expérimentaux d'hépatotoxicité (intoxication au paracétamol, ligature du canal cholédoque) afin de mieux comprendre les résultats et mécanismes physiopathologiques observés chez l'Homme. Également, une étude clinique (projet ALBoM) en collaboration avec le service d'hépato-gastroentérologie est en cours afin de tester les performances de nos outils en fonction du stade de cirrhose ou de fibrose.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Références bibliographiques

1. Angermayr B, Koenig F, Cejna M, et al. Creatinine-modified Child-Pugh score (CPSC) compared with MELD-score to predict survival in patients undergoing TIPS. Hepatology. 2002;36:378A.

2. Antoine, D. J., Dear, J. W., Lewis, P. S., Platt, V., Coyle, J., Masson, M., et al. (2013). Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital. Hepatology 58 (2), 777–787. doi: 10.1002/hep.26294

3. Appleton D.W., B. Sarkar, The absence of specific copper(II)-binding site in dog albumin, J. Biol. Chem. 246 (1971) 5040–5046.

4. Arai, M., Yokosuka, O., Kanda, T., Fukai, K., Imazeki, F., Muramatsu, M., et al. (2006). Serum osteopontin levels in patients with acute liver dysfunction. Scand. J. Gastroenterol. 41 (1), 102– 110. doi: 10.1080/00365520510024061

5. Arroyo V., R. García-Martinez, X. Salvatella, Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis, J. Hepatol. 61 (2014) 396-407.

6. Asada, M., and Galambos, J. T. (1963). Sorbitol Dehydrogenase and Hepatocellular Injury - an Experimental and Clinical Study. Gastroenterology 44 (5), 578–57+. doi: 10.1016/S0016- 5085(63)80026-8

7. B. Lipinski, Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease, Oxid. Med. Cell. Longev. 2011 (2011).

8. Bal W., J. Christodoulou, P.J. Sadler, A. Tucker, Multi-metal binding site of serum albumin, J. Inorg. Biochem. 70 (1998) 33-39.

9. Baldassarre M., M. Domenicali, M. Naldi, M. Laggetta, F.A. Giannone, M. Biselli, D. Patrono, C. Bertucci, Bernardi M., P. Caraceni, Albumin homodimers in patients with cirrhosis: clinical and prognostic relevance of a novel identified structural alteration of the molecule, Sci. Rep. 6 (2016) 35987.

10. Bar-Or D., et al. Dehydroalanine derived from cysteine is a common post-translational modification in human serum albumin. Rapid Commun Mass Spectrom. 2008; 22:711-716.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

11. Bar-Or D., L.T. Rael, R. Bar-Or, D.S. Slone, M.L. Craun, The formation and rapid clearance of a truncated albumin species in a critically ill patient, Clin. Chim. Acta 365 (2006) 346-349.

12. Bar-Or D., R. Bar-Or, L.T. Rael, D.K. Gardner, D.S. Slone, M.L. Craun, Heterogeneity and oxidation status of commercial human albumin preparations in clinical use, Crit. Care Med. 33 (2005) 1638-1641.

13. Bass, N. M. (1988). The cellular fatty acid binding proteins: aspects of structure, regulation, and function. Int. Rev. Cytol. 111, 143–184. doi: 10.1016/s0074-7696(08)61733-7

14. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest 2005;115:209-18.

15. Benichou C. Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. J Hepatol 1990;11:272-6.

16. Berg J.M., H.A. Godwin, Lessons from zinc-binding peptides, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26 (1997) 357-371.

17. Bertucci C., E. Domenici, Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance, Curr. Med. Chem. 9 (2002) 1463-1481.

18. Biggins SW, Kim WR, Terrault NA, et al. Evidence-based incorporation of serum sodium concentration into MELD. Gastroenterology. 2006;130:1652–1660.

19. Biggins SW, Rodriguez HJ, Bacchetti P, Bass NM, Roberts JP, Terrault NA. Serum sodium predicts mortality in patients listed for liver transplantation. Hepatology. 2005;41:32–39.

20. Blindauer, C.A., Harvey, I., Bunyan, K.E., Stewart, A.J., Sleep, D., Harrison, D.J., Berezenko, S., Sadler, P.J., 2009. Structure, properties, and engineering of the major zinc binding site on human albumin. J. Biol. Chem. 284, 23116-23224.

21. Bohlooli M.,A.A.Moosavi-Movahedi,F.Taghavi,P.Maghami,A.A.Saboury,Z. Moosavi-Movahedi, M. Farhadi, J. Hong, N. Sheibani, M. Habibi-Rezaei, Investigation of thermal reversibility and stability of glycated human serum albumin, Int. J. Biol. Macromol. 62 (2013) 358-364.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

22. Bourdon, E., Loreau, N., Blache, D., 1999. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. FASEB J. 13, 233-244.

23. Brawn Wold E; Fauci A; Kasper D; et al. (2002). Harison paris, Flammarion: p1754.

24. Carballal S., R. Radi, M.C. Kirk, S. Barnes, B.A. Freeman, B. Alvarez, Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite, Biochemistry 42 (2003) 9906–9914.

25. Castellanos M.M., C.M. Colina, Molecular dynamics simulations of human serum albumin and role of disulfide bonds, J. Phys. Chem. B 117 (2013) 11895-11905.

26. Chu, T., Jiang, L., Ying, W., and Han, B. (2017). M30/M65 ratio predicts the outcome of paclitaxel chemotherapy for NSCLC. Clin. Transl. Oncol. 19 (3), 326–331. doi: 10.1007/s12094-016-1533-x

27. Das S, Maras JS, Maiwall R, et al (2018) Molecular Ellipticity of Circulating Albumin-Bilirubin Complex Associates With Mortality in Patients With Severe Alcoholic Hepatitis. Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc 16:1322– 1332.e4 . doi: 10.1016/j.cgh.2017.11.022

28. David Bar–Or, Edward Lau, James V. Winkler. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia – A preliminary report. The Journal of Emergency Medicine, Vol. 19, No. 4, pp. 311–315, 2000

29. Dhubhghaill O., P.J. Sadler, A. Tucker, Drug induced reactions of bovine serum albumin: ^{1}H NMR studies of gold binding and cysteine release, J. Am. Chem. Soc. 114 (1992) 1117–1118.

30. Dockal M., D.C. Carter, F. Rüker, Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH, J. Biol. Chem. 275 (2000) 3042–3050.

31. Dockal M., D.C. Carter, F. Rüker, The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties, J. Biol. Chem. 274 (1999) 29303-29310.

32. Domenicali M, Baldassarre M, Giannone FA, et al. Posttranscriptional changes of serum albumin: clinical and prognostic significance in hospitalized patients with cirrhosis. Hepatology. 2014;60(6):1851-1860.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

33. Evans T.W., Review article: albumin as a drug – biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure, Aliment. Pharmacol. Ther. 16 (Suppl. 5) (2002) 6–11.

34. Fanali G, di Masi A, Trezza V, et al (2012) Human serum albumin: from bench to bedside. Mol Aspects Med 33:209–290 . doi: 10.1016/j.mam.2011.12.002

35. Fanali G., A. Di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, Human serum albumin: from bench to bedside, Mol. Aspects Med. 33 (2012) 209–290.

36. Fernández J., J. Monteagudo, X. Bargallo, W. Jiménez, J. Bosch, V. Arroyo, M. Navasa, A randomized unblinded pilot study comparing albumin versus hydroxyethyl starch in spontaneous bacterial peritonitis, Hepatology 42 (2005) 627–634.

37. Ferrer M.L., R.Duchowicz, B.Carrasco, J.G.delaTorre, A.U.Acuna, The conformation of serum albumin in solution: a combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modeling study, Biophys. J. 80 (2001) 2422–2430.

38. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. Cell Death Differ. 19 (1), 107–120. doi: 10.1038/cdd.2011.96

39. Gardella, S., Andrei, C., Ferrera, D., Lotti, L. V., Torrisi, M. R., Bianchi, M. E., et al. (2002). The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non- classical, vesicle-mediated secretory pathway. Embo Rep. 3 (10), 995–1001. doi: 10.1093/embo-reports/kvf198

40. Giffen, P. S., Pick, C. R., Price, M. A., Williams, A., and York, M. J. (2002). Alpha-glutathione S-transferase in the assessment of hepatotoxicity–its diagnostic utility in comparison with other recognized markers in the Wistar Han rat. Toxicol. Pathol. 30 (3), 365–372. doi: 10.1080/01926230252929945

41. Harrill, A. H., Roach, J., Fier, I., Eaddy, J. S., Kurtz, C. L., Antoine, D. J., et al. (2012). The effects of heparins on the liver: application of mechanistic serum biomarkers in a randomized study in healthy volunteers. Clin. Pharmacol. Ther. 92 (2), 214–220. doi: 10.1038/clpt.2012.40

42. He, C. Y., Liang, B. B., Fan, X. Y., Cao, L., Chen, R., Guo, Y. J., et al. (2012). The dual role of osteopontin in acetaminophen hepatotoxicity. Acta Pharmacol. Sin. 33 (8), 1004–1012. doi: 10.1038/aps.2012.47

Licence CC BY-NC-ND 3.0

43. Hélène V. (2006). Biologie et cirrhose, Elsevier Masson SAS revue francophone de laboratoires, N°385.

44. Hodgen, G. D., and Sherins, R. J. (1973). Enzymes as markers of testicular growth and development in Rat. Endocrinology 93 (4), 985–989. doi: 10.1210/endo-93- 4-985

45. J. Anguizola, R. Matsuda, O.S. Barnaby, K.S. Hoy, C. Wa, E. DeBolt, M. Koke, D.S. Hage, Review: glycation of human serum albumin, Clin. Chim. Acta 425 (2013) 64–76.

46. J. Christodoulou, P.J. Sadler, A. Tucker, A new structural transition of serum albumin dependent on the state of Cys34. Detection by ^{1}H-NMR spectroscopy, Eur. J. Biochem. 225 (1994) 363–368.

47. Jalan R, Schnurr K, Mookerjee RP, et al. Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality. Hepatology. 2009;50(2):555-564.

48. Johnson PJ, Berhane S, Kagebayashi C, Satomura S, Teng M, Reeves HL, O'Beirne J, et al. Assessment of liver function in patients with hepatocellular carcinoma: a new evidence-based approach-the ALBI grade. J Clin Oncol. 2015;33:550–558.

49. Johnston, Determination of supplier-to-supplier and lot-to-lot variability in glycation of recombinant human serum albumin expressed in Oryza sativa, PLoS ONE 9 (2014) e109893.

50. Joka, D., Wahl, K., Moeller, S., Schlue, J., Vaske, B., Bahr, M. J., et al. (2012). Prospective biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 55 (2), 455–464. doi: 10.1002/hep.24734

51. Kahles, F., Findeisen, H. M., and Bruemmer, D. (2014). Osteopontin: a novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. Mol. Metab. 3 (4), 384–393. doi: 10.1016/j.molmet.2014.03.004

52. Kashiba-Iwatsuki, M., Miyamoto, M., Inoue, M., 1997. Effect of nitric oxide on the ligand-binding activity of albumin. Arch. Biochem. Biophys. 345, 237–242.

53. Kawakami A, Kubota K, Yamada N, et al (2006) Identification and characterization of oxidized human serum albumin. A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions. FEBS J 273:3346–3357 . doi: 10.1111/j.1742- 4658.2006.05341.x

Licence CC BY-NC-ND 3.0

54. Kawakami, A., Kubota, K., Yamada, N., Tagami, U., Takehana, K., Sonaka, I., Suzuki, E., & Hirayama, K. (2006). Identification and characterization of oxidized human serum albumin. A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions. The FEBS Journal, 273(14), 3346–3357.

55. Koelink, P. J., Lamers, C. B., Hommes, D. W., and Verspaget, H. W. (2009). Circulating cell death products predict clinical outcome of colorectal cancer patients. BMC Cancer 9, 88. doi: 10.1186/1471-2407-9-88

56. Kronenberger, B., Wagner, M., Herrmann, E., Mihm, U., Piiper, A., Sarrazin, C., et al. (2005). Apoptotic cytokeratin 18 neoepitopes in serum of patients with chronic hepatitis C. J. Viral Hepat. 12 (3), 307–314. doi: 10.1111/j.1365- 2893.2005.00594.x

57. Ku, N. O., Strnad, P., Bantel, H., and Omary, M. B. (2016). Keratins: biomarkers and modulators of apoptotic and necrotic cell death in the liver. Hepatology 64 (3), 966–976. doi: 10.1002/hep.28493

58. Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. N Engl J Med 2003;349:474-85.

59. Levine R.L., L. Mosoni, B.S. Berlett, E.R. Stadtman, Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (1996) 15036–15040.

60. Li Y, Yan X-P, Chen C, et al (2007) Human serum albumin-mercurial species interactions. J Proteome Res 6:2277–2286 . doi: 10.1021/pr0700403

61. Liyasova, M.S., Schopfer, L.M., Lockridge, O., 2010. Reaction of human albumin with aspirin in vitro: mass spectrometric identification of acetylated lysines 199, 402, 519, and 545. Biochem. Pharmacol. 79, 784–791.

62. Londoño MC, Cárdenas A, Guevara M, et al. MELD score and serum sodium in the prediction of survival of patients with cirrhosis awaiting liver transplantation. Gut. 2007;56:1283–1290.

63. Mac Sween R; Anthony P; Scheur P; et al. (1994). Pathologie of the liver. Edinburgh. Churchill living stone.

64. Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. Hepatology. 2000;31:864–871.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

65. Mao SA, Glorioso JM, Nyberg SL. Liver Regeneration. Transl Res J Lab Clin Med. Avr 2014;163(4):352-62.

66. Martins E.O., T. Drakenberg, Cadmium(II), zinc(II), and copper(II) ions binding to bovine serum albumin. A ^{113}Cd NMR study, Inorg. Chim. Acta 67 (1982) 71–74.

67. Mathurin P, Mendenhall CL, Carithers Jr RL, Ramond MJ, Maddrey WC, Garstide P, et al. Corticosteroids improve short-term survival in patients with severe alcoholic hepatitis (AH): Individual data analysis of the last three randomized placebo controlled double blind trials of corticosteroids in severe AH. J Hepatol 2002 ; 36 : 480-7.

68. Matsushita S., V.T.G. Chuang, M. Kanazawa, S. Tanase, K. Kawai, T. Maruyama, A. Suenaga, M. Otagiri, Recombinant human serum albumin dimer has high blood circulation activity and low vascular permeability in comparison with native human serum albumin, Pharm. Res. 23 (2006) 882–891.

69. McGill, M. R., Sharpe, M. R., Williams, C. D., Taha, M., Curry, S. C., and Jaeschke, H. (2012). The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. J. Clin. Invest. 122 (4), 1574– 1583. doi: 10.1172/JCI59755

70. Medina-Navarro R., G. Durán-Reyes, M. Díaz-Flores, C. Vilar-Rojas, Protein antioxidant response to the stress and the relationship between molecular structure and antioxidant function, PLoS ONE 5 (2010) e8971.

71. Megarbane B, Deye N, Baud F. Toxic hepatitis: Mechanisms of toxicity and specific pharmacological agents. Réanimation. nov 2007;16(7-8):632-42

72. Menon KV, Gores GJ, Shah VH. Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic liver disease. Mayo Clin Proc 2001 ;76 :1021-9.

73. Messori L., A. Balerna, I. Ascone, C. Castellano, C. Gabbiani, A. Casini, C. Marchioni, G. Jaouen, A. Congiu Castellano, X-ray absorption spectroscopy studies of the adducts formed between cytotoxic gold compounds and two major serum proteins, J. Biol. Inorg. Chem. 16 (2011) 491–499.

74. Metushi, I. G., Sanders, C., Acute Liver Study, G., Lee, W. M., and Uetrecht, J. (2014a). Detection of anti-isoniazid and anti-cytochrome P450 antibodies in patients with isoniazid- induced liver failure. Hepatology 59 (3), 1084–1093. doi: 10.1002/hep.26564

Licence CC BY-NC-ND 3.0

75. Mikus, M., Drobin, K., Gry, M., Bachmann, J., Lindberg, J., Yimer, G., et al. (2017). Elevated levels of circulating CDH5 and FABP1 in association with human drug-induced liver injury. Liver Int. 37 (1), 132–140. doi: 10.1111/liv.13174

76. Monacelli F., D. Storace, C. D'Arrigo, R. Sanguineti, R. Borghi, D. Pacini, A.L. Furfaro, M.A. Pronzato, P. Odetti, N. Traverso, Structural alterations of human serum albumin caused by glycative and oxidative stressors revealed by circular dichroism analysis, Int. J. Mol. Sci. 14 (2013) 10694–10709.

77. Mothes, E., Faller, P., 2007. Evidence that the principal CoII-binding site in human serum albumin is not at the N-terminus: implication on the albumin cobalt binding test for detecting myocardial ischemia. Biochemistry 46, 2267–2274.

78. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT, et al. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. PLoS One. 2014;9(1):e85216.

79. Nagumo K., M. Tanaka, V.T.G. Chuang, H. Setoyama, H. Watanabe, N. Yamada, K. Kubota, M. Tanaka, K. Matsushita, A. Yoshida, H. Jinnouchi, M. Anraku, D. Kadowaki, Y. Ishima, Y. Sasaki, M. Otagiri, T. Maruyama, Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases, PLoS ONE 9 (2014) e85216.

80. Naldi M., F.A. Giannone, M. Baldassarre, M. Domenicali, P. Caraceni, M. Bernardi, C. Bertucci, A fast and validated mass spectrometry method for the evaluation of human serum albumin structural modifications in the clinical field, Eur. J. Mass Spectrom. 19 (2013) 491–496.

81. Naldi M., M. Baldassarre, M. Domenicali, F.A. Giannone, M. Bossi, J. Montomoli, T.D. Sandahl, E. Glavind, H. Vilstrup, P. Caraceni, C. Bertucci, Mass spectrometry characterization of circulating human serum albumin microheterogeneity in patients with alcoholic hepatitis, J. Pharm. Biomed. Anal. 122 (2016) 141–147.

82. Naldi M., M. Baldassarre, M. Nati, M. Laggetta, F.A. Giannone, M. Domenicali, M. Bernardi, P. Caraceni, C. Bertucci, Mass spectrometric characterization of human serum albumin dimer: a new potential biomarker in chronic liver diseases, J. Pharm. Biomed. Anal. 112 (2015) 169–175.

83. Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. N Engl J Med 2006;354:731-9

Licence CC BY-NC-ND 3.0

84. O'Brien AJ, Fullerton JN, Massey KA, et al. Immunosuppression in acutely decompensated cirrhosis is mediated by prostaglandin E2. Nat Med. 2014;20(5):518-523.

85. Oettl K, Birner-Gruenberger R, Spindelboeck W, et al. Oxidative albumin damage in chronic liver failure: relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. J Hepatol. 2013;59(5):978-983.

86. Oettl K., G. Marsche, Redox State of Human Serum Albumin in Terms of Cysteine-34 in Health and Disease, 1st ed., Elsevier Inc, 2010.

87. Ouattara, Y. (1999). Étude de l'activité des extraits aqueux de plantes hépatotropes sur le foie de souris soumises à une intoxication algue au tétrachlorure de carbone. Thèse de 3ème cycle en sciences biologiques appliquées, option : physiologie animale.

88. Peters T (1995) Ligand Binding by Albumin. In: All About Albumin. Elsevier, pp 76–132

89. Peters, T., Jr. (Ed.), 1996. All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications. Academic Press, San Diego and London.

90. PetitpasI., C.E. Petersen, C.E. Ha, A.A.Bhattacharya, P.A. Zunszain, J. Ghuman, N.V. Bh agavan, S. Curry Structural basis of albumin-thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 (2003), pp. 6440-6445

91. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. Br J Surg. 1973;60:646–649.

92. Qiu, X., Zhang, Y., Liu, T., Shen, H., Xiao, Y., Bourner, M. J., et al. (2016). Disruption of BSEP function in HepaRG cells alters bile acid disposition and is a susceptive factor to drug-induced cholestatic injury. Mol. Pharm. 13 (4), 1206–1216. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00659

93. Quinlan G.J., G.S. Martin, T.W. Evans, Albumin: biochemical properties and therapeutic potential, Hepatology 41 (2005) 1211–1219.

94. R. Spinella, R. Sawhney, R. Jalan, Albumin in chronic liver disease: structure, functions and therapeutic implications, Hepatol. Int. 10 (2016) 124–132

95. Roche M., P. Rondeau, N.R. Singh, E. Tarnus, E. Bourdon, The antioxidant properties of serum albumin, FEBS Lett. 582 (2008) 1783–1787.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

96. Rovere-Querini, P., Capobianco, A., Scaffidi, P., Valentinis, B., Catalanotti, F., Giazzon, M., et al. (2004). HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. Embo Rep. 5 (8), 825–830. doi: 10.1038/ sj.embor.7400205

97. Rozga M., M. Sokołowska, A.M. Protas, W. Bal, Human serum albumin coordinates Cu(II) at its N-terminal binding site with one picomolar affinity, J. Biol. Inorg. Chem. 12 (2007) 913–918.

98. Sadler, P.J., Tucker, A., Viles, J.H., 2005. Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni2+ and Cu2+ binding site of serum albumins. Comparison with Co2+, Cd2+ and Al3+. FEBS J. 220, 193–200.

99. Sakata, N., Moh, A., Takebayashi, S., 2002. Contribution of superoxide to reduced antioxidant activity of glycoxidative serum albumin. Heart Vessels 17, 22– 29.

100. Sand K, Bern M, Nilsen J, Noordzij H, Sandlie I, Andersen J. Unraveling the interaction between FcRn and albumin: opportunities for design of albumin-based therapeutics. Front Immunol (2015) 5:682. doi:10.3389/ fimmu.2014.00682

101. Schmidt, E. S., and Schmidt, F. W. (1988). Glutamate dehydrogenase: biochemical and clinical aspects of an interesting enzyme. Clin. Chim. Acta 173 (1), 43–55. doi: 10.1016/0009- 8981(88)90356-7

102. Schomaker, S., Warner, R., Bock, J., Johnson, K., Potter, D., Van Winkle, J., et al. (2013). Assessment of emerging biomarkers of liver injury in human subjects. Toxicol. Sci. 132 (2), 276–283. doi: 10.1093/toxsci/kft009

103. Sendzik M, Pushie MJ, Stefaniak E, Haas KL (2017) Structure and Affinity of Cu(I) Bound to Human Serum Albumin. Inorg Chem 56:15057–15065 . doi: 10.1021/acs.inorgchem.7b02397

104. Serlin, D. M., Kuang, P. P., Subramanian, M., O'Regan, A., Li, X., Berman, J. S., et al. (2006). Interleukin-1beta induces osteopontin expression in pulmonary fibroblasts. J. Cell Biochem. 97 (3), 519–529. doi: 10.1002/jcb.20661

105. Sgro C, Clinard F, Ouazir K. Incidence of drug-induced hepatitis injuries: A French population based study. Hepatology 2002;36:451—5.

106. Shaw, C.F., 1989. The protein chemistry of antiarthritic gold(I) thiolates and related complexes. Comments Inorg. Chem. 8, 233–267.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

107. Shen X-C, Liang H, Guo J-H, et al (2003) Studies on the interaction between Ag(+) and human serum albumin. J Inorg Biochem 95:124–130

108. Siberngal S ; Lang F. (2000). Atlas de poche de physiopathologie Ed. Flammarion, Paris. 11 :172-173.

109. Singhal, R., Harrill, A. H., Menguy-Vacheron, F., Jayyosi, Z., Benzerdjeb, H., and Watkins, P. B. (2014). Benign elevations in serum aminotransferases and biomarkers of hepatotoxicity in healthy volunteers treated with cholestyramine. BMC Pharmacol. Toxicol. 15, 42. doi: 10.1186/2050- 6511-15-42

110. Sofie Starckx, Ameesha Batheja, Geert R Verheyen et al. Evaluation of miR-122 and other biomarkers in distinct acute liver injury in rats. Toxicol Pathol 2013;41(5):795-804

111. Sokolowska M, K. Pawlas, W. Bal, Effect of common buffers and heterocyclic ligands on the binding of Cu(II) at the multimetal binding site in human serum albumin, Bioinorg. Chem. Appl. (2010) 7, (Article ID 725153).

112. Sokołowska M, Wszelaka-Rylik M, Poznański J, Bal W (2009) Spectroscopic and thermodynamic determination of three distinct binding sites for Co(II) ions in human serum albumin. J Inorg Biochem 103:1005–1013 . doi: 10.1016/j.jinorgbio.2009.04.011

113. Spinella R., R. Sawhney, R. Jalan, Albumin in chronic liver disease: structure, functions and therapeutic implications, Hepatol. Int. 10 (2016) 124–132.

114. Sugimoto, M., Abe, K., Hayashi, M., Takagi, T., Suzuki, R., Konno, N., et al. (2018). The efficacy of serum cell death biomarkers for diagnosing biliary tract cancer. Sci. Rep. 8 (1), 16997. doi: 10.1038/s41598-018-35278-7

115. Sugio S., a Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, Crystal structure of human serum albumin at 2.5 A resolution, Protein Eng. 12 (1999) 439–446.

116. Sun, F., Chen, Y., Xiang, Y., and Zhan, S. (2008). Drug-metabolising enzyme polymorphisms and predisposition to anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 12 (9), 994–1002.

117. Taguchi K., V.T. Giam Chuang, T. Maruyama, M. Otagiri, Pharmaceutical aspects of the recombinant human serum albumin dimer: structural characteristics, biological properties, and medical applications, J. Pharm. Sci. 101 (2012) 3033–3046.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

118. Taverna M., A.-L. Marie, J.-P. Mira, B. Guidet, Specific antioxidant properties of human serum albumin, Ann. Intensive Care 3 (2013) 4.

119. Temple A., T.Y. Yen, S. Gronert, Identification of specific protein carbonylation sites in model oxidations of human serum albumin, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 17 (2006) 1172–1180.

120. Thulin, P., Nordahl, G., Gry, M., Yimer, G., Aklillu, E., Makonnen, E., et al. (2014). Keratin-18 and microRNA-122 complement alanine aminotransferase as novel safety biomarkers for drug-induced liver injury in two human cohorts. Liver Int. 34 (3), 367–378. doi: 10.1111/liv.12322

121. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. N Engl J Med 2000; 343: 1467-76.

122. Tsai, M. T., Chen, Y. J., Chen, C. Y., Tsai, M. H., Han, C. L., Chen, Y. J., et al. (2017). Identification of potential plasma biomarkers for nonalcoholic fatty liver disease by integrating transcriptomics and proteomics in laying hens. J. Nutr. 147 (3), 293–303. doi: 10.3945/jn.116.240358

123. Turell L., H. Botti, L. Bonilla, M.J. Torres, F. Schopfer, B.A. Freeman, L. Armas, A. Ricciardi, B. Alvarez, R. Radi, HPLC separation of human serum albumin isoforms based on their isoelectric points, J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 944 (2014) 144–151.

124. Van Campenhout, A., Van Campenhout, C., Lagrou, A.R., Moorkens, G., De Block, C., Manuel-y- Keenoy, B., 2006. Iron-binding antioxidant capacity is impaired in Diabetes mellitus. Free Radic. Biol. Med. 40, 1749–1755.

125. Venereau, E., De Leo, F., Mezzapelle, R., Careccia, G., Musco, G., and Bianchi, M. E. (2016). HMGB1 as biomarker and drug target. Pharmacol. Res. 111, 534–544. doi: 10.1016/j.phrs.2016.06.031

126. Wei, X., Wei, H., Lin, W., Hu, Z., and Zhang, J. (2017). Cell death biomarker M65 is a useful indicator of liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis B: a cross-sectional study of diagnostic accuracy. Medicine (Baltimore) 96 (20), e6807. doi: 10.1097/MD.0000000000006807

Licence CC BY-NC-ND 3.0

127. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, et al. United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score Committee. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. Gastroenterology. 2003;124:91–96.

128. Wong SG, Card JW, Racz WJ. The role of mitochondrial injury in bromobenzene and furosemide induced hepatotoxicity. Toxicol Lett. 2000;116(3):171–181. doi: 10.1016/S0378-4274(00)00218-6.

129. Wu T.-W., J. Wu, R.-K. Li, D. Mickle, D. Carey, Albumin-bound bilirubins protect human ventricular myocytes against oxyradical damage, Biochem. Cell Biol. 69 (1991) 683–688.

130. Wu, Y. L., Peng, X. E., Zhu, Y. B., Yan, X. L., Chen, W. N., and Lin, X. (2016b). Hepatitis B virus X protein induces hepatic steatosis by enhancing the expression of liver fatty acid binding protein. J. Virol. 90 (4), 1729–1740. doi: 10.1128/JVI.02604-15

131. Wu, Y. L., Zhu, Y. B., Huang, R. D., Peng, X. E., and Lin, X. (2017). Multiple MicroRNAs ameliorate hepatocyte steatosis and injury by suppressing FABP1 expression. Cell Physiol. Biochem. 44 (6), 2243–2255. doi: 10.1159/ 000486058

132. Yamamoto, K., and Yamada, N. (2016). Identification of a diazinon-metabolizing glutathione S-transferase in the silkworm, Bombyx mori. Sci. Rep. 6, 30073. doi: 10.1038/srep30073

133. Zgirski A., E. Frieden, Binding of Cu(II) to non-prosthetic sites in ceruloplasmin and bovine serum albumin, J. Inorg. Biochem. 39 (1990) 137–148.

134. Zhang, J., Jin, Z., Hu, X. X., Meng, H. M., Li, J., Zhang, X. B., et al. (2017). Efficient two-photon fluorescent probe for glutathione s-transferase detection and imaging in drug-induced liver injury sample. Anal. Chem. 89 (15), 8097– 8103. doi: 10.1021/acs.analchem.7b01659

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Attention, ne supprimez pas le saut de section suivant (page suivante non numérotée)

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Modifications post-traductionnelles de l'albumine comme biomarqueurs de l'atteinte hépatique

La plupart des atteintes hépatiques sont souvent silencieuses, jusqu'à ce qu'une cirrhose décompensée se produise. L'utilisation de stratégies de diagnostic précoce est primordiale pour maintenir les patients dans un état stable et pour retarder la décompensation, et ainsi améliorer la prise en charge médicale. L'albumine (HSA) subit plusieurs modifications post-traductionnelles (PTMs) dans les hépatocytes, et la pertinence clinique de certaines de ces modifications a été étudiée dans les maladies hépatiques avancées.
Dans ces travaux, nous avons montré que les capacités de liaison de certains ligands (SEB-Test), mesurées par spectrométrie de masse à plasma inductif (ICP-MS), sont significativement différentes entre les patients cirrhotiques et les patients sans dysfonctionnement hépatique. Grâce à une approche LC-Triple-TOF, la diminution des capacités de liaison chez les patients cirrhotiques a été mise en parallèle avec la présence d'isoformes de l'HSA significativement plus élevées chez ce type de patients. Des expérimentations animales ont également montré la précocité de survenue de ces modifications de l'HSA au cours d'un dysfonctionnement hépatique chronique.
L'ensemble de nos résultats suggèrent que les modifications les plus importantes de la structure de l'HSA dues à un dysfonctionnement hépatique pourraient être révélées précocement en mesurant la fraction non liée de ligands spécifiques enrichis en sérum.

Mots-clés : Albumine, Cirrhose, PTMs, SEB-Test, ICP-MS, LC-Triple-TOF

Post-translational modifications of albumin as biomarkers of liver injury

Most liver damages are often silent, until decompensated cirrhosis occurs. The use of early diagnostic strategies is essential to maintain patients in a stable condition and to delay decompensation, thus improving the medical care. Albumin (HSA) undergoes several post-translational modifications (PTMs) in hepatocytes and the clinical relevance of some of these modifications has recently been investigated in advanced liver diseases.
Our works demonstrated that the binding capacities of certain ligands (SEB-Test), measured by inductive plasma mass spectrometry (ICP-MS), are significantly different between cirrhotic patients and patients without liver dysfunctions. Using a LC-Triple TOF approach, we also shown that the decrease in the binding capacities in cirrhotic patients is associated with the presence of significantly higher isoforms of HSA. Animal experimentations demonstrated that HSA modifications occur very early during chronic liver dysfunction.
These works suggest that the most significant changes in albumin structure due to liver dysfunction could be revealed by measuring the unbound fraction of specific ligands overload in serum.

Keywords : Albumin, Cirrhosis, PTMs, SEB-Test, ICP-MS, LC-Triple-TOF