

Glycation des protéines

Implications dans le développement du Diabète de type 2

**Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire,
INSERM 907
Faculté de Médecine de Nice**

Glycation

«...Toutes les réactions fixant un sucre à une protéine ou à un peptide, qu'ils forment ou non une liaison glycosidique.

Le produit de la glycation est une glycoprotéine...»

*IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature,
Eur J Biochem, 1986, 159, 1-6*



Glycation enzymatique
→ **Glycosylation**
(glycoprotéines)

Glycation non enzymatique
(protéines glyquées)

Différences entre glycation et glycosylation

- **Glycation**
 - ➔ processus pathologique
- **Glycosylation**
 - ➔ processus physiologique

Glycation non enzymatique

- **Glycation des protéines**
- **Actions cellulaires des produits de glycation**
- **Applications physiopathologiques**

Glycation non enzymatique

Réaction spontanée, connue depuis longtemps dans l'industrie alimentaire.

« brunissement des protéines » : condensation des sucres sur les protéines au cours de la stérilisation des aliments.

- bien décrite par L.C. Maillard (1912) :

« **Réaction de Maillard** » et « **produits de Maillard** ».

Glycation non enzymatique

Identifiée plus récemment chez l'homme :

- **augmentée au cours du diabète sucré (années 60-70)**
- **«physiologique» à un niveau basal (années 70-80)**
- **impliquée dans de nombreuses pathologies (depuis)**
 - **Néphropathies**
 - **Rétinopathies**
 - **Neuropathies (Alzheimer)**

Rapport des références Medline passé de 10 en 1980 à 1600 en 2000

Glycation non enzymatique

La glycation concerne

Toutes les protéines de l'organisme :
circulantes / tissulaires
extracellulaires / intracellulaires

Toutes les molécules comportant des groupements aminés :
ADN
Lipides

Tous les intermédiaires métaboliques, comme ceux de la glycolyse ou de la voie des polyols, peuvent réagir.

La glycation est une réaction :

Générale (*in vivo/in vitro*) - Irréversible et cumulative

Qui procèdent en plusieurs étapes

Glycation non enzymatique

Réactions d'additions qui impliquent :

Composants structuraux :

Groupements aminés d'une protéine

groupement α -aminé de l'acide aminé N-terminal

groupement aminé d'un résidu de la chaîne protéique (ϵ -aminé de lysine, arginine)

Composants énergétiques

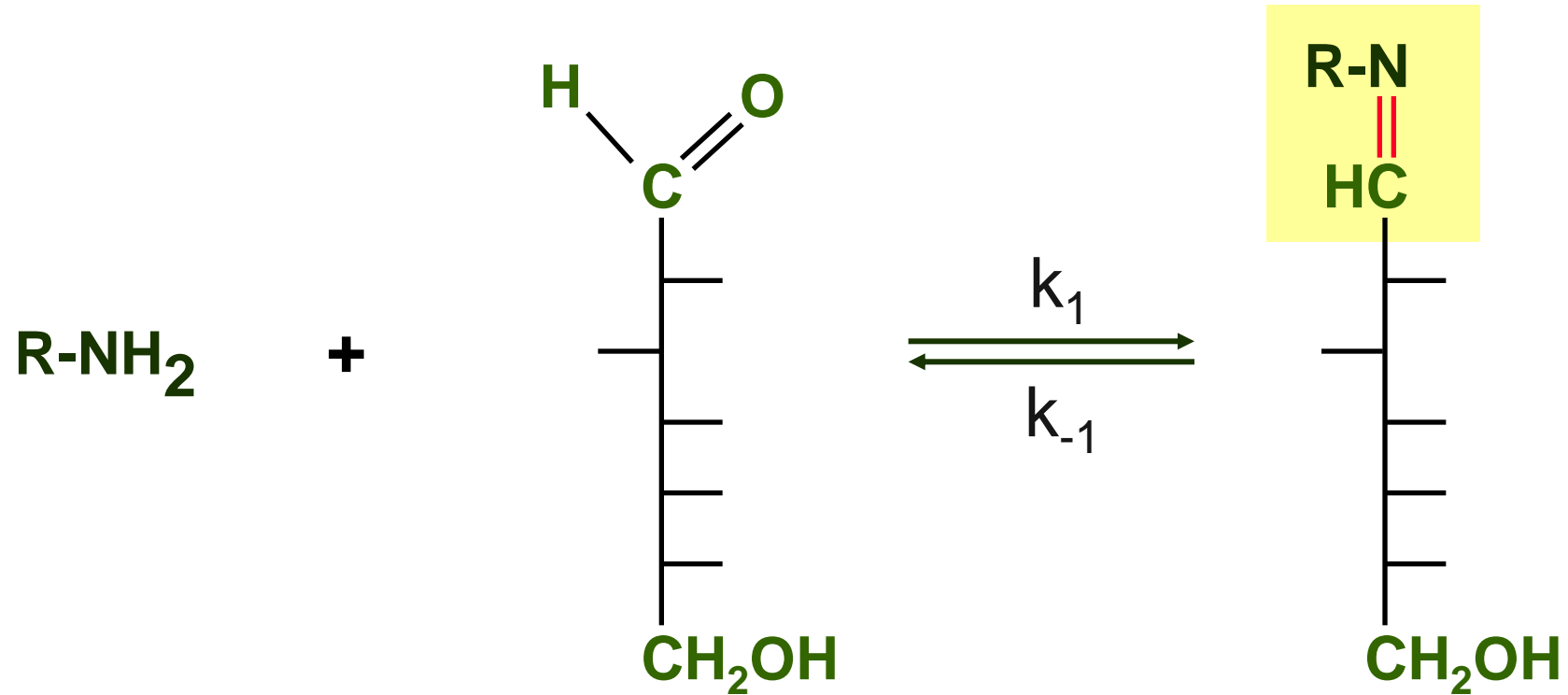
Un ose simple (ou un dérivé d'ose simple)

natif

phosphorylé

oxydé

Glycation: phases précoces

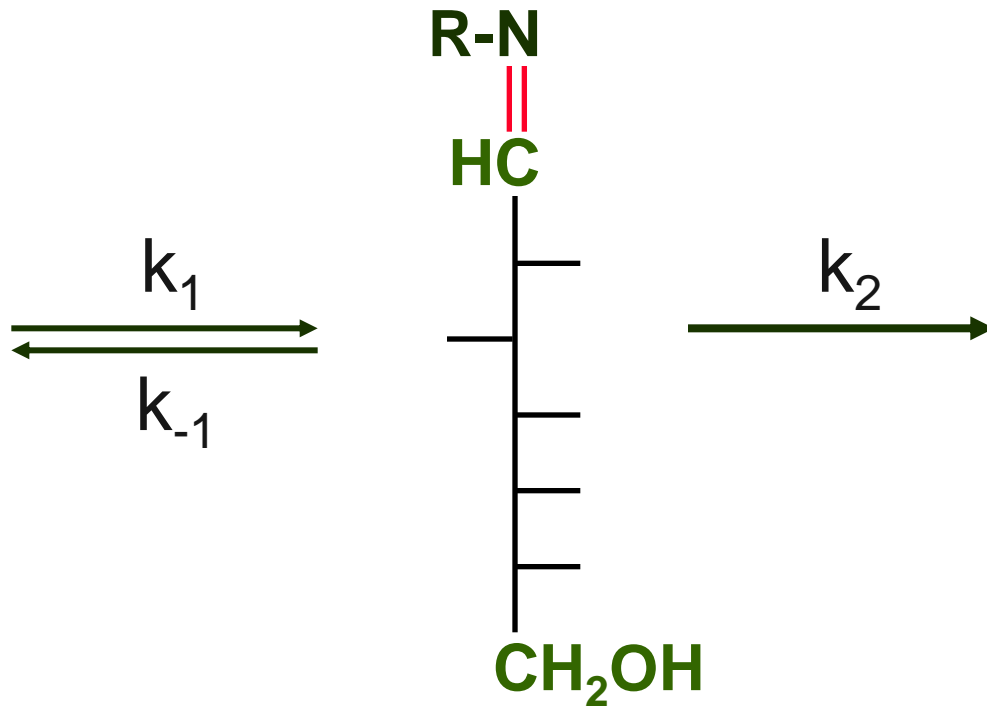


Protéines
Lipides
Ac nucléiques

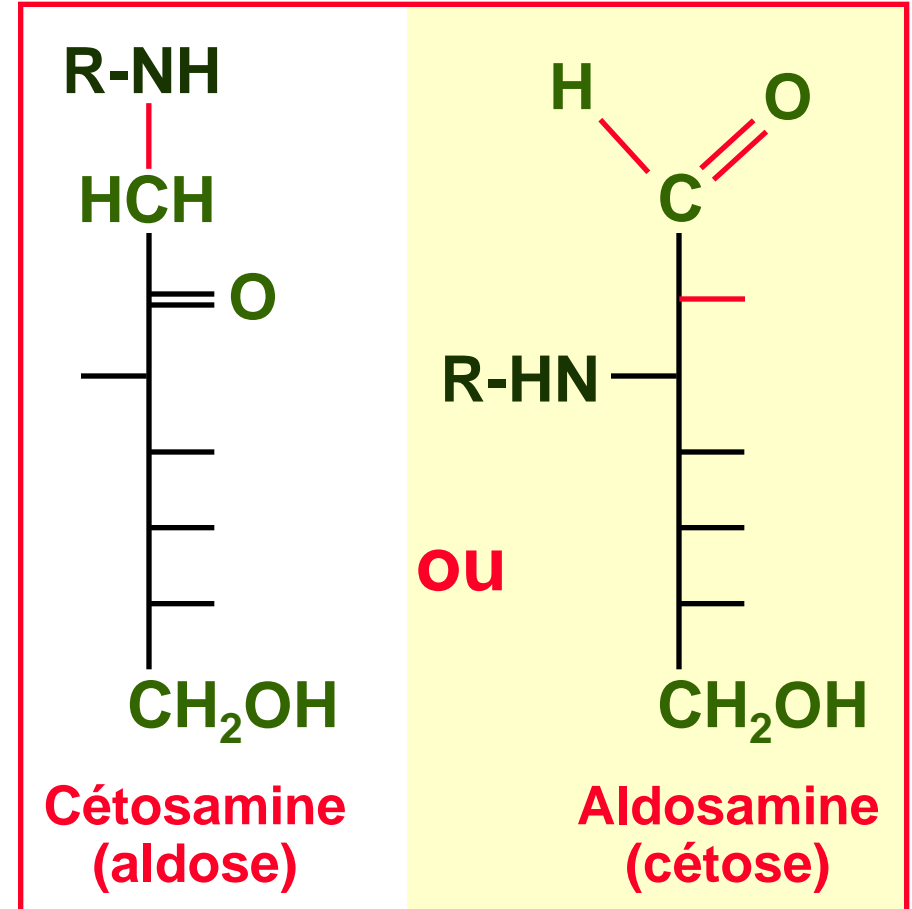
Oses :
aldoses,
(cétoses)

Base de Schiff

Glycation: phases précoces



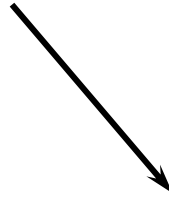
Base de Schiff
(réversible)



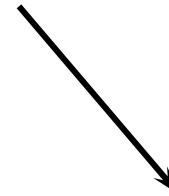
Produit d'Amadori
(irréversible)

Glycation: phases précoces

Produits d'Amadori



Produits intermédiaires de la glycation
(aldéhydes réactifs)



**Oxydations,
clivages,
pontages**

Produits avancés de la glycation
(advanced glycation end products ou AGE,
ou «Produits de Maillard»)

Glycation des protéines

Produits intermédiaires de la glycation

- Formation d'intermédiaires réactifs à partir des produits d'Amadori :
 - (1, 3 et 4)-déoxyglucosones
 - Aldéhydes (glyoxal, méthylglyoxal)

Produits avancés de la glycation

- Clivage de la chaîne peptidique
- Réaction de ces composés et/ou des aldéhydes avec les groupements aminés de protéines → formation de nouveaux adduits
 - Phase de propagation de la glyc(oxyd)ation

Glycation des protéines

Produits précoces de la glycation

Glucose



[Base de Schiff]



**Produits d'Amadori
(fructosamine)**

Transformation

Produits intermédiaires de la glycation

**(1,3 ou 4)-Deoxyglucosone
ou α -céto aldéhydes**

Produits avancés (terminaux) de la glycation

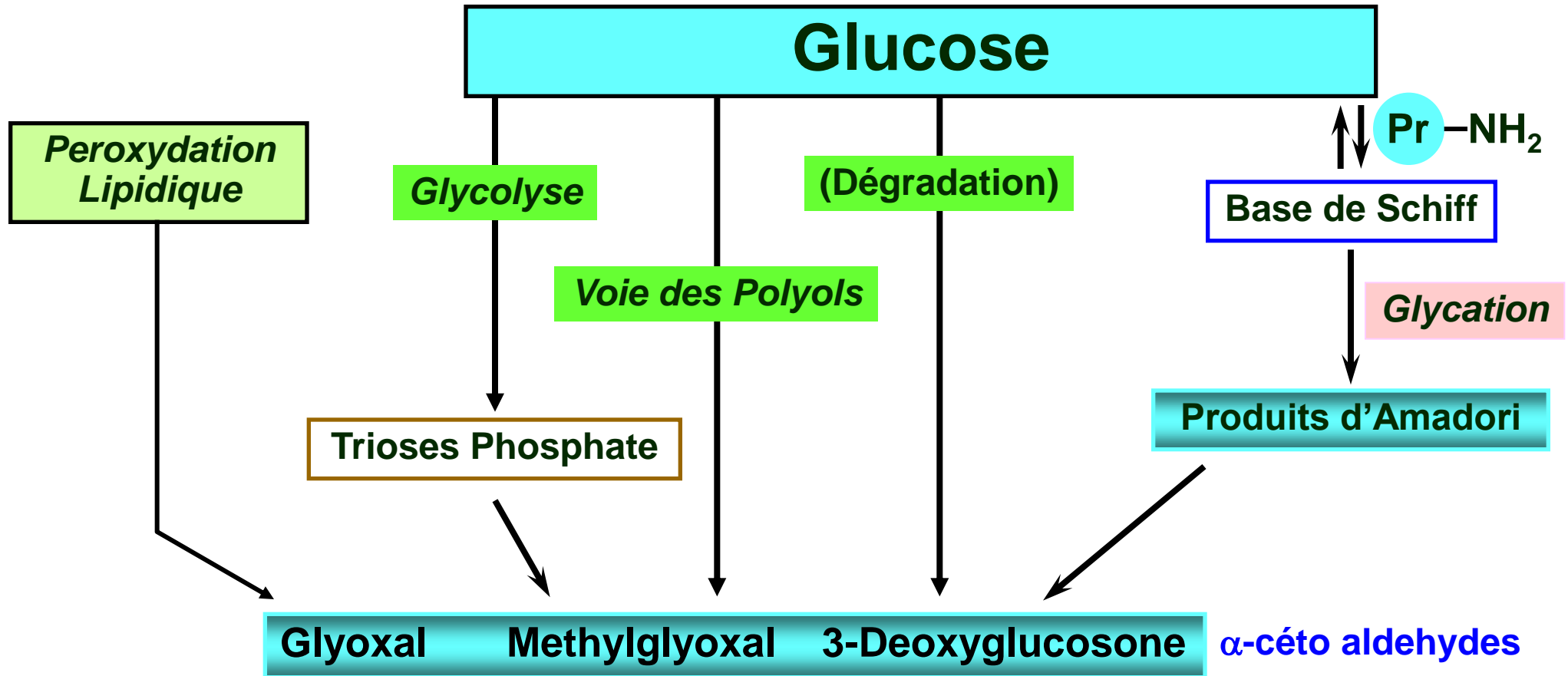
CML

Pyrraline

→ Phase de propagation de la glycation

Glycation: produits intermédiaires

Produits intermédiaires de la glycation : aldéhydes réactifs



Glycation: produits intermédiaires

Produits intermédiaires de la glycation : aldéhydes réactifs

Peroxydation
Lipidique

Voie des Polyols

Dégradation
du glucose

Produits d'Amadori

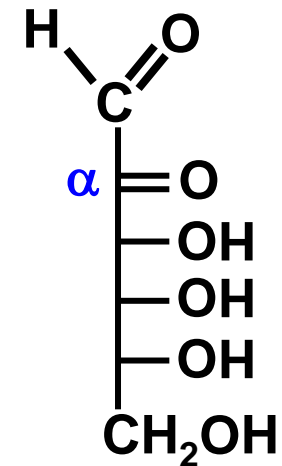
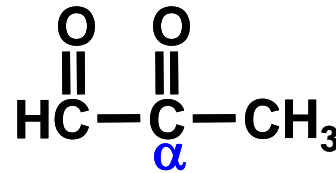
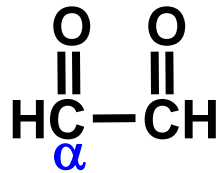
Trioses Phosphate

α -oxoaldehydes

Glyoxal

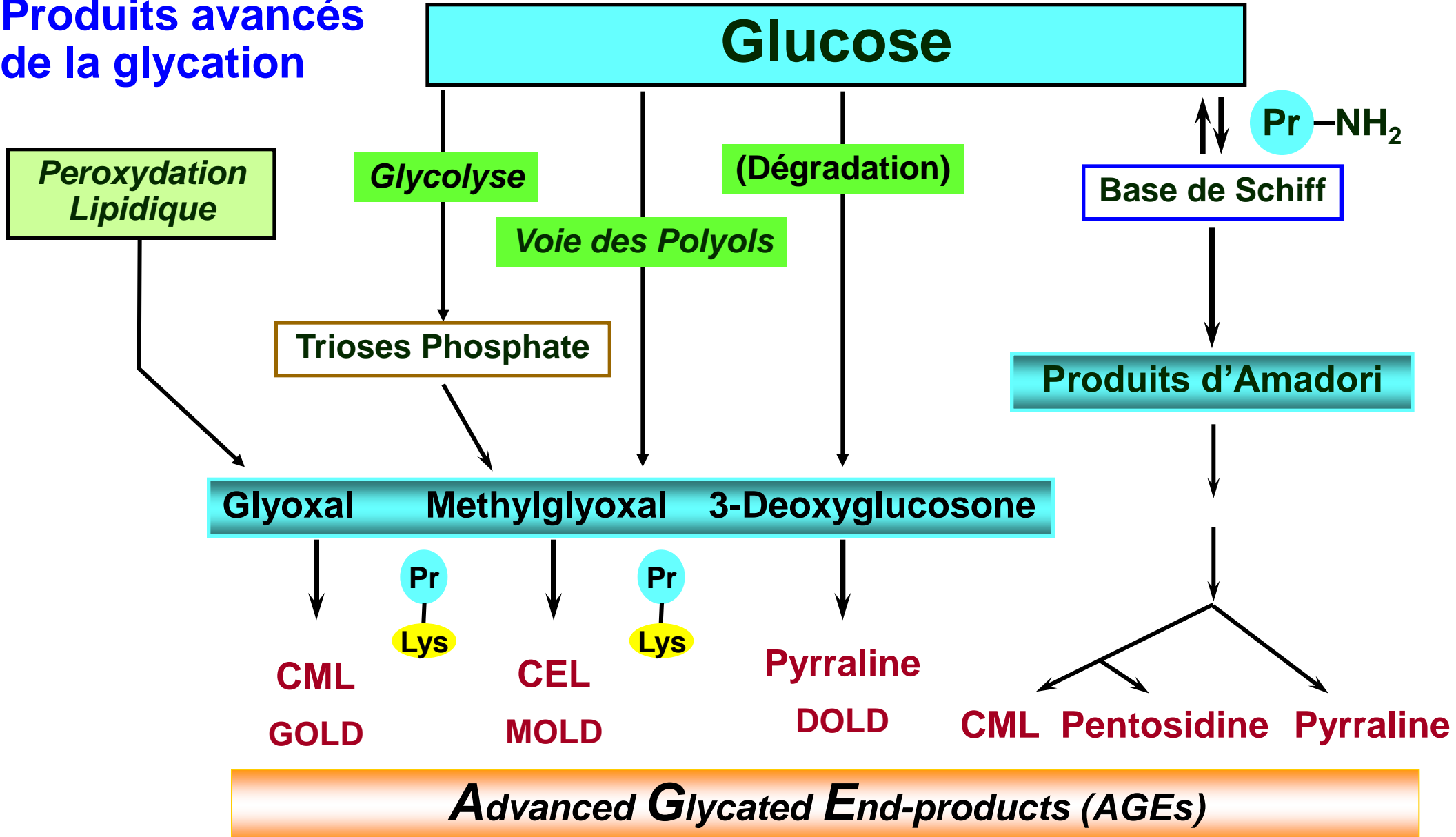
Methylglyoxal

3-Deoxyglucosone



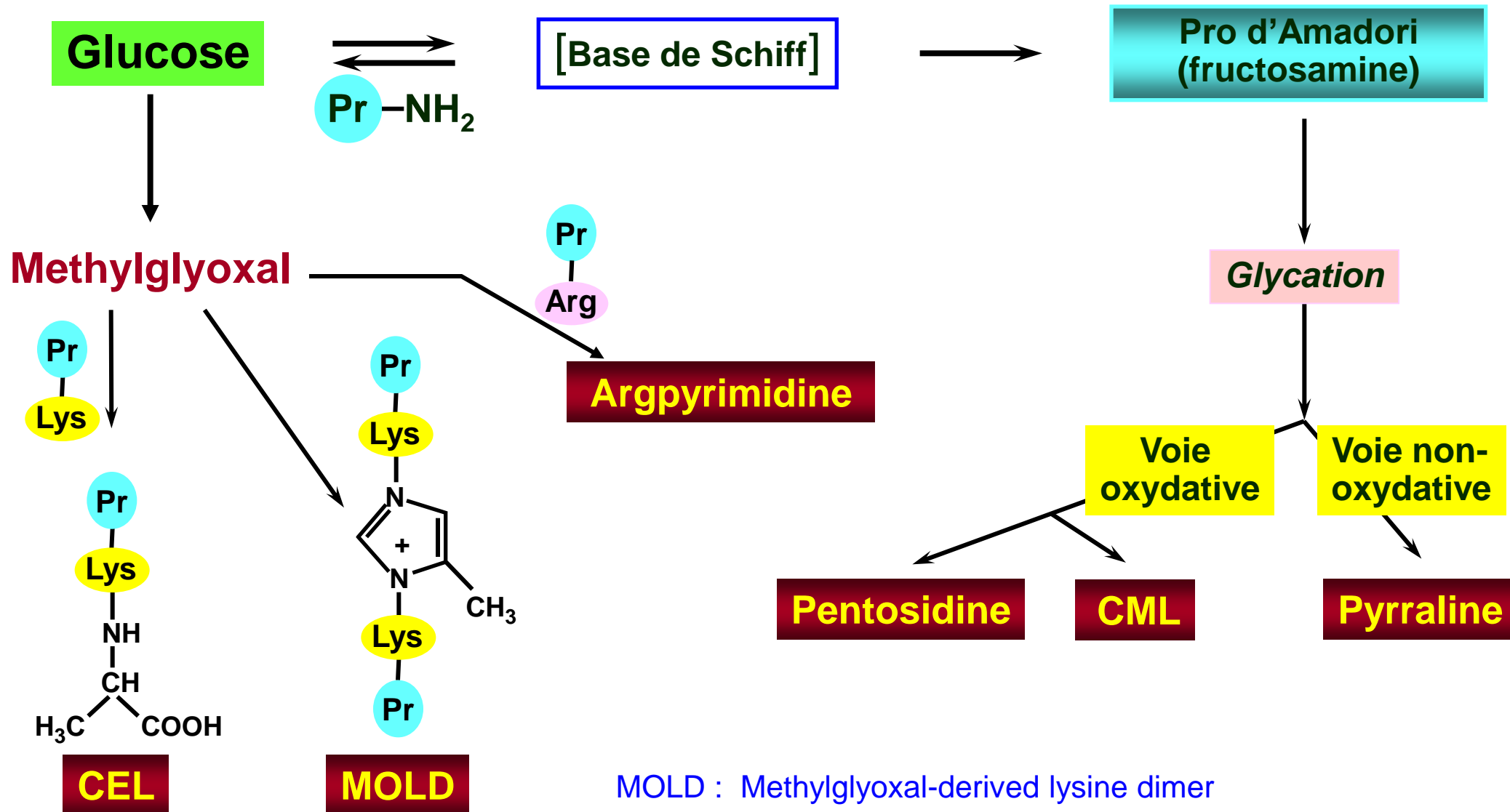
Glycation des protéines

Produits avancés de la glycation



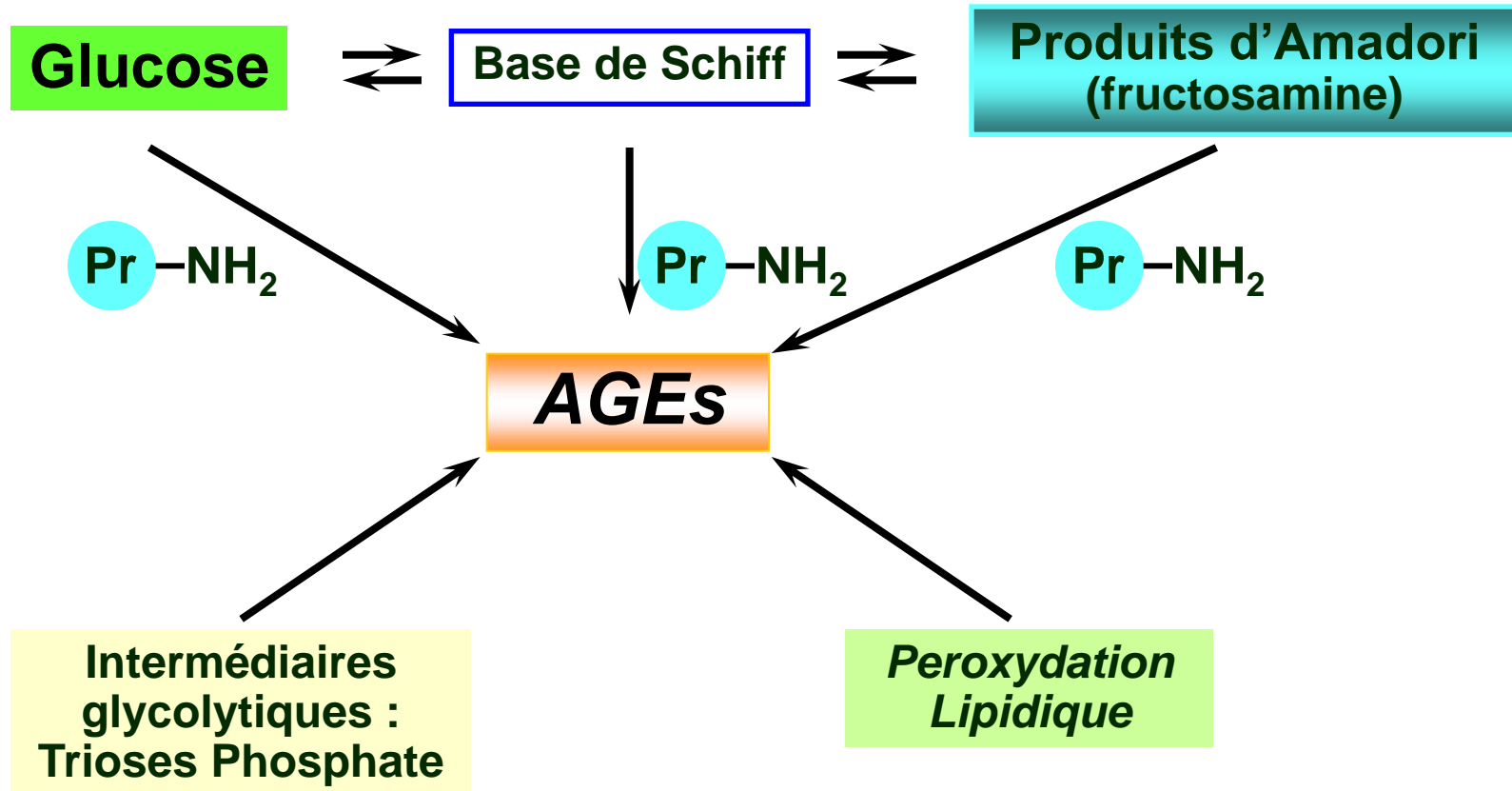
Glycation: Produits avancés de glycation

Produits avancés de la glycation



Glycation: Produits avancés de glycation

Produits avancés de la glycation



Facteurs influant sur les réactions de glycation

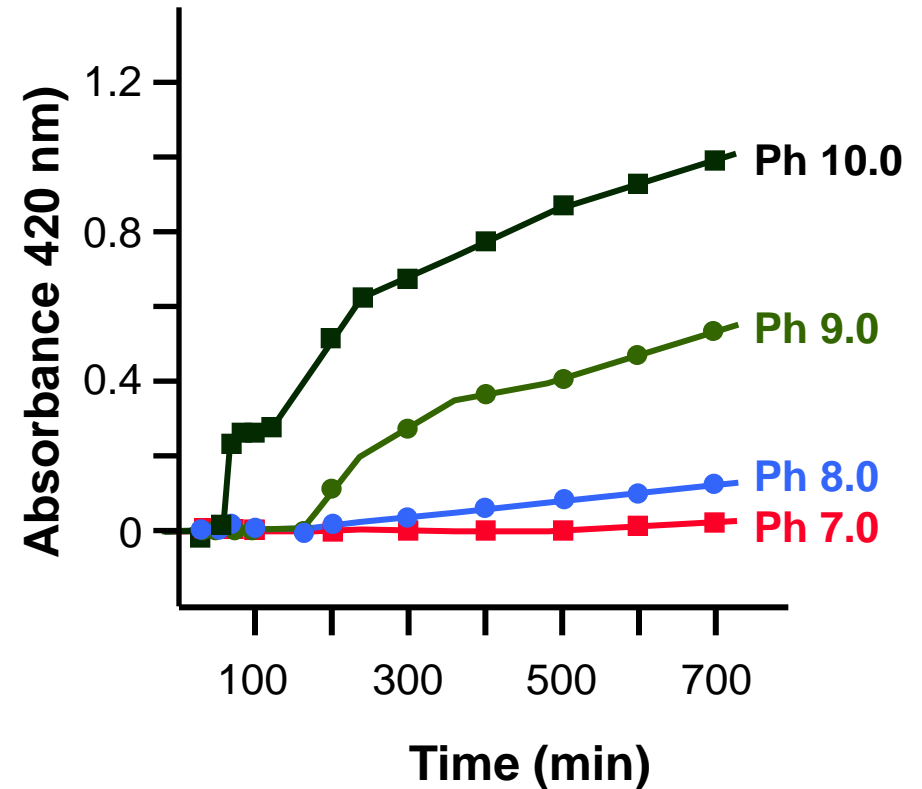
- **Facteurs physico-chimiques**
 - pH
 - Température
- **Facteurs liés à la protéine**
 - Concentration
 - **Durée de vie**
 - Caractères des groupements réactifs
(nombre, accessibilité, environnement)
- **Facteurs liés à l'ose**
 - Nature (glyc1)
 - **Concentration**

Facteurs influant sur les réactions de glycation

Facteurs physico-chimiques : pH

Plus le pH est élevé, plus l'avancement de la réaction est important.

La **nucléophilie** de l'acide aminé ($-NH_3$) augmente fortement quand la basicité du milieu augmente



Sites préférentiels de glycation de l'HbA

β - Val-1

α - Lys-16

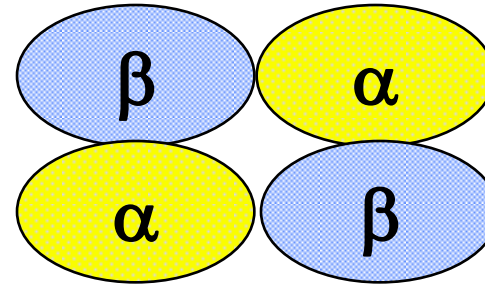
β - Lys-66

β - Lys-17

α - Val-1

α - Lys-7

β - Lys-120



α = 141 acides aminés

β = 146 acides aminés

Glycation sur β -val-1 \rightarrow HbA_{1c}

Réactivité des oses simples

Ose	k_1 ($\times 10^3 \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
Ribose	10,0
Fructose	4,5
Mannose	3,2
Xylose	2,9
Galactose	2,8
Glucose	0,6

Le glucose est l'un des oses les moins réactifs

Origines multiples des AGEs

Les AGEs peuvent être également formés par d'autres voies que la glycation

Similarité des voies métaboliques de la glycation et de la peroxydation lipidique :

Certains « AGE » (CML) peuvent être formés uniquement par oxydation au cours de la peroxydation lipidique, sans glycation préalable

Terme AGEs →

AGEs *stricto sensu*

+

**Autres produits avancés du métabolisme oxydatif
(oxydation, lipoxydation)**

AGEs : produits de glycation

- **Hétérogénéité structurale et métabolique**
- **Signification physiopathologique variable :**
 - **Diabète sucré :**
Hyperglycémie / hyperglycation
 - **Insuffisance rénale et autres pathologies non diabétiques :**
Origine oxydative sans hyperglycation («ALE/AOE»)

Polymorphisme structural et fonctionnel des produits de glycation

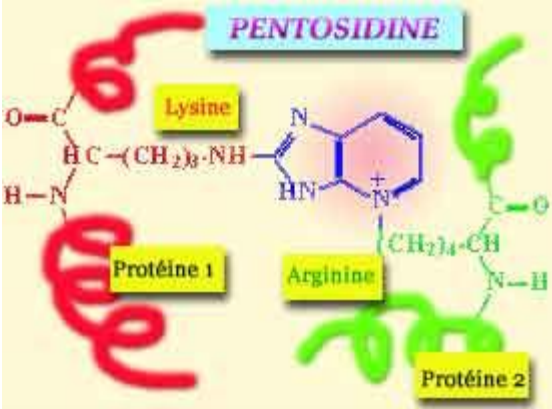
Capacité de formation de liaisons croisées intermoléculaires

- ⇒ Produits "pontants" (pentosidine...)
"non pontants" (CML, pyrraline)

Capacité d'induction de réactions oxydatives (glycoxydation)

- ⇒ Produits "réactifs" (1 et 3 désoxyglucosone, méthylglyoxal)
"non réactifs" (CML, CEL...)

Polymorphisme structural et fonctionnel des produits de glycation

Produits "pontants"	Produits « non pontants »
	<p>Pyrraline</p> <chem>NC(=O)CCCC1=CC=C(CO)C=O</chem>
Produits "réactifs"	Produits « non réactifs »
<p>MG</p> <chem>CC(=O)C=O</chem>	<p>CEL</p> <chem>NC(=O)CCCC(C)C(=O)[O-]</chem>

Glycation non enzymatique

- **Glycation des protéines**
- **Actions cellulaires des produits de glycation**
- **Applications physiopathologiques**

Actions cellulaires des produits de glycation

La glycation génère des radicaux libres oxygénés et favorise le stress oxydant à tous les stades :

- produits d'Amadori**
- produits intermédiaires**
- AGEs**

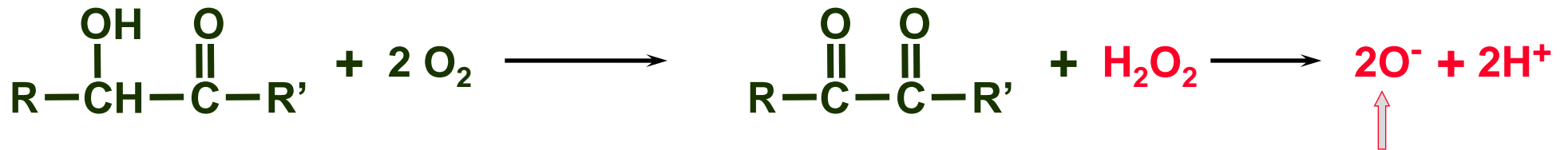
Cette génération du stress oxydant peut se réaliser :

à partir des composés eux-mêmes

par interaction avec d'autres molécules (lipides...)

Glucose et stress oxydant

Production de dérivés réactifs de l'oxygène (ion peroxyde) par autoxydation



Autres dérivés formés : aldéhydes (glyoxal)

Mécanismes complexes impliquant les radicaux libres

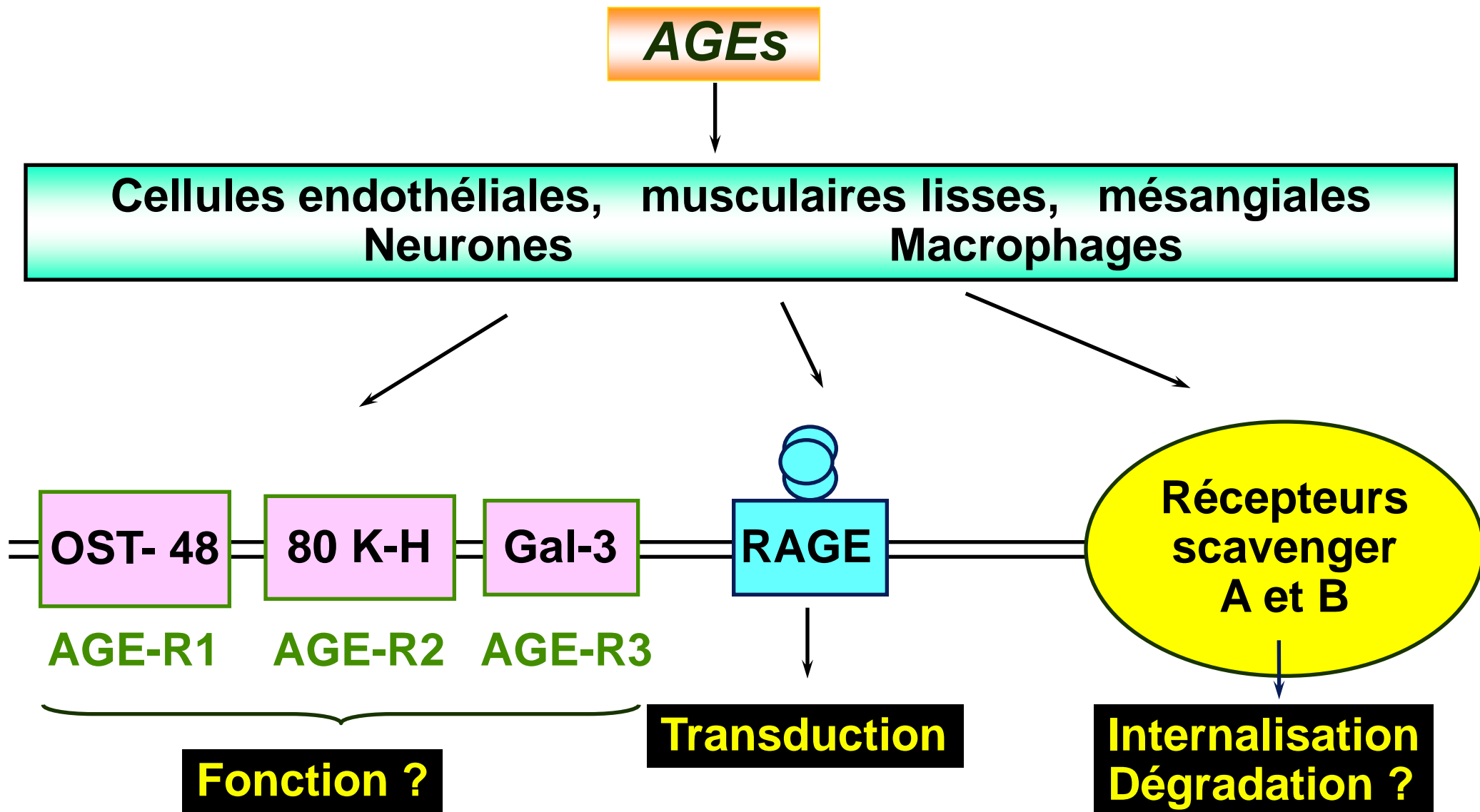
Effets cellulaires propres du glucose

Activation de **PKCβ** (Augmentation de DAG par synthèse *de novo* d'acide phosphatidique à partir du Glycéraldéhyde-3-P)

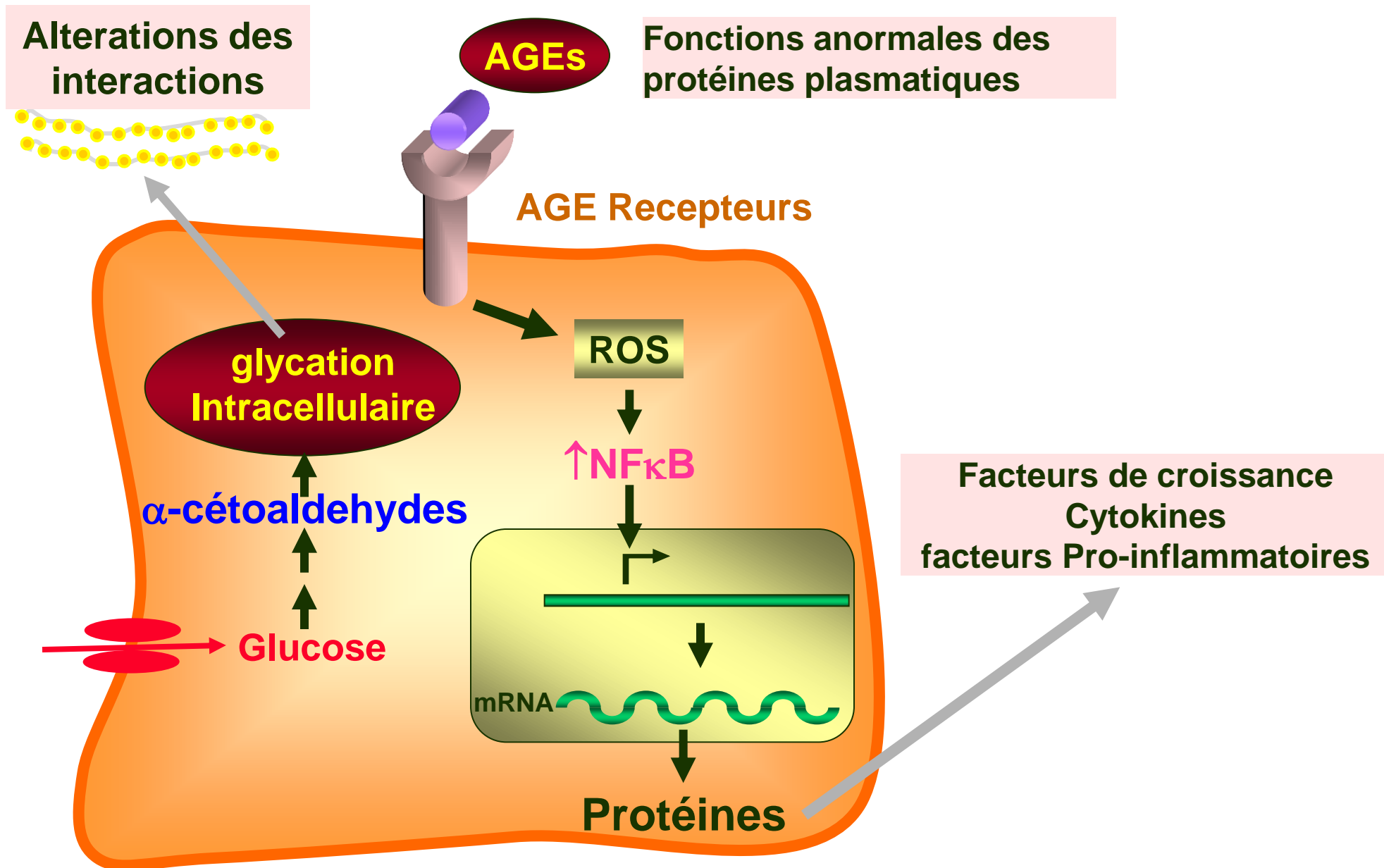


Induction d'un stress oxydant cellulaire → nombreux effets métaboliques (activation transcriptionnelle via NF-κB, apoptose)

Interaction des AGE avec des protéines membranaires

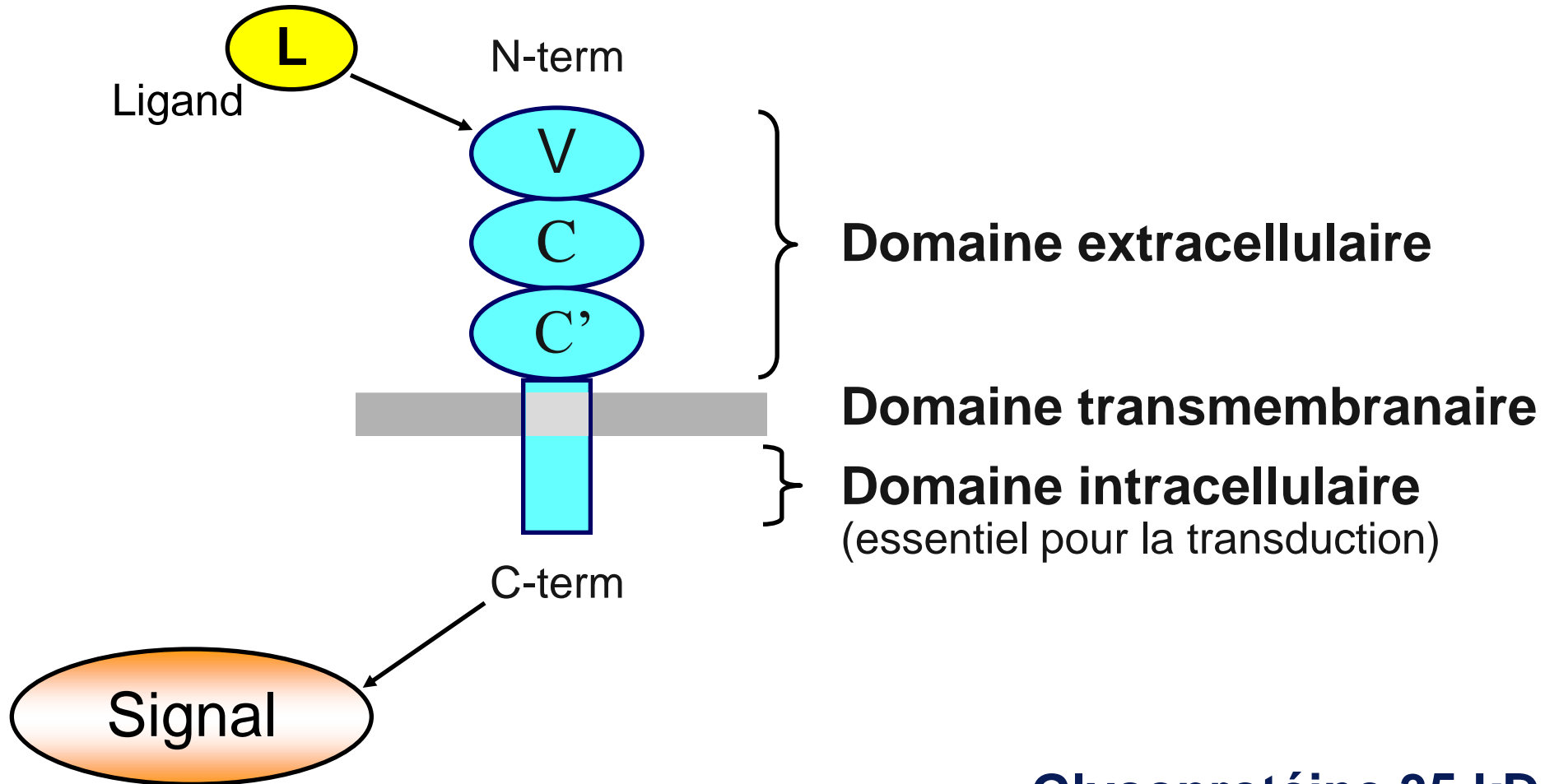


Dommmages cellulaires induits par AGEs



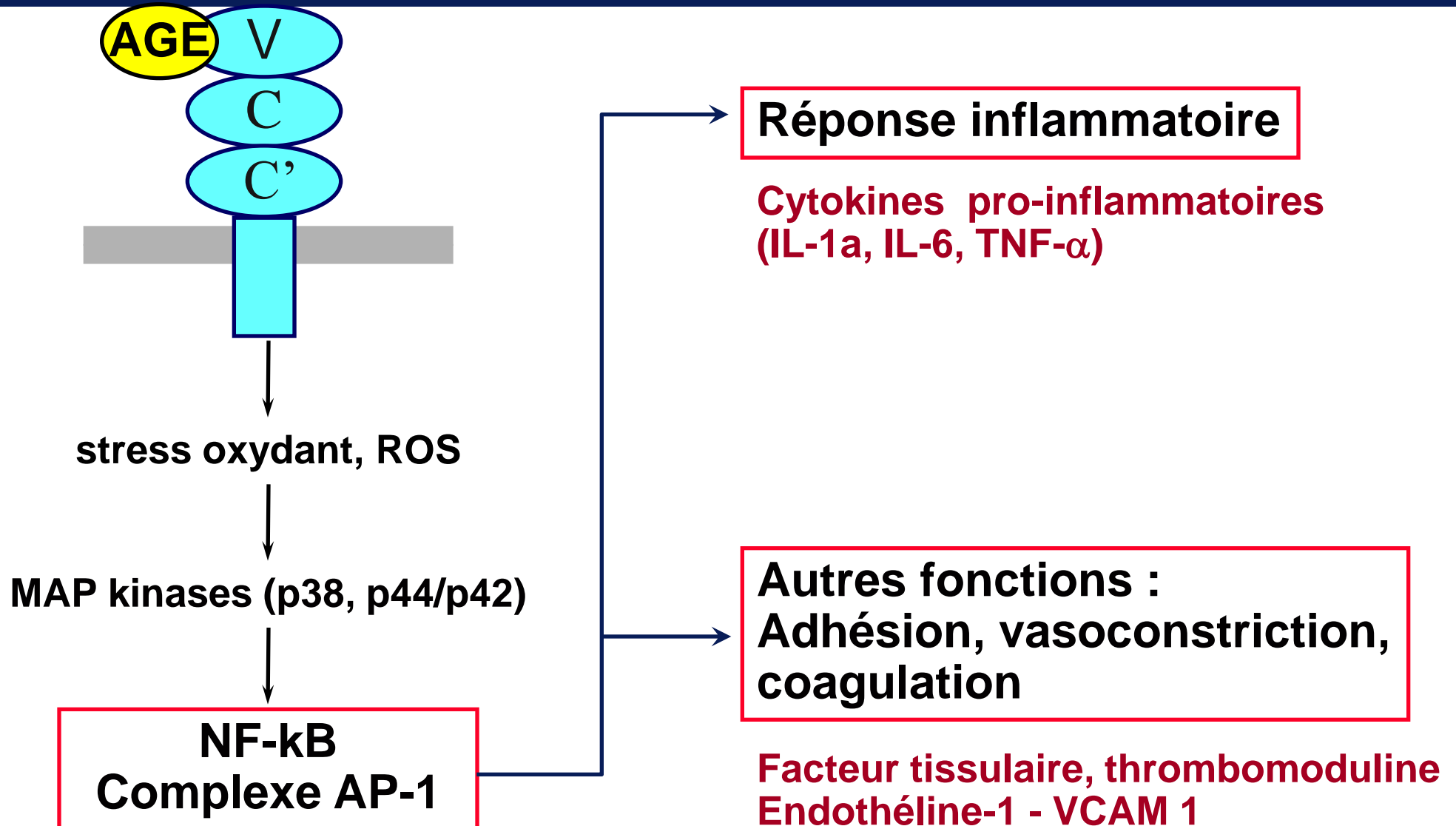
RAGE : Receptor of Advanced Glycation End Products

Cellules endothéliales - Cellules musculaires lisses - Lymphocytes, monocytes
Neurones – PMN – fibroblastes - péricytes

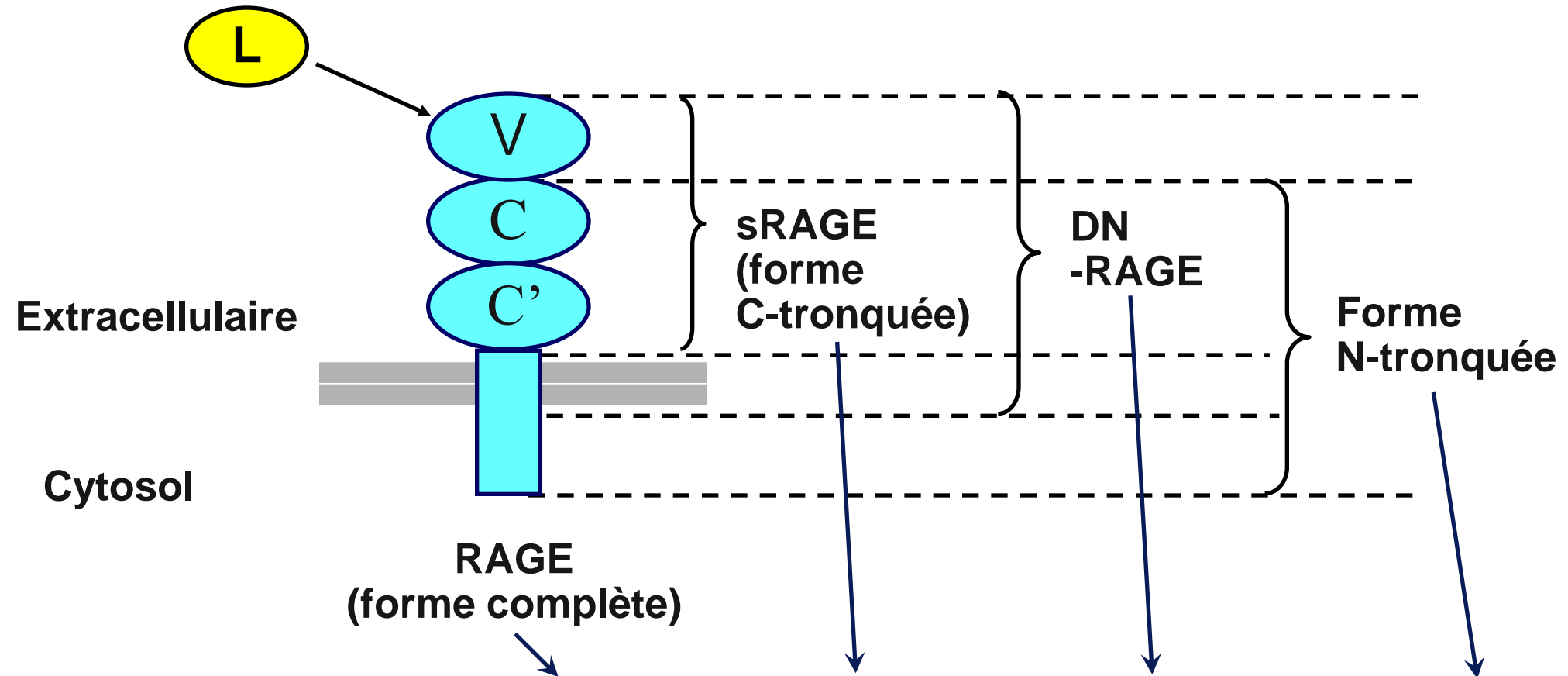


Glycoprotéine 35 kDa

Signalisation déclenchée par l'interaction AGE-RAGE



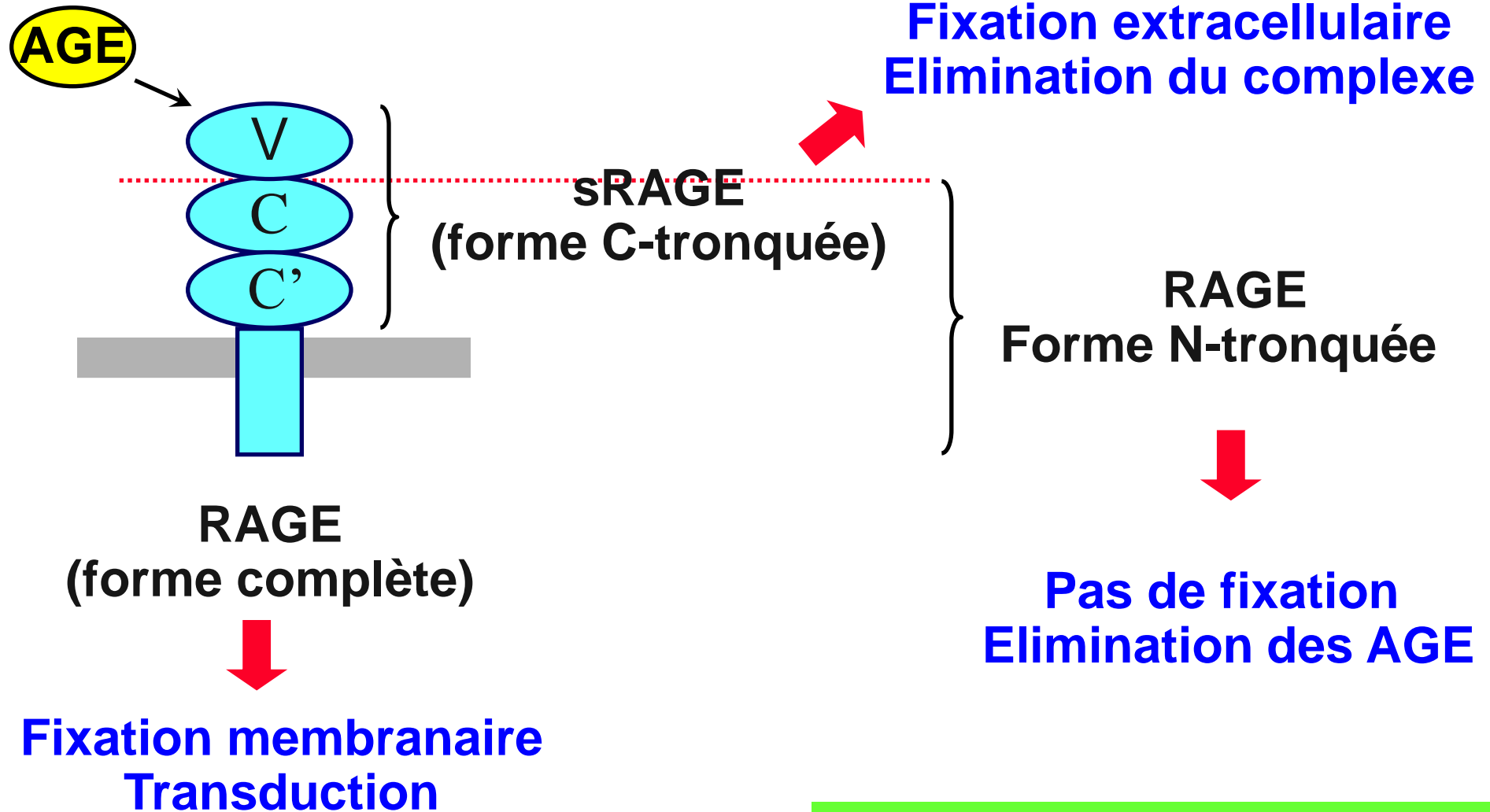
RAGE : domaines fonctionnels



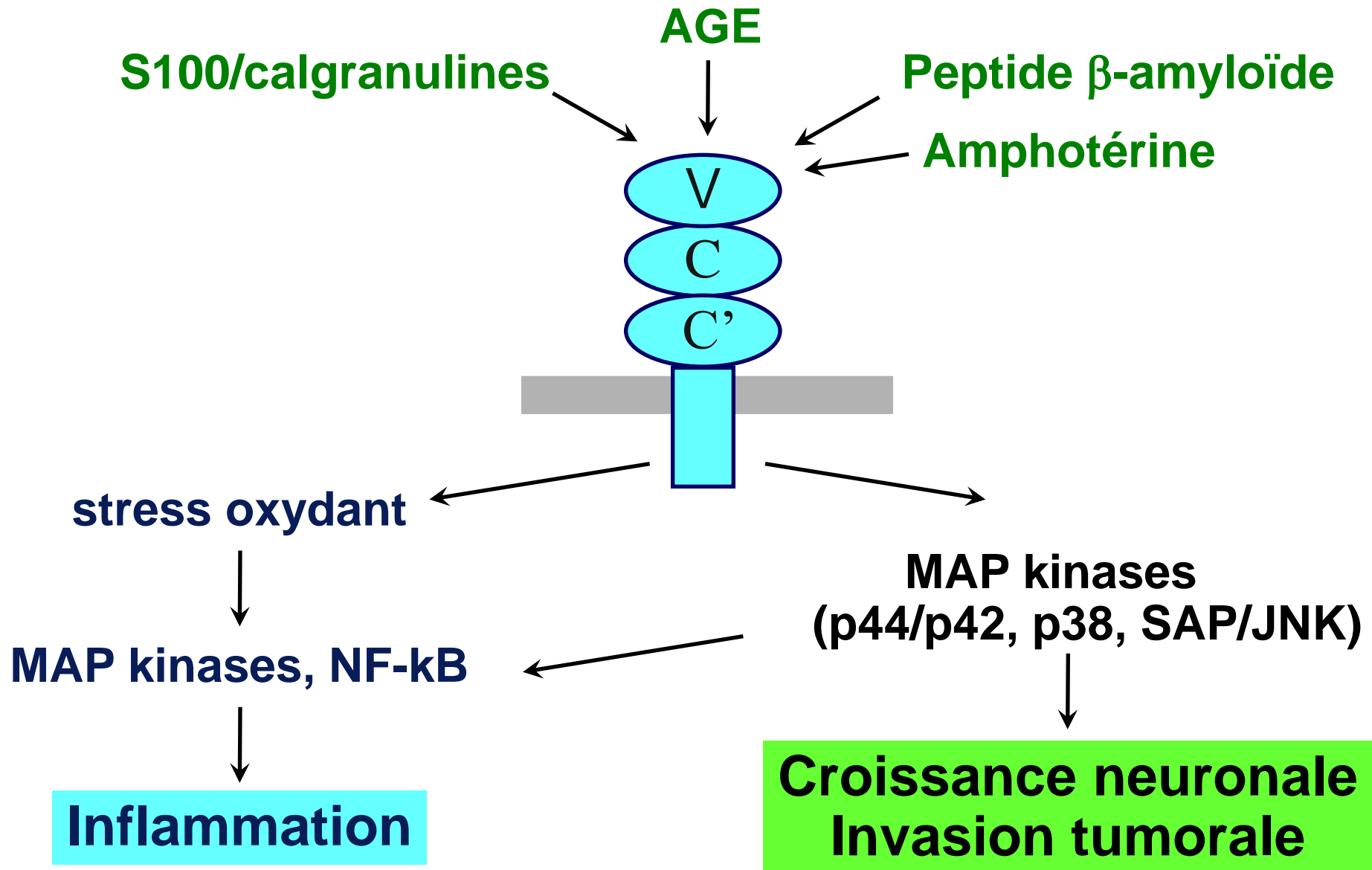
Localisation	Membrane	EC	Membrane	Membrane
Fixation du ligand	+	+	+	-
Transduction	+	-	-	-

RAGE : Régulation par expression différentielle

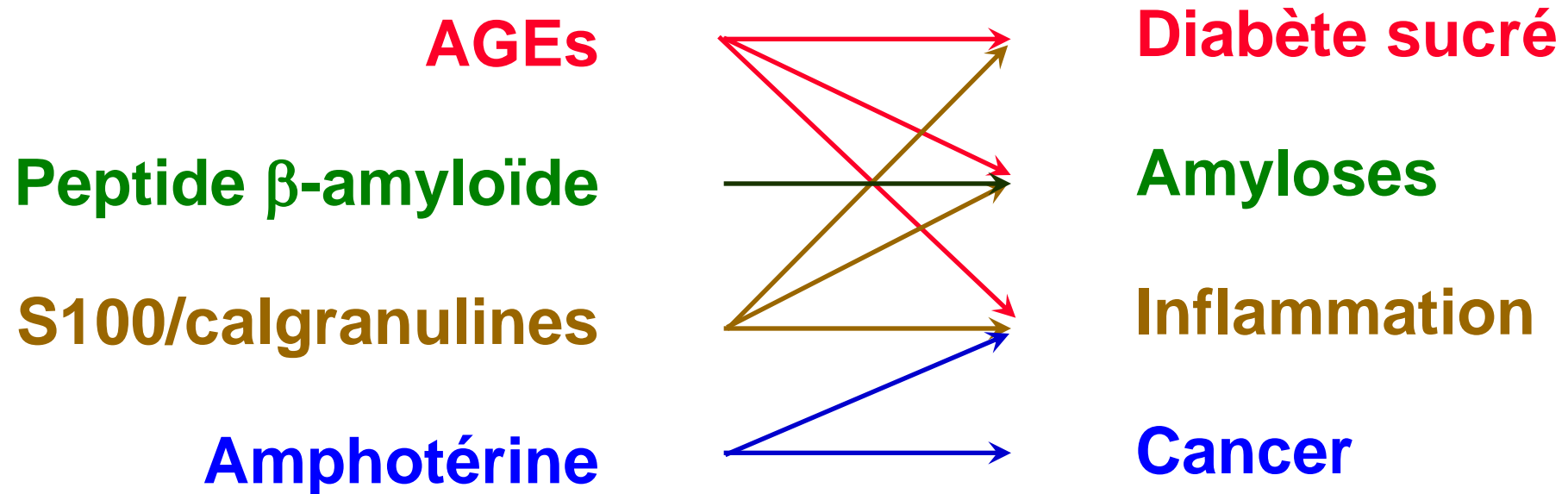
Cellules endothéliales - Péricytes



RAGE : Différents ligands, différents signaux



RAGE « le mal nommé » : un récepteur multi-ligands...



Calgranulines : protéines MRP8 et MRP14 du neutrophilme et qui appartiennent à la famille des protéines S100

...impliqué dans de multiples pathologies

Galectine ou AGE-R3

Membre de la famille des lectines

Interaction avec des résidus lactose/galactose de nombreuses glycoprotéines cellulaires ou matricielles.

Capable d'interactions peptidiques : courte extrémité N-term.

Localisation ubiquiste dans la cellule, elle est sécrétée dans l'espace extracellulaire.

Multiples fonctions

- Régule l'adhésion cellulaire (laminine)
- Module l'inflammation par activation des mastocytes (fixation R-IgE)
- Contrôle de cycle cellulaire (arrêt niveau G1 ou G2/M)
- Contrôle prolifération/mort cellulaire (association avec *Bcl-2*)

Galectine ou AGE-R3

Fixation des AGEs

- Fixation haute affinité de AGE-BSA (cinétique saturable)
- Scatchard plot → une seule classe de site de fixation des AGEs
- Site de fixation localisé en C-term; élimination de N-term → ↑ la fixation
- N'étant pas transmembranaire Gal-3 interagit avec AGE-R1 et AGE-R2.
- Gal-3 est impliquée dans l'endocytose des AGEs et des LDL modifiés (acétylés ou oxydés)
- Ces AGEs internalisés sont orientés vers une phase de dégradation

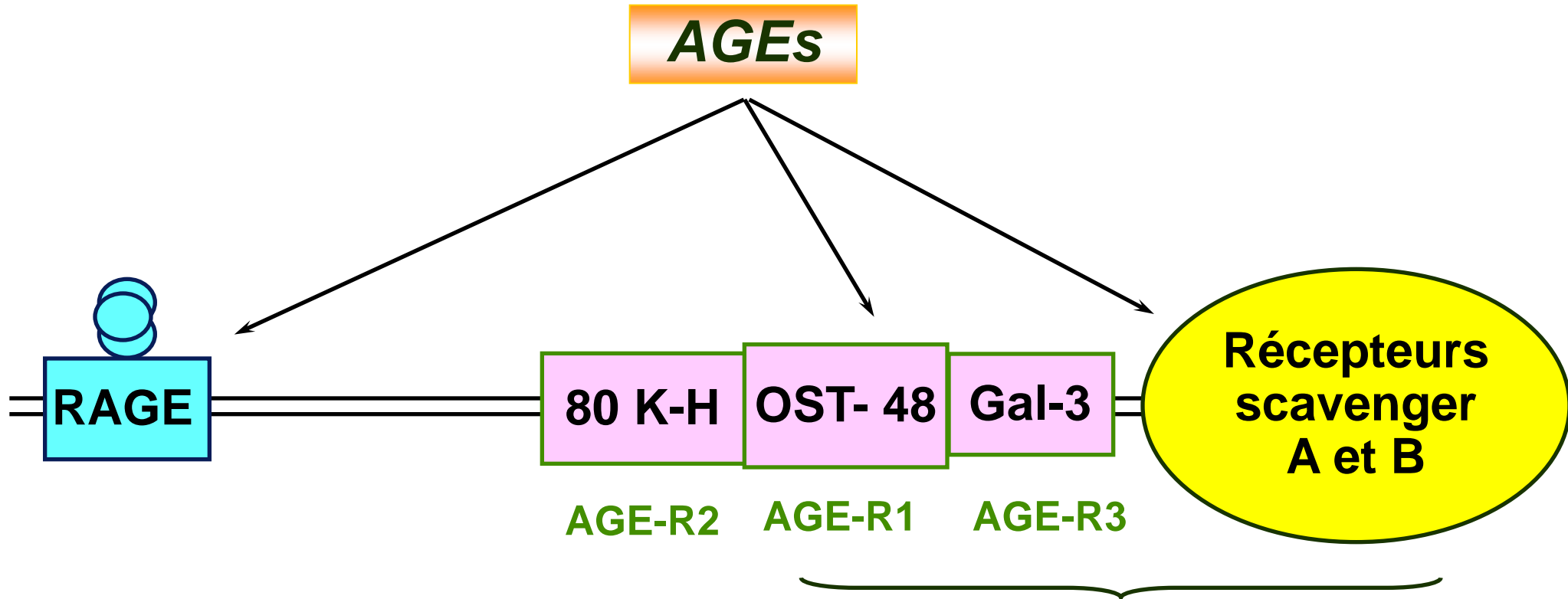
Les voies de signalisation dépendantes de Gal-3 n'ont toujours pas été identifiées.

Invalidation génique

Accumulation des AGEs

Accélération de la glomérulopathie diabétique

Association fonctionnelle des récepteurs membranaires des AGEs



**Transduction
NF-kB ; Stress oxydant**

**Internalisation
Dégradation**

Galectine ou RAGE-3

Mécanismes de protection des effets délétères des AGEs par Gal-3

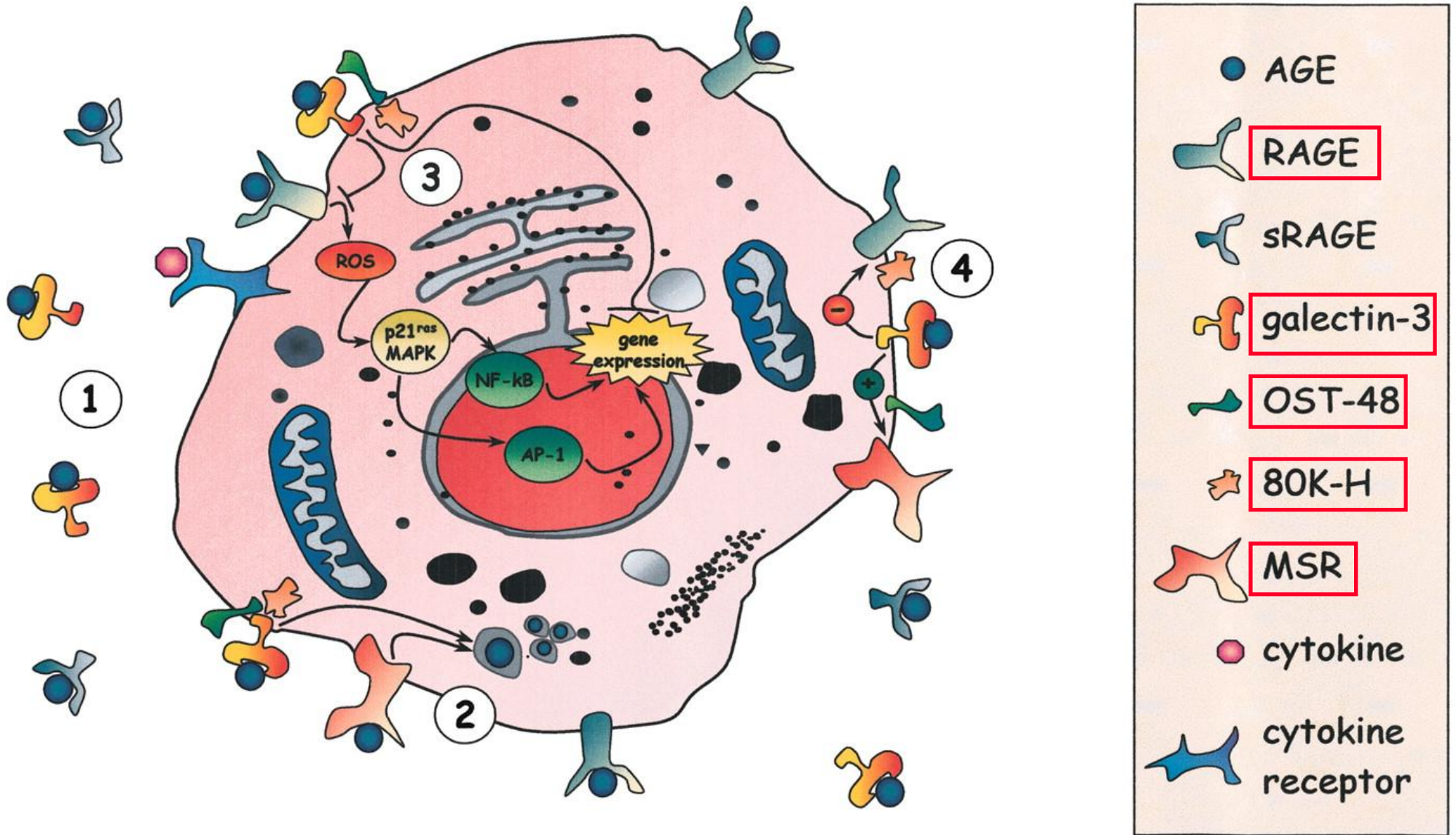
Effets directs de Gal-3

1. Fixation des AGEs sur GAL-3 sécrété (fonctionne comme RAGE soluble, en diminuant la quantité d'AGEs)
2. Fixation des AGEs sur GAL-3, endocytose des complexes et dégradation
3. Fixation des AGEs sur GAL-3, activation de voies de signalisation altérant soit l'activité de RAGE où les intervenants en aval de RAGE

Effets indirects de Gal-3

4. Modulation de l'expression des autres récepteurs de AGEs, en particulier de ceux impliqués dans la dégradation de AGE (récepteurs scavenger, OST-48) et en réduisant l'expression des récepteurs impliqués dans l'activation du stress oxydant et/ou des facteurs de transcription de l'inflammation

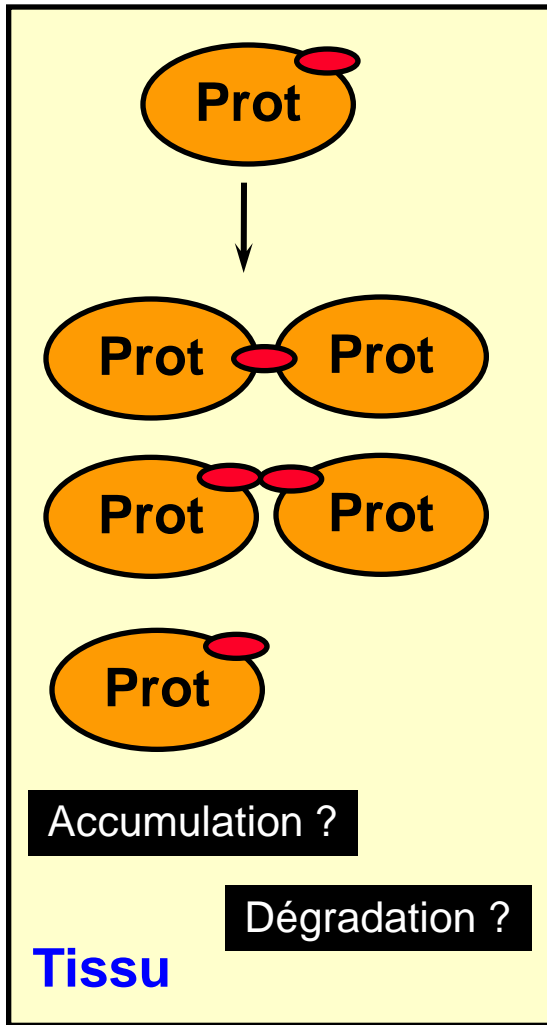
Galectine ou RAGE-3



MSR: macrophage scavenger receptor

Glycation non enzymatique

- **Glycation des protéines**
- **Actions cellulaires des produits de glycation**
- **Applications physiopathologiques**

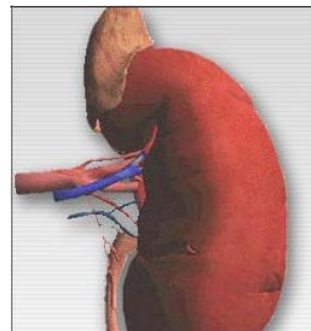
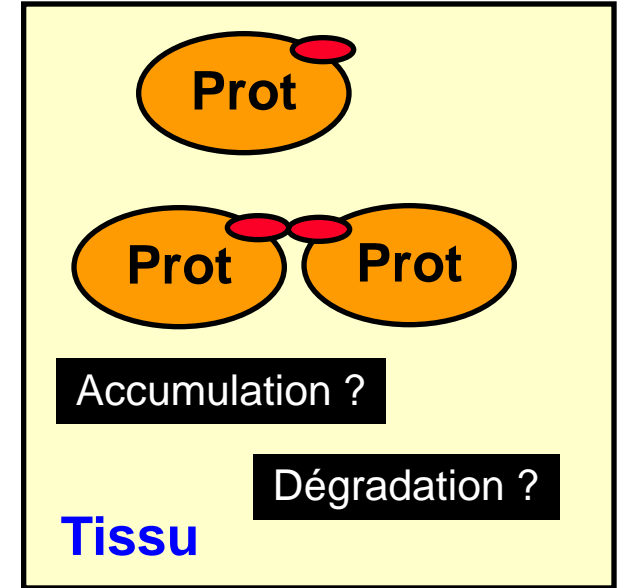
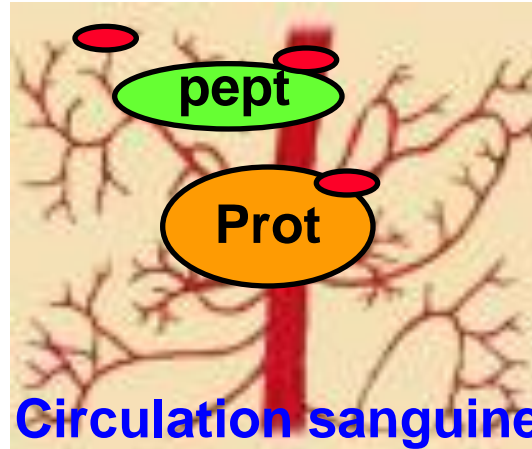


Produits de glycation
in vivo (●)



Dégradation ?

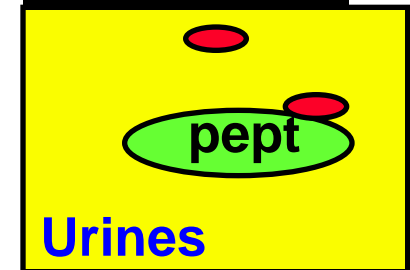
Foie



Dégradation ?

Reins

Elimination



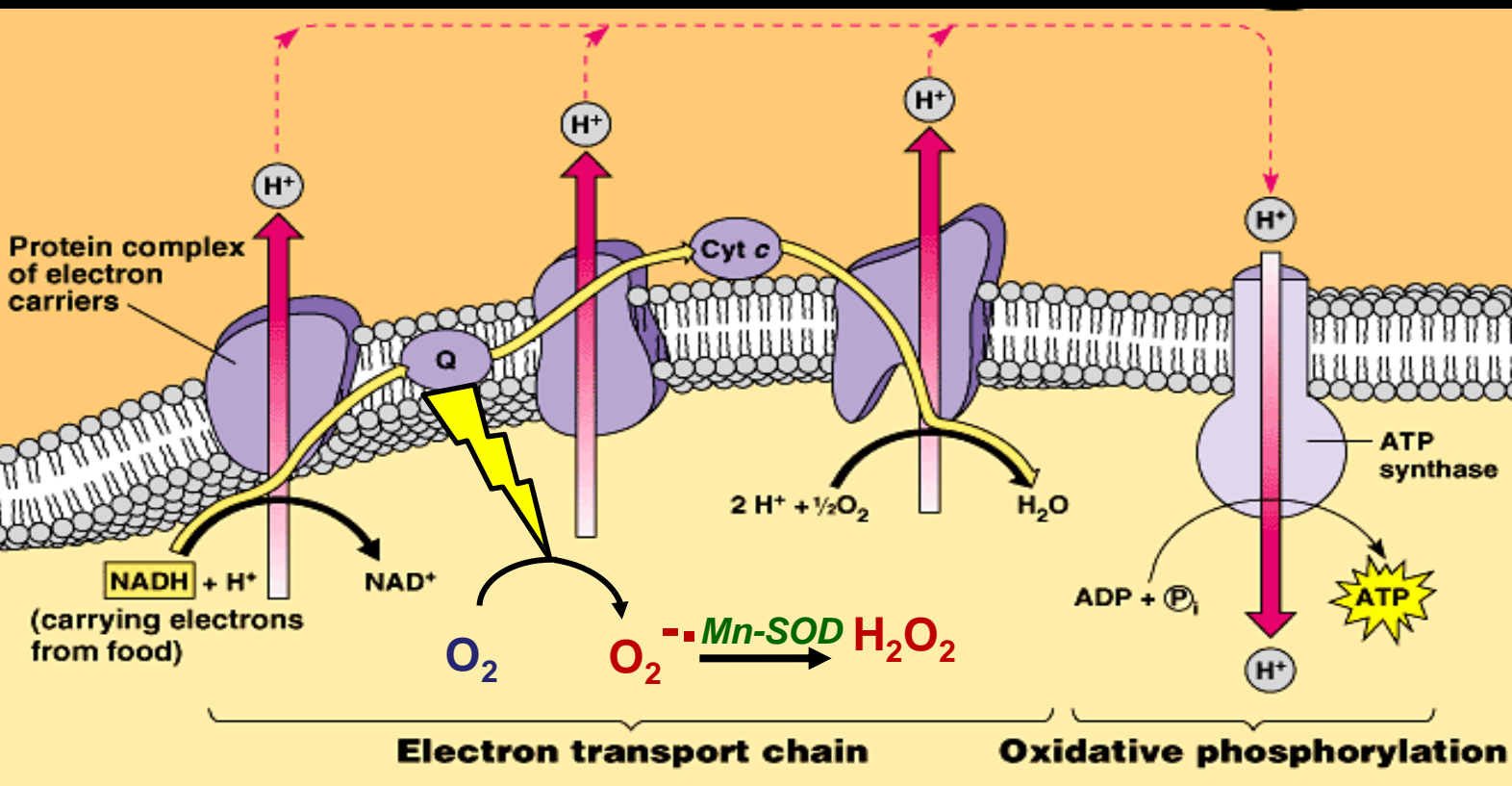
GLUCOTOXICITE

L'Hyperglycémie aiguë **stimule** la sécrétion d'insuline

L'Hyperglycémie chronique **diminue** la sécrétion de l'insuline

- Modification de l'affinité et du nombre de récepteurs GLUT 2 de la cellule β
- Développement d'un stress endoplasmique → surproduction d'insuline
- Production de radicaux libres (ROS)
- **Accumulation d'AGE**
 - A court terme → prolifération des cellules β
 - A long terme → apoptose des cellules β

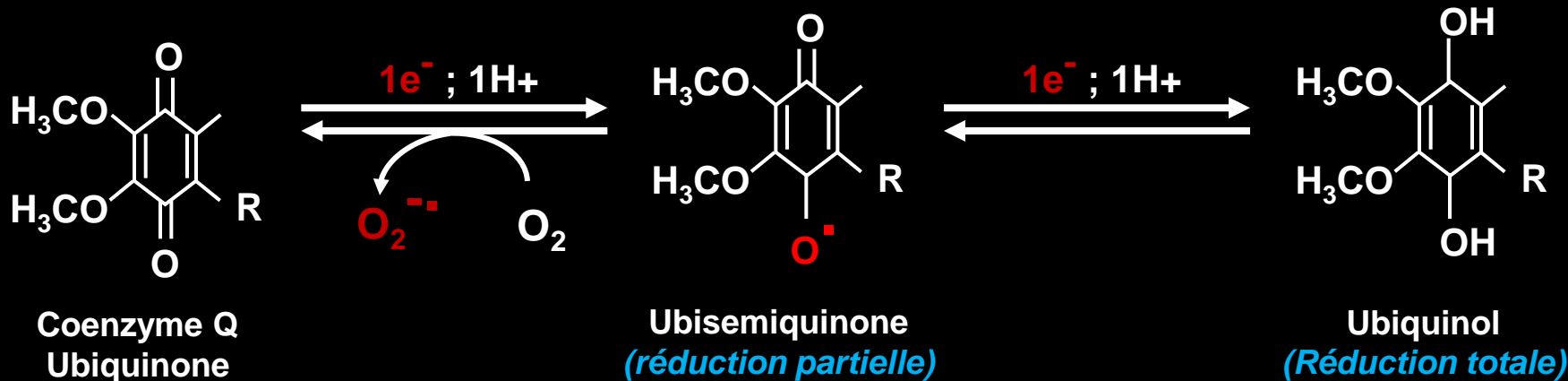
GLUCOTOXICITE



EIM

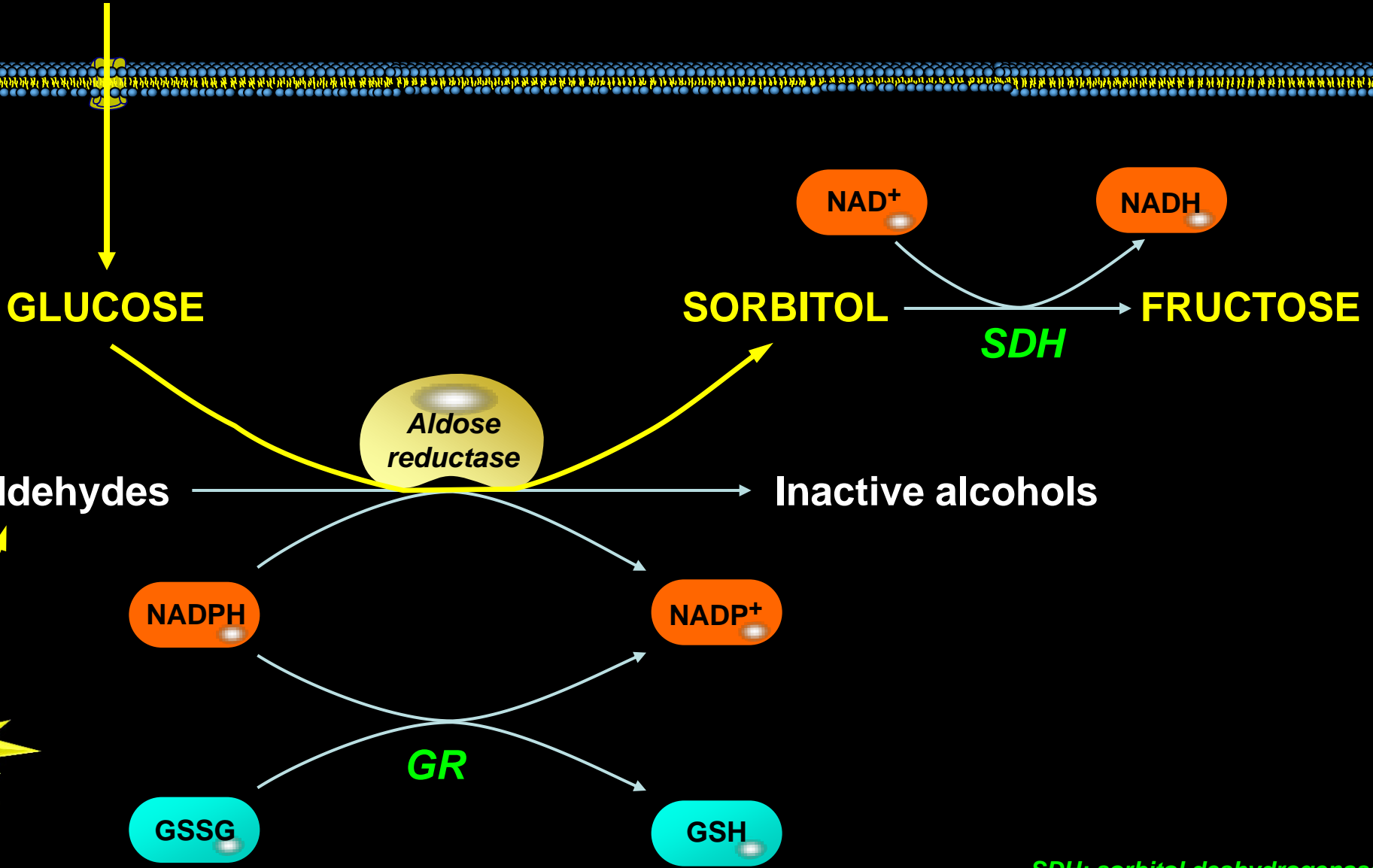
MMI

Matrice mitochondriale



POLYOL PATHWAY

HIGH
GLUCOSE

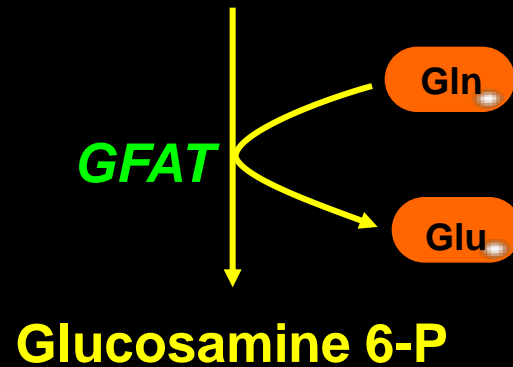
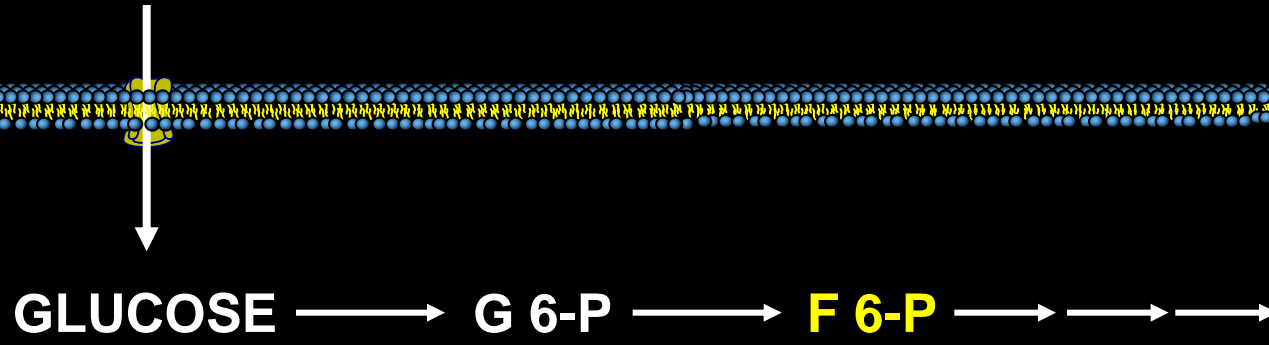


SDH: sorbitol deshydrogenase

GR: Glutathion reductase

HEXOSAMINE PATHWAY

HIGH
GLUCOSE



Glucosamine 6-P

UDP-NacGluc **OGT**

TGF-β
PA-1

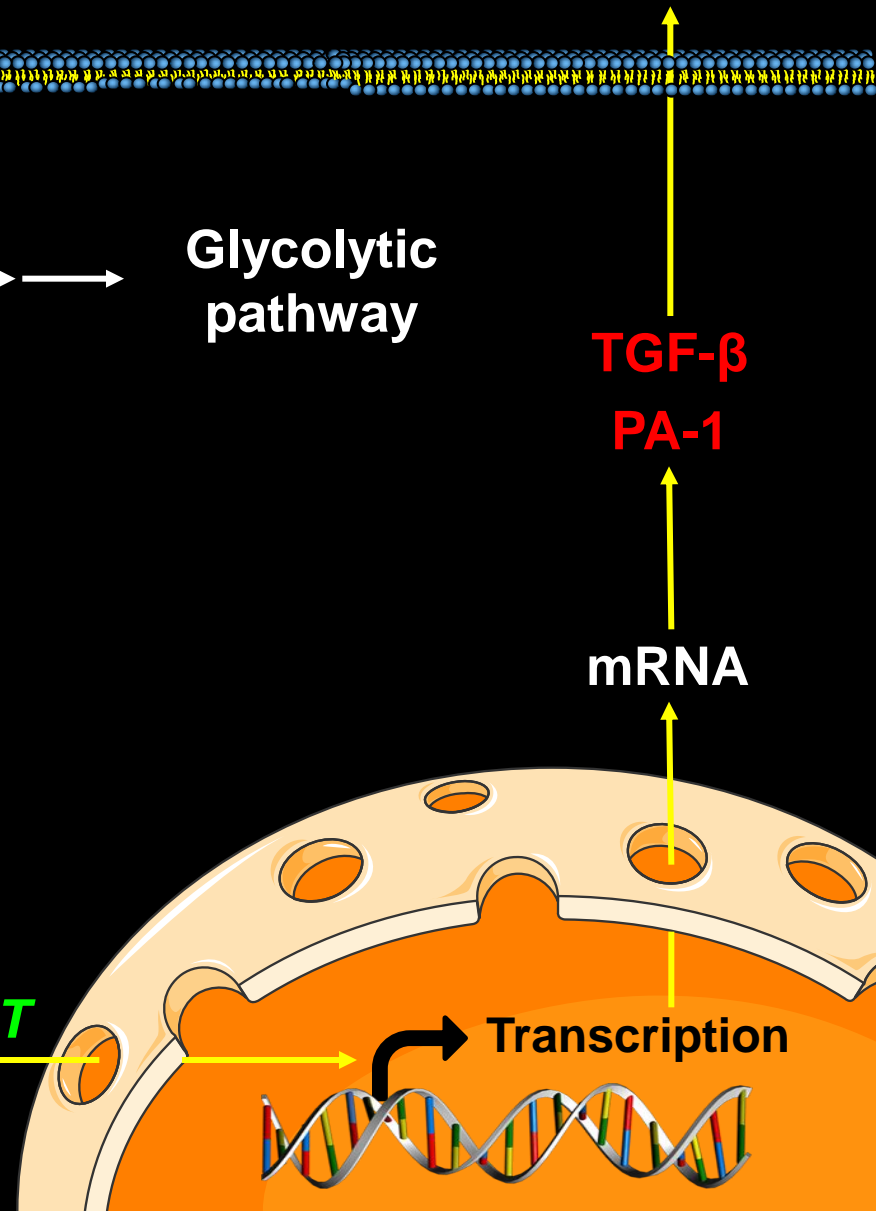
mRNA

Transcription

GFAT: Glutamine: Fructose 6-P AmidoTransferase

OGT: O-linked *N*-acetylglucosamine transferase

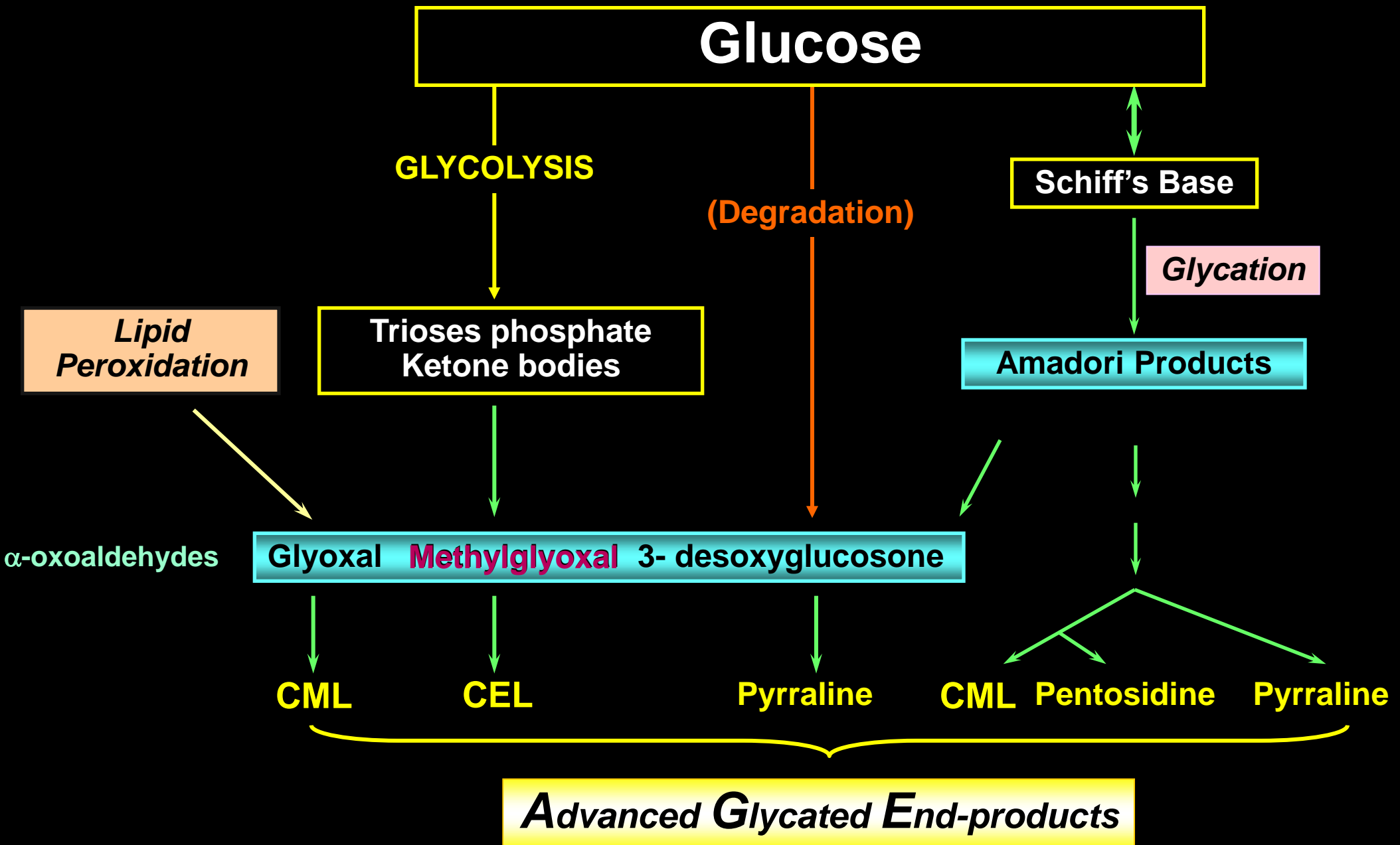
UDP-NacGluc: UDP-*N*-acetylglucosamine



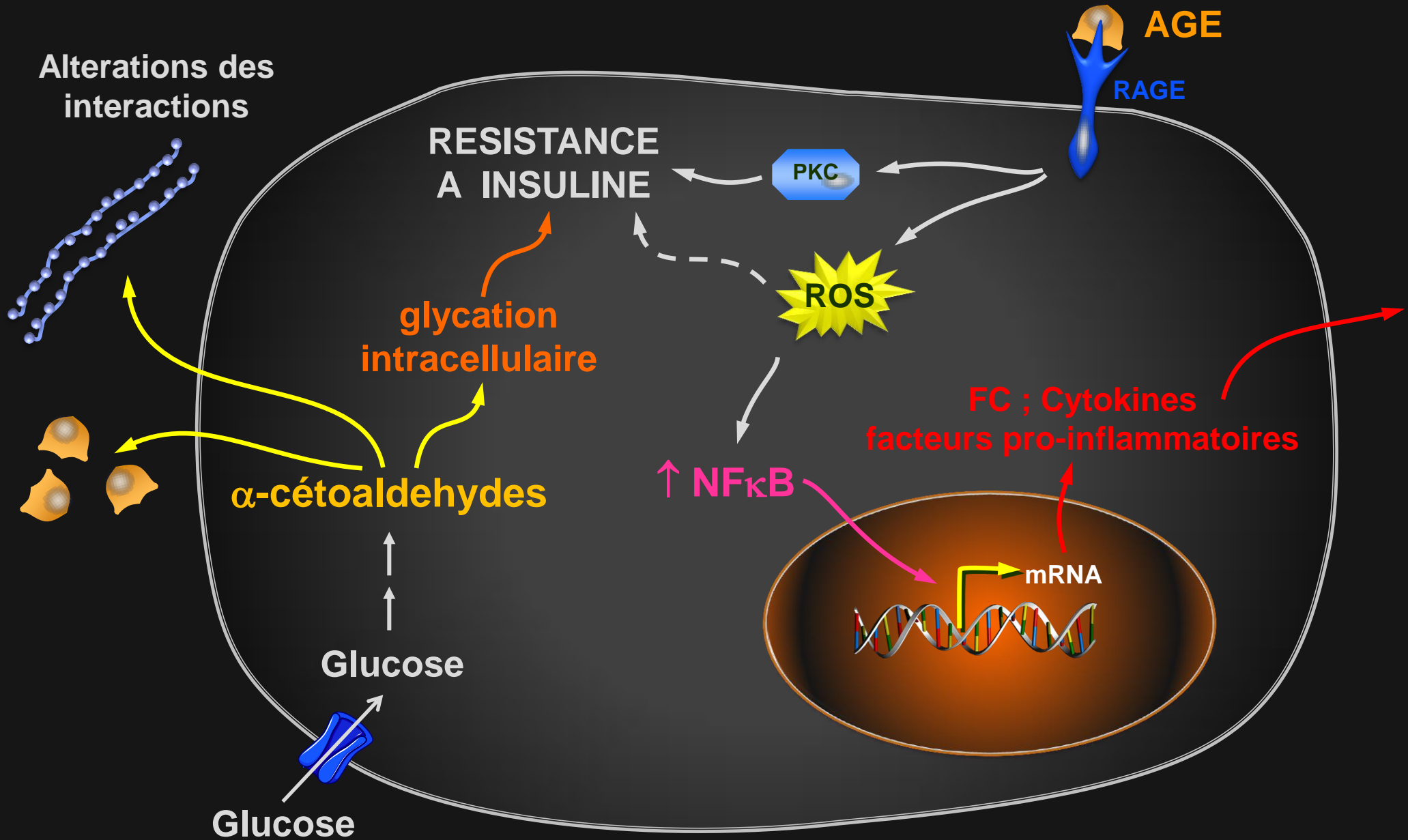
PRODUITS DE GLYCATION ET DIABÈTE

- produits par l'hyperglycémie chronique
- Formés par des réactions non enzymatiques entre les groupements aminés des protéines et le glucose ou un de ses dérivés :
 - Extérieur de la cellule : **GLUCOSE**
 - Intérieurs de la cellule : précurseurs α -cétoaldéhydique :
 - **GLYOXAL** (auto oxydation du glucose)
 - **3-DEOXY GLUCOSONE** (décomposition des produits d'Amadori)
 - **METHYL GLYOXAL** (fragmentation du dihydroxyacetone-P)

The AGE Pathway

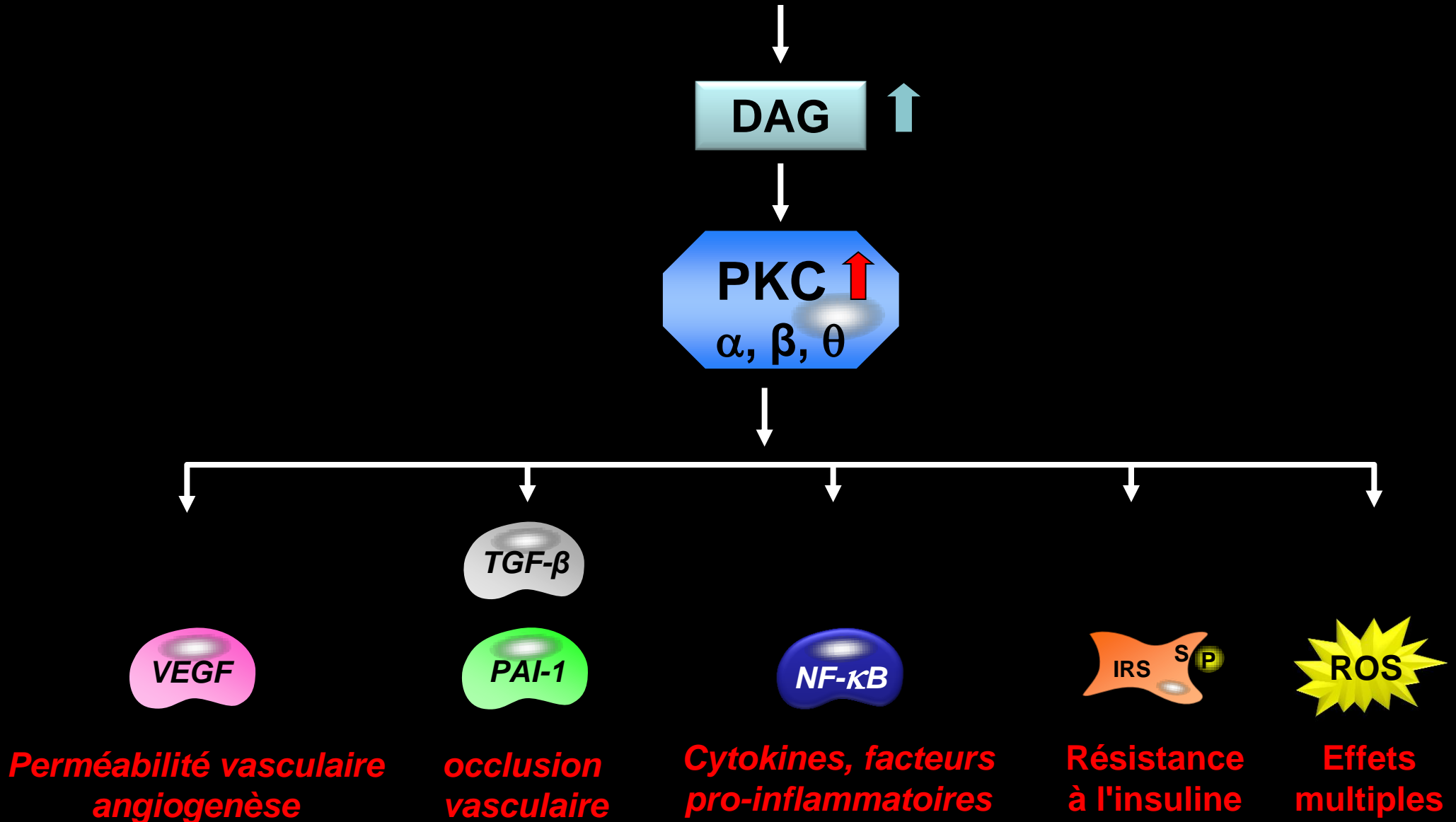


Dommmages cellulaires induits par AGEs

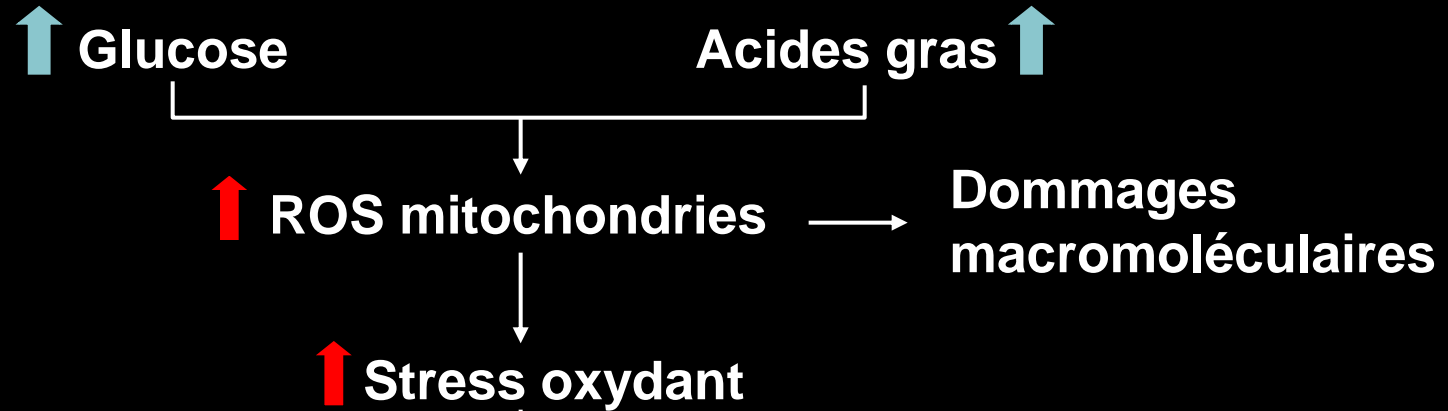


PKC pathway

Hyperglycémie



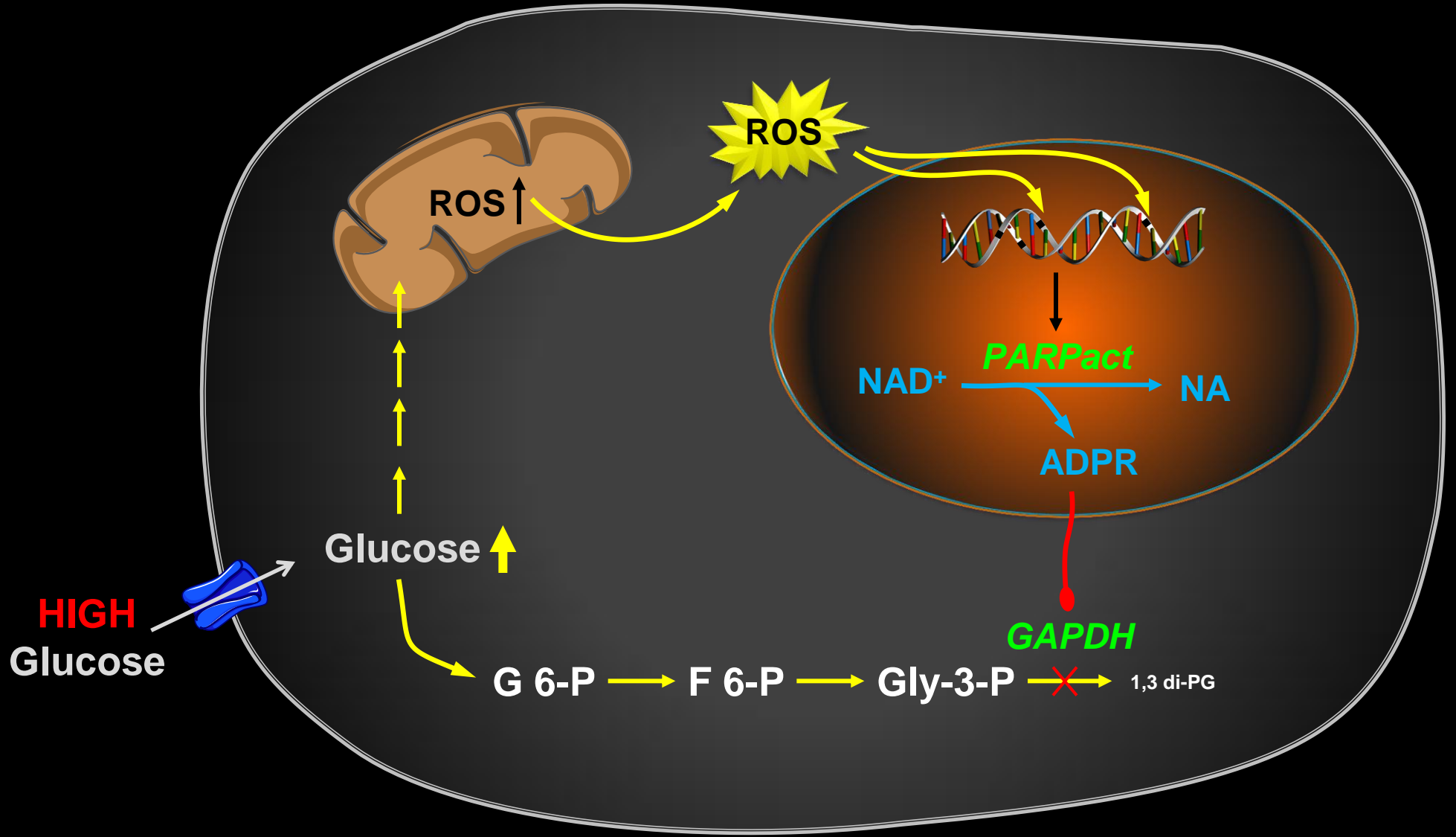
ROS et résistance à l'insuline



Résistance à l'insuline

Dysfonction des cellules β

ROS-induced GAPDH inhibition

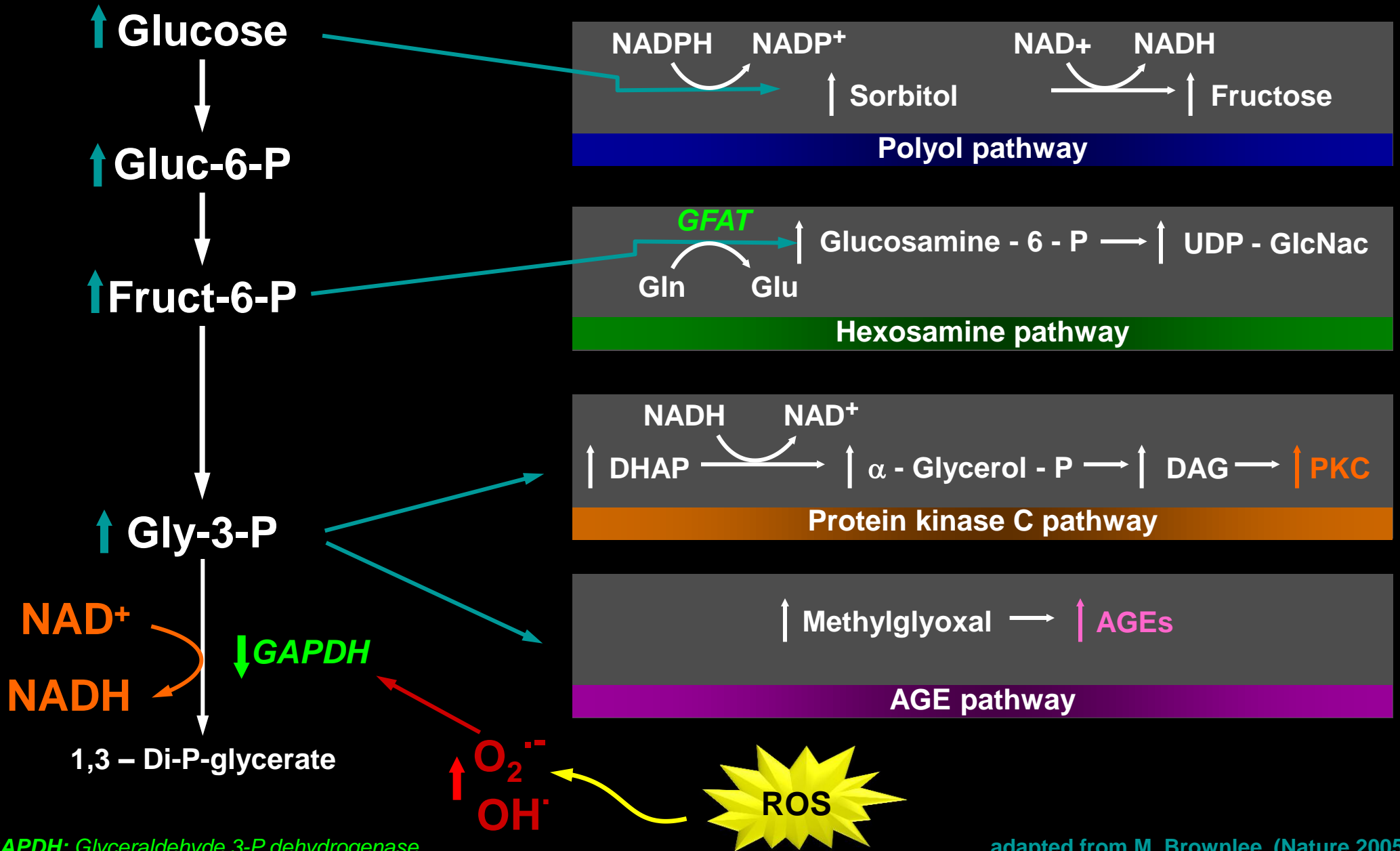


PARP: poly(ADP-ribose) polymérase

GAPDH: Glyceraldehyde 3-P dehydrogenase

1,3 di-PG: 1, 3 di-Phospho Glycerate

THEORIE DES MECANISMES UNIFIES



Altérations structurales des protéines glyquées

Modifications de l'antigénicité

- néo-antigénicité
- perte d'antigénicité (SOD, catalase)

Modifications du renouvellement

augmentation de la résistance à la protéolyse en raison de la formation des liaisons croisées (adduits).

Altérations des interactions

- **protéiques** → protéines des matrices extracellulaires.
- **protéines-cellules** :
 - . liaison des LDL et HDL aux cellules vasculaires et à la matrice extracellulaire
 - . Modification des fonctions cellulaires (production de cytokines inflammatoires, stress oxydant, chimiotactisme...)

Altérations structurales des protéines glyquées

Inhibition des effets biologiques

- Hormones ou facteurs de croissance (**Insuline**, CCK-8, FGF-2, GLP1)
- Peptides à activité antibactérienne (Lysozyme, lactoferrine)

Inhibition d'activité enzymatique

- Aminotransférases (AST, ALT), **G6PDH**; **3PGLYDH**; glucokinase; malate déshydrogénase; phosphatase alcaline; ribonucléase)
- **Cu-Zn superoxyde dismutase** (glycation plus rapide sur formes mutées dans la Sclérose latérale Amyotrophique familiale)
- **Glutathion réductase, catalase**
- Paraoxonase (PON) qui hydrolyse de nombreux organo-phosphates, **acétylhydrolase**. (toutes deux impliquées dans le métabolisme lipidique)

Glycation et insuffisance rénale

Mécanismes

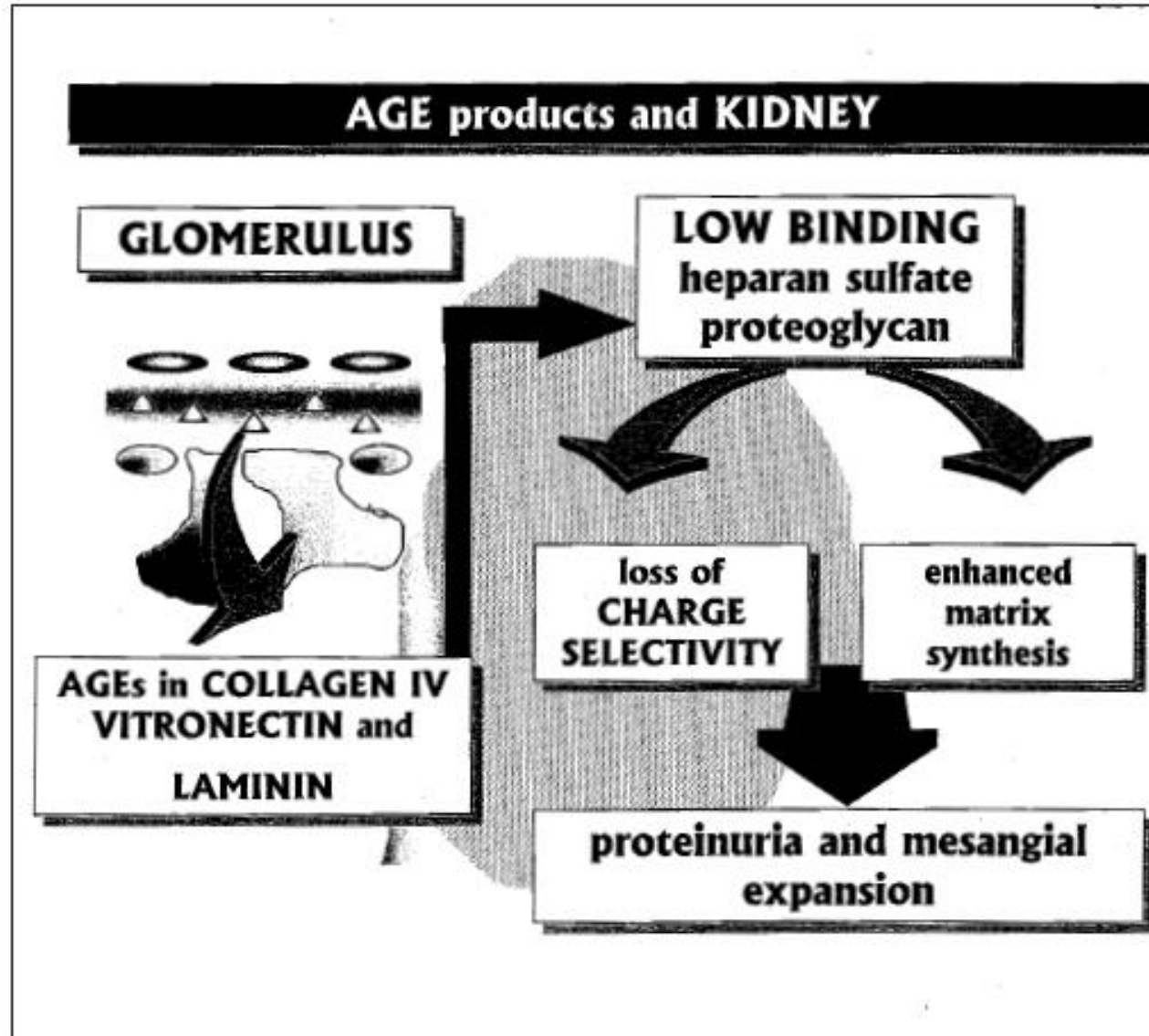
- . Augmentation de la **réten**tion → défaut d'élimination
- . Augmentation de la **production**, liée au stress oxydant, de divers produits intermédiaires et terminaux **sans hyperglycémie**.

Parmi les **produits accumulés** on retrouve :

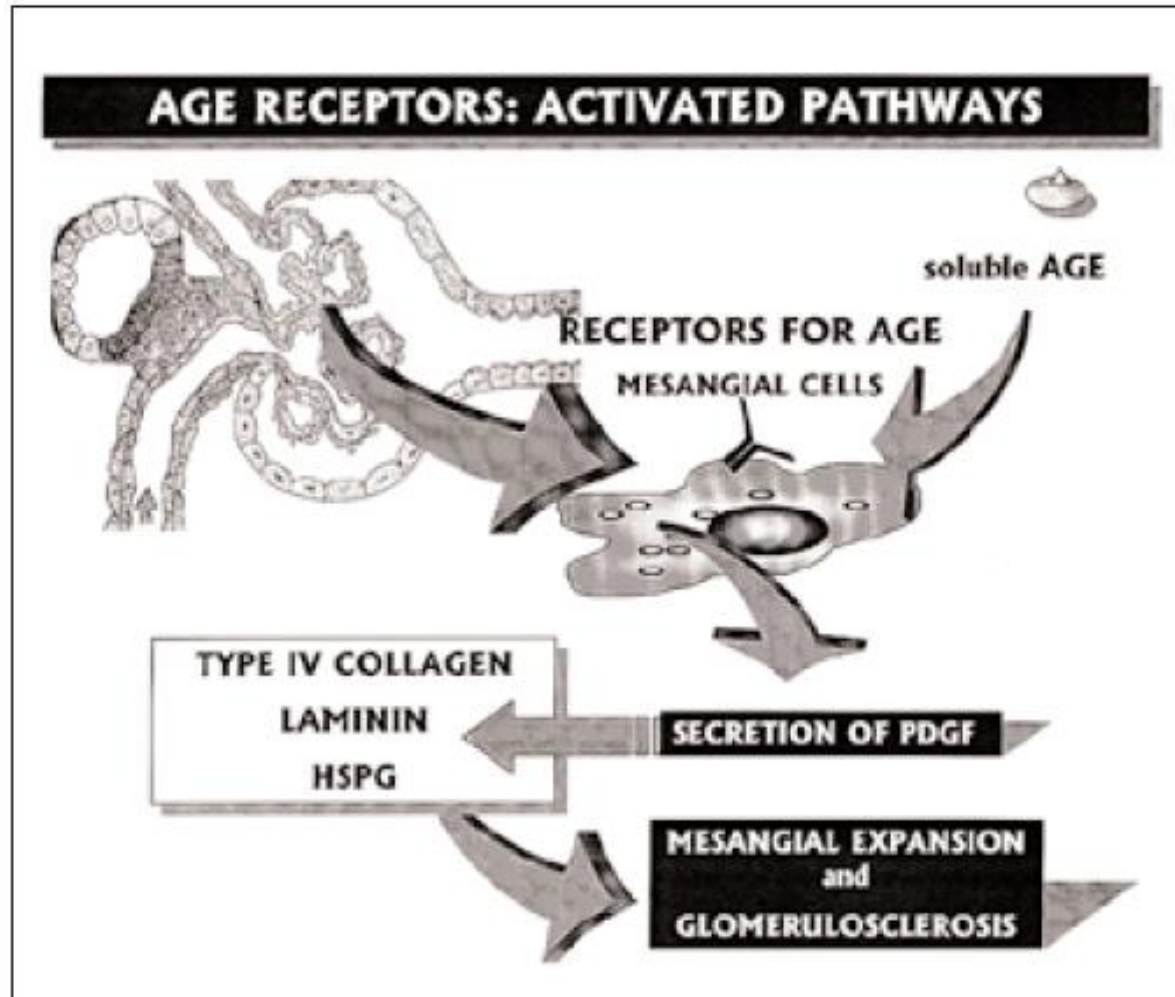
- . De petites protéines et des peptides glyquées (β 2-microglobuline)
- . AGE/ALE...
- . Des intermédiaires réactifs (aldéhydes, molécules dicarboxylées) qui vont induire un « Stress carbonylé »

« Glycotoxines » : *produits intermédiaires ou terminaux de la glycation qui sont capables d'exercer des effets délétères dans l'organisme.*

Glycation et insuffisance rénale



Glycation et insuffisance rénale



Glycation, diabète et vieillissement

Même mécanisme

Augmentation de la production et de l'accumulation des AGEs par **augmentation de la réaction de glycation** (glucose / produits d'Amadori / AGEs)

Deux paramètres réactionnels différents

- **Diabète** → Concentration de glucose
- **Vieillessement** → Durée de la réaction

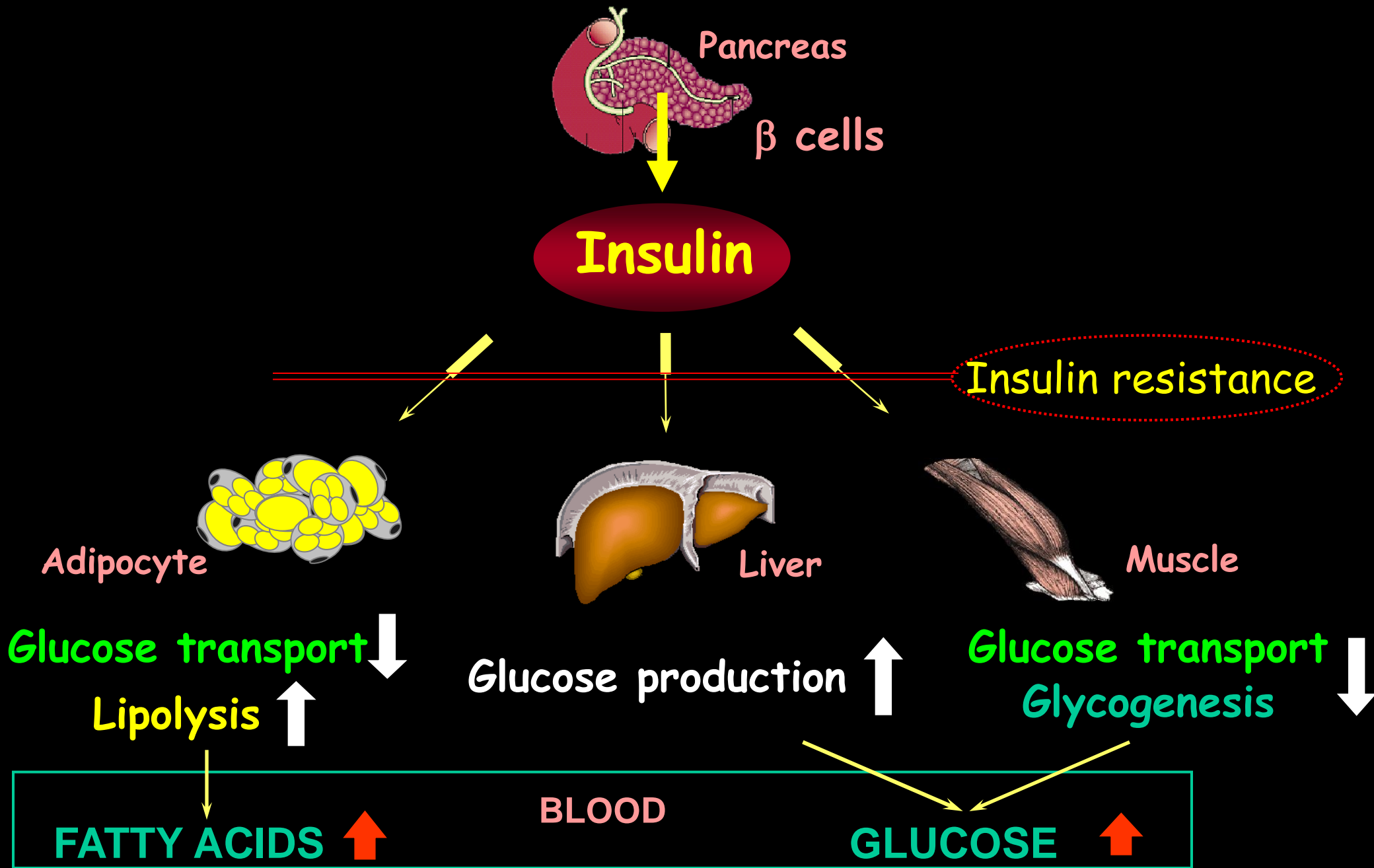
Glycation proportionnelle à la glycémie ou à la durée d'exposition

HbA1c et fructosamines (produits d'Amadori) → proportionnels à la glycémie (index de suivi des diabétiques).

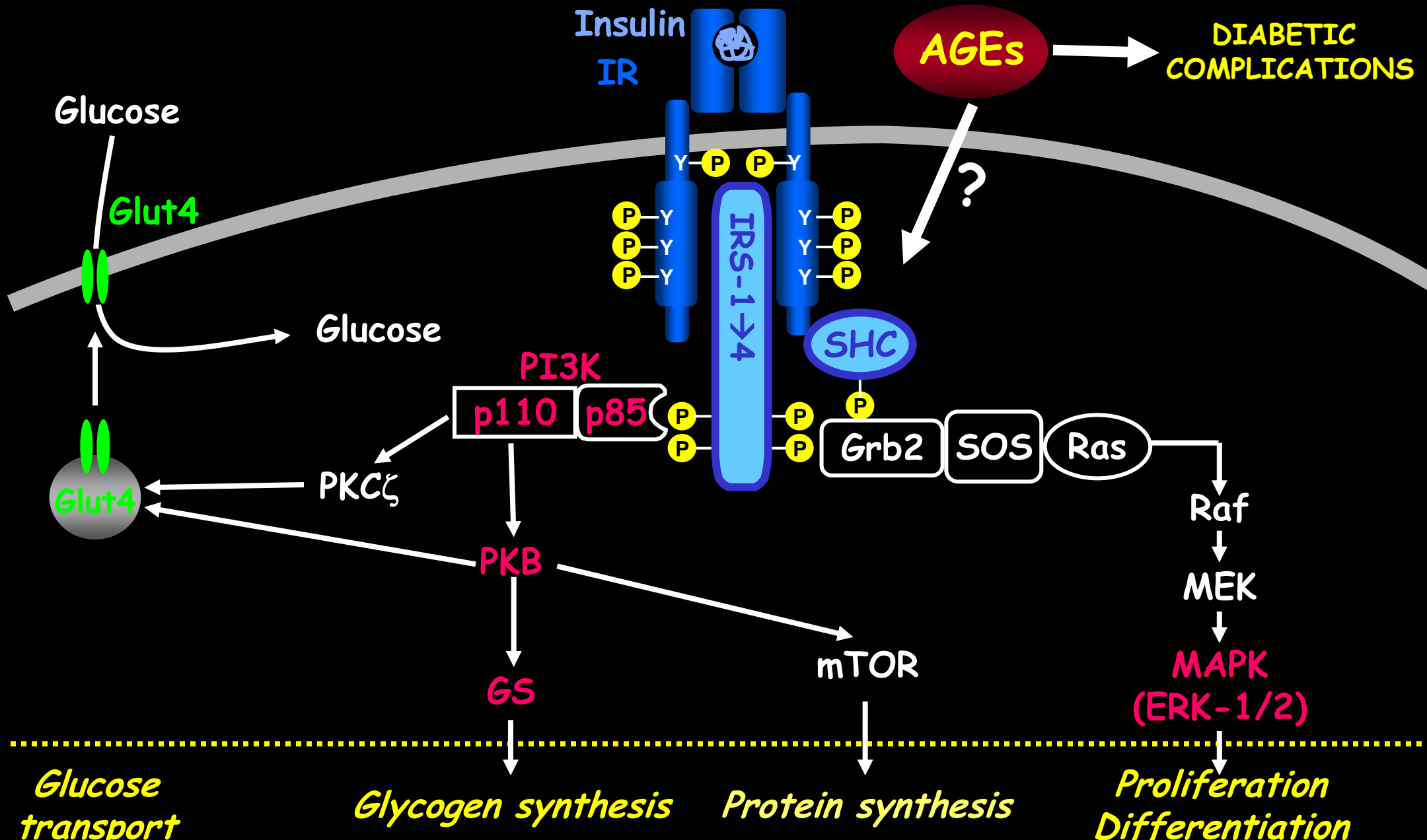
Taux de glycation du collagène cutané proportionnel :

- à l'ancienneté et au déséquilibre du diabète
- à l'âge au cours du vieillissement physiologique

METABOLIC ACTIONS OF INSULIN



INSULIN SIGNALING PATHWAY



Question : DO AGEs MODIFY INSULIN ACTION ?

Approaches :

- **STUDYING THE EFFECT OF HUMAN GLYCATED ALBUMIN (HGA) ON INSULIN BIOLOGIC EFFECTS IN RAT L6 SKELETAL MUSCLE CELLS.**
- **DETERMINING THE MECHANISM OF HGA ACTION.**

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
© 2008 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

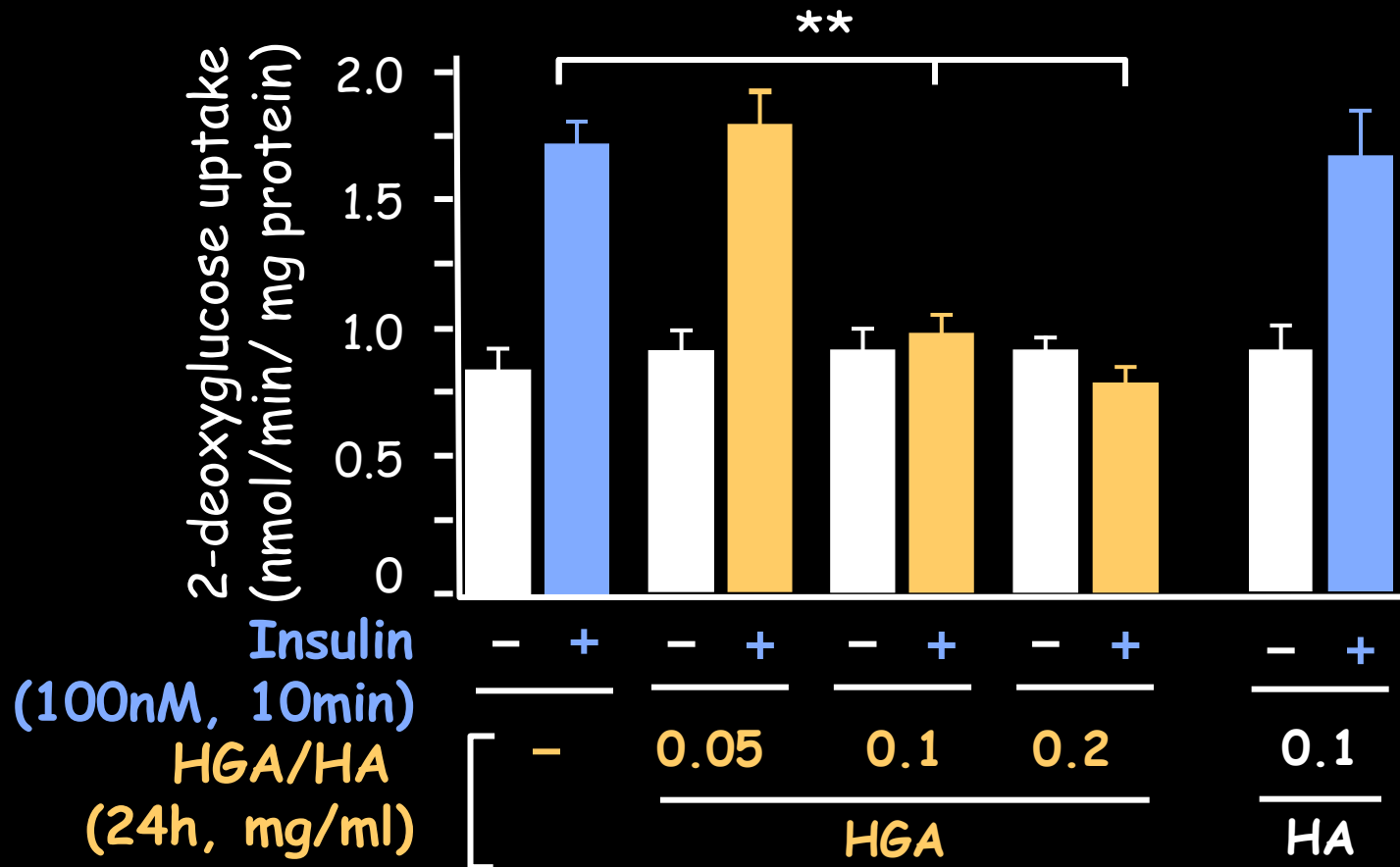
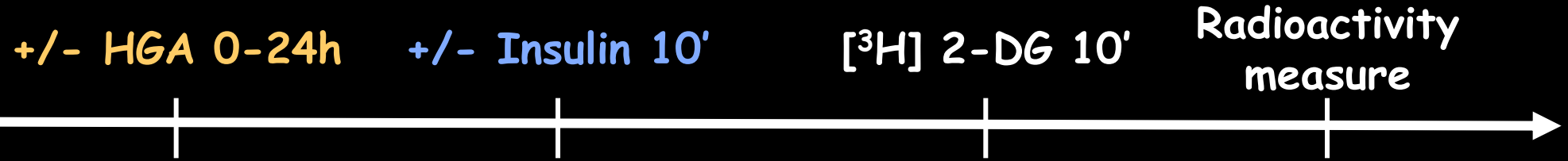
Vol. 283, No. 48, Issue of November 28, pp. 47376–47387, 2008
Printed in U.S.A.

Human Glycated Albumin Affects Glucose Metabolism in L6 Skeletal Muscle Cells by Impairing Insulin-induced Insulin Receptor Substrate (IRS) Signaling through a Protein Kinase α -mediated Mechanism*

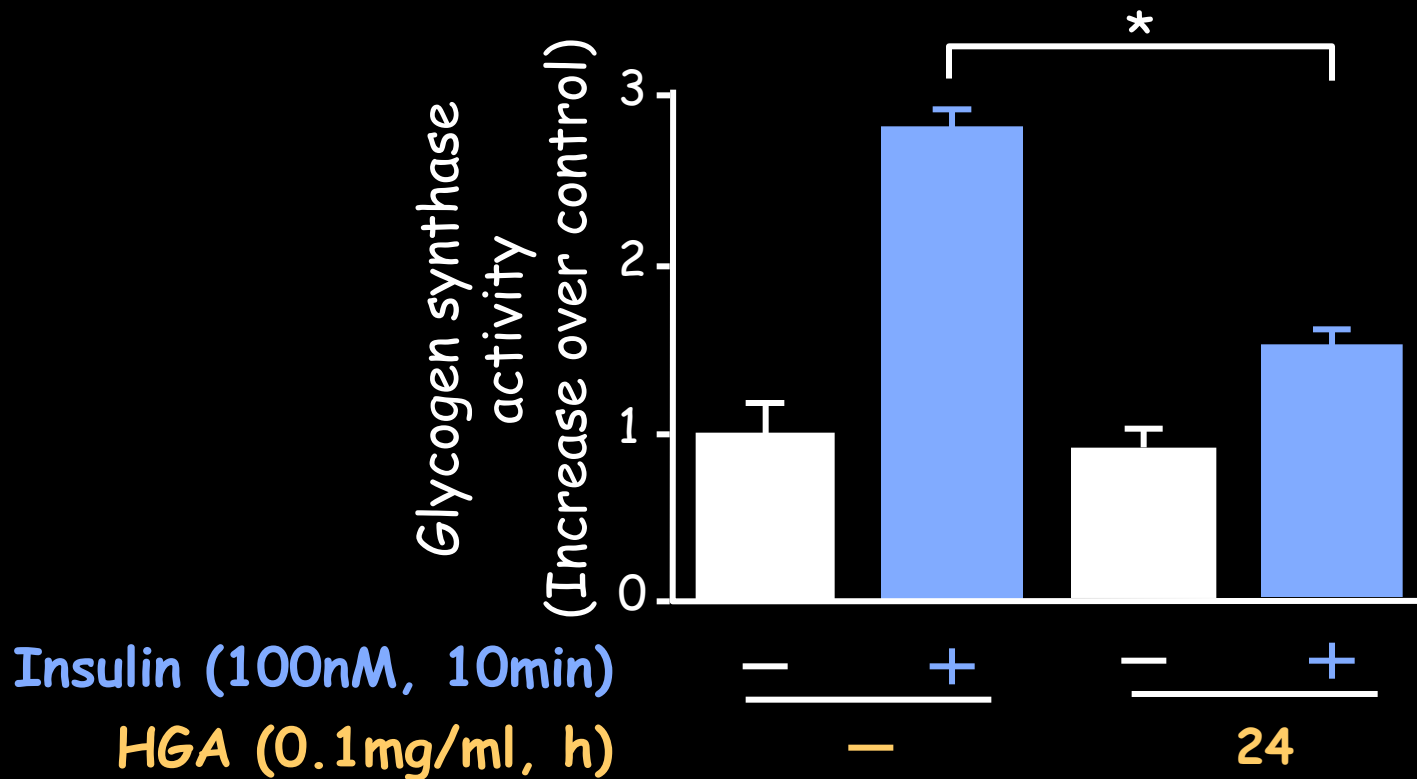
Received for publication, January 31, 2008, and in revised form, September 10, 2008
Published, JBC Papers in Press, September 11, 2008, DOI 10.1074/jbc.M801088200

Claudia Miele^{§1}, Audrey Riboulet^{§¶}, Maria Alessandra Maitan^{‡**}, Francesco Oriente[‡],
Chiara Romano[‡], Pietro Formisano[‡], Jean Giudicelli[§], Francesco Beguinot[‡],
and Emmanuel Van Obberghen^{§‡‡}

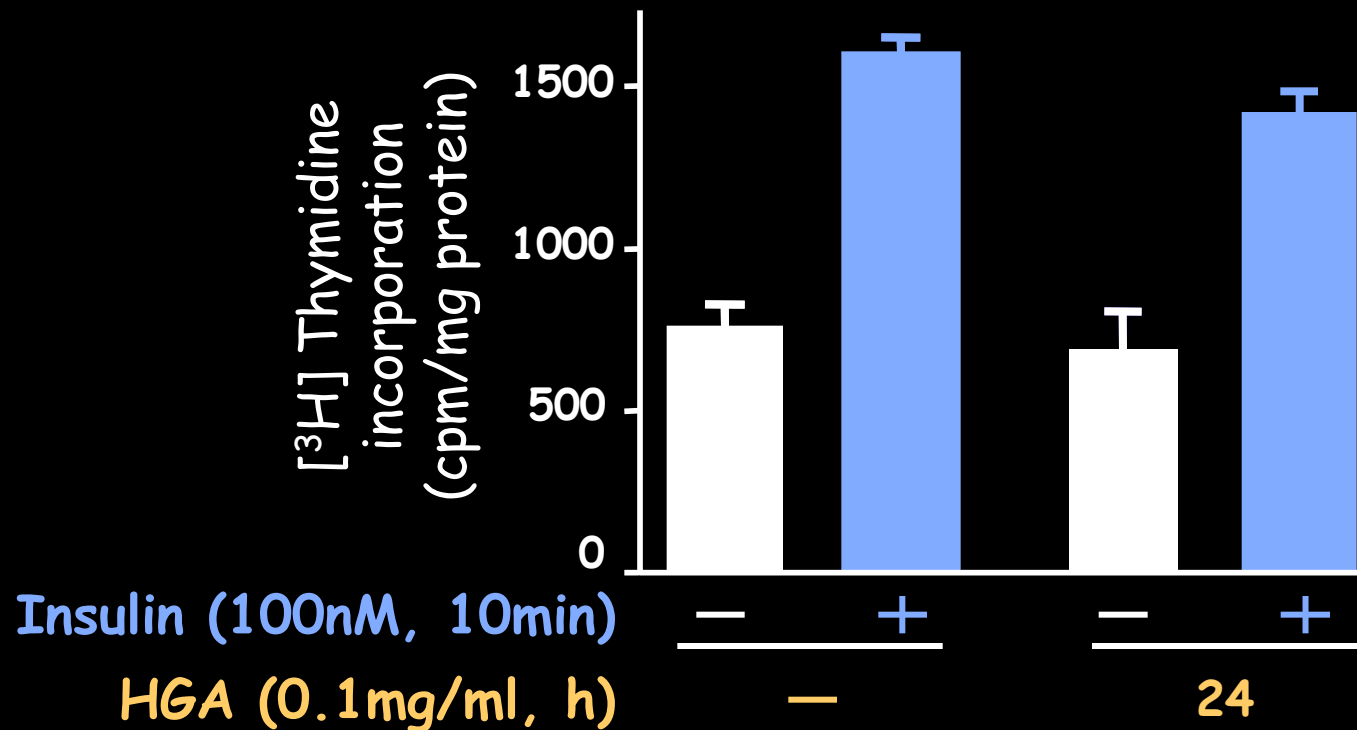
HGA INHIBITS INSULIN STIMULATORY ACTION ON GLUCOSE TRANSPORT

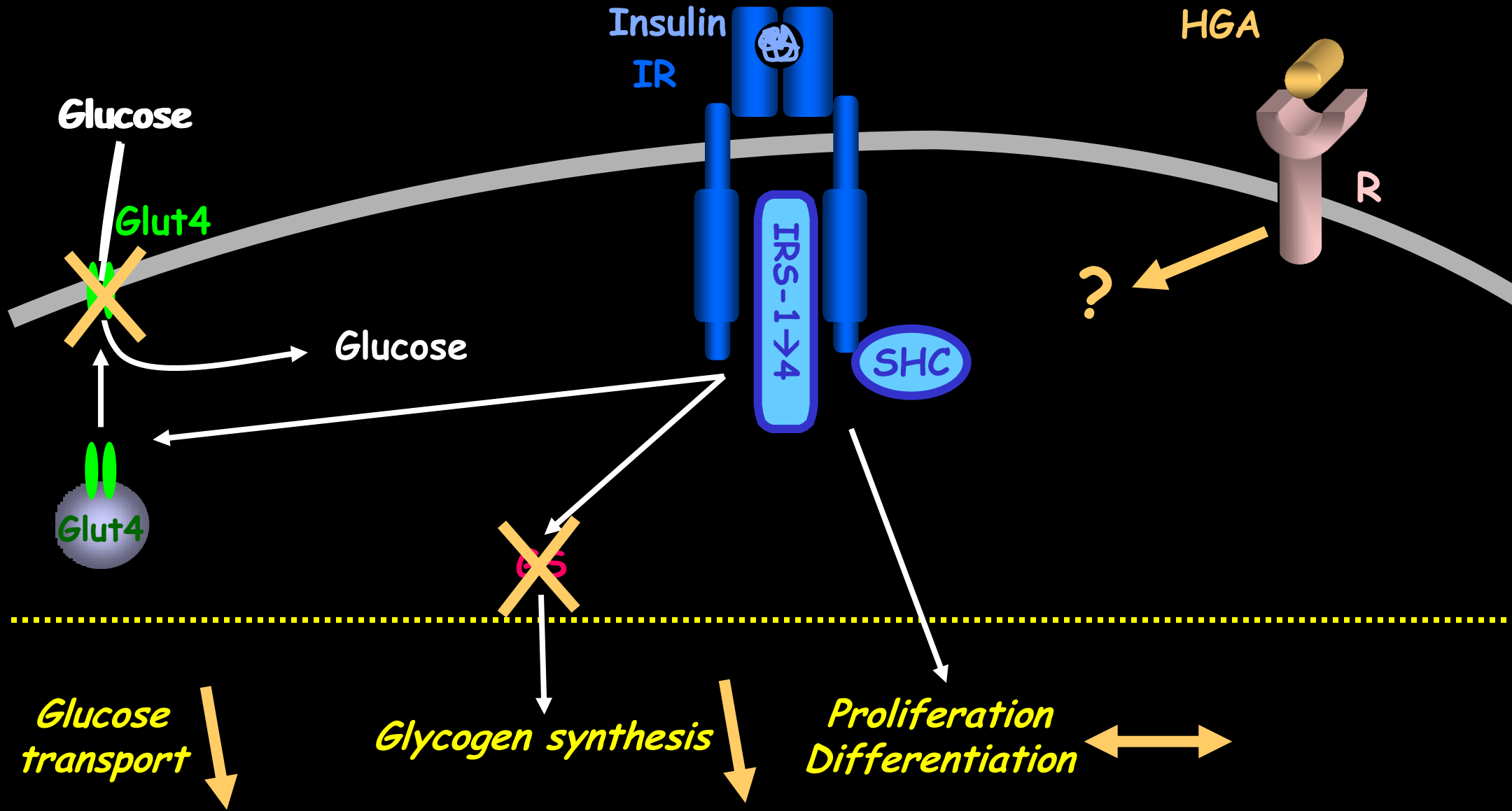


HGA INHIBITS INSULIN STIMULATORY ACTION ON GLYCOGEN SYNTHASE



HGA DOES NOT AFFECT THYMIDINE INCORPORATION

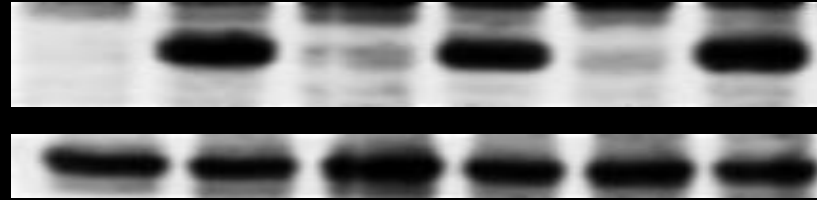




HGA DOES NOT AFFECT INSULIN RECEPTOR KINASE ACTIVITY

Western blot

IP anti-IR β :



← Blot anti-pTyr

← Blot anti-IR β

Insulin (100nM, 10min)

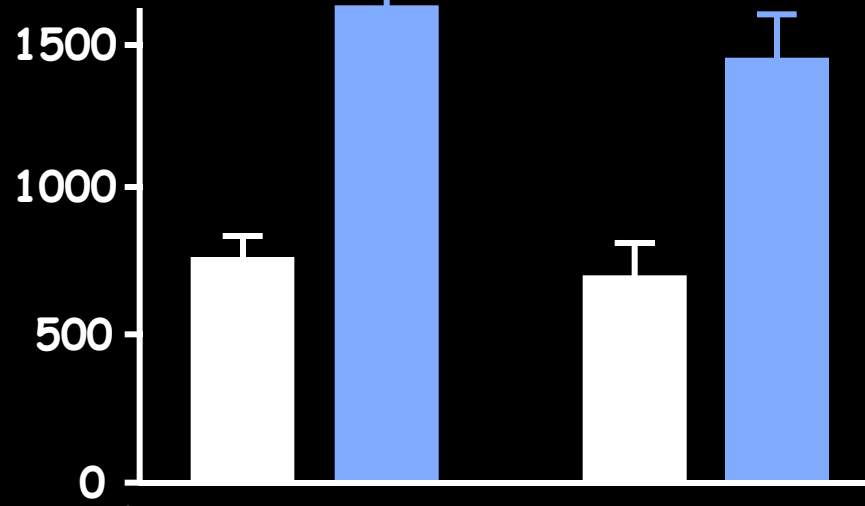
- + - + - +

HGA (0.1mg/ml, h)

- 4 24

Kinase activity

IR kinase activity
(cpm/mg protein)



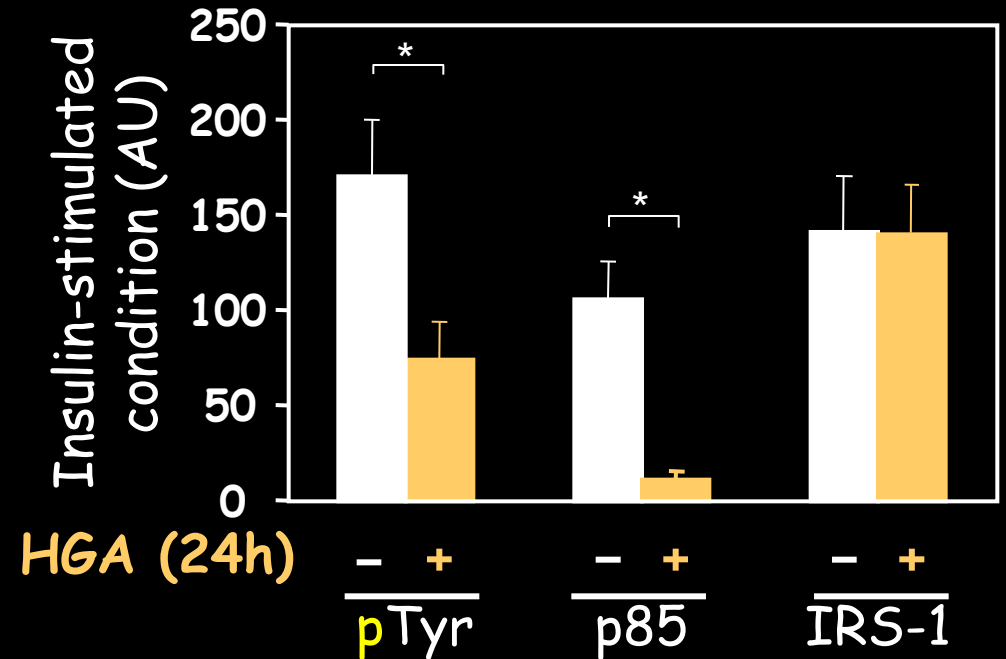
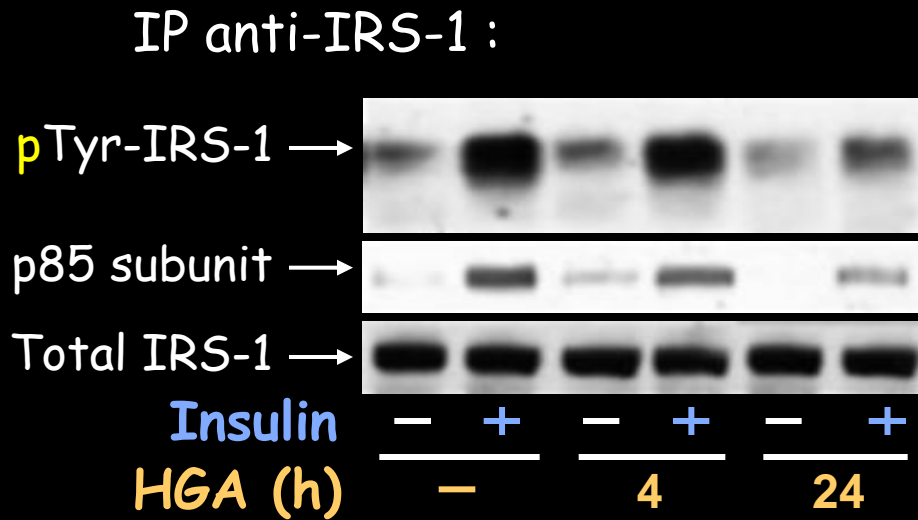
Insulin (100nM, 10min)

- + - +

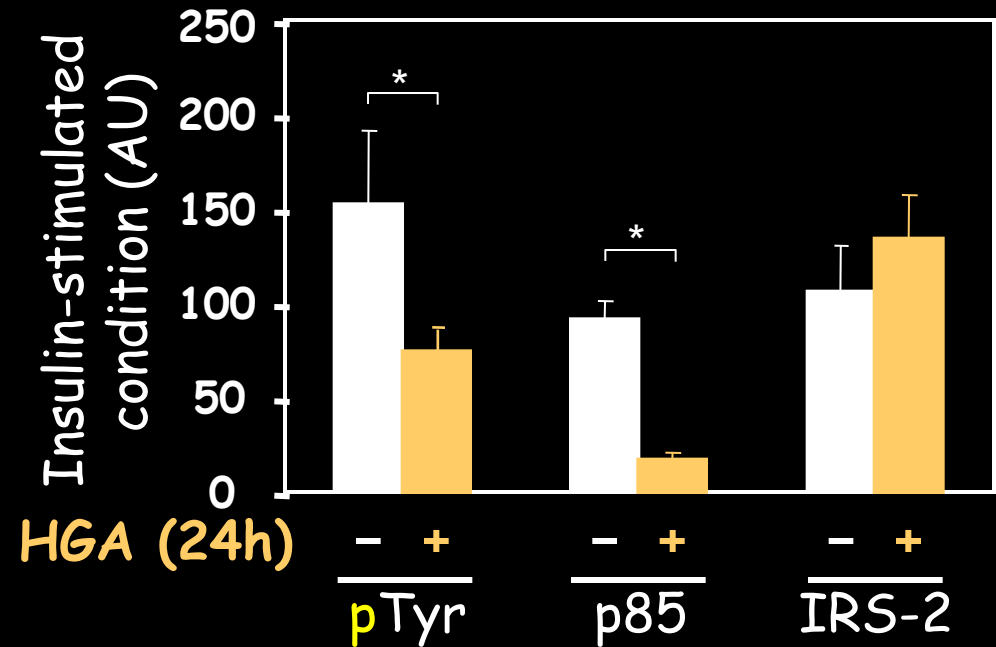
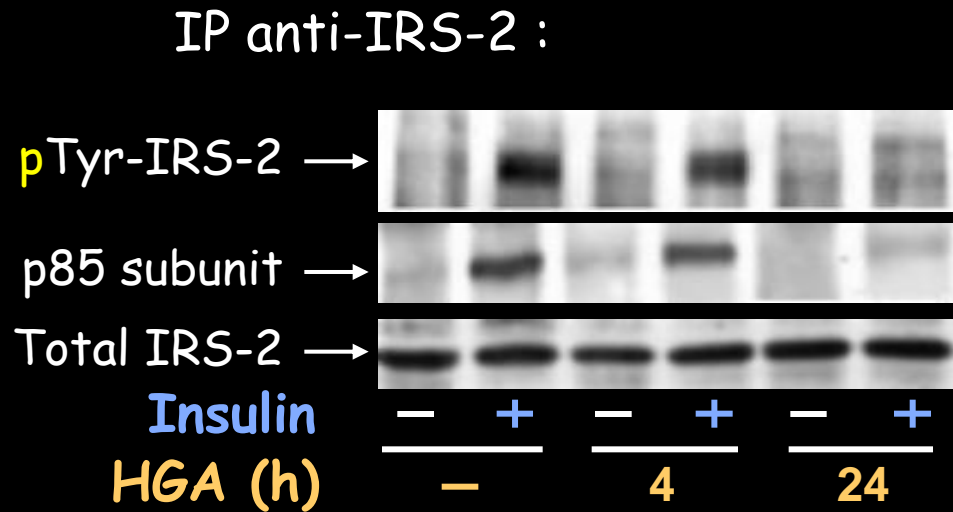
HGA (0.1mg/ml, 24h)

- +

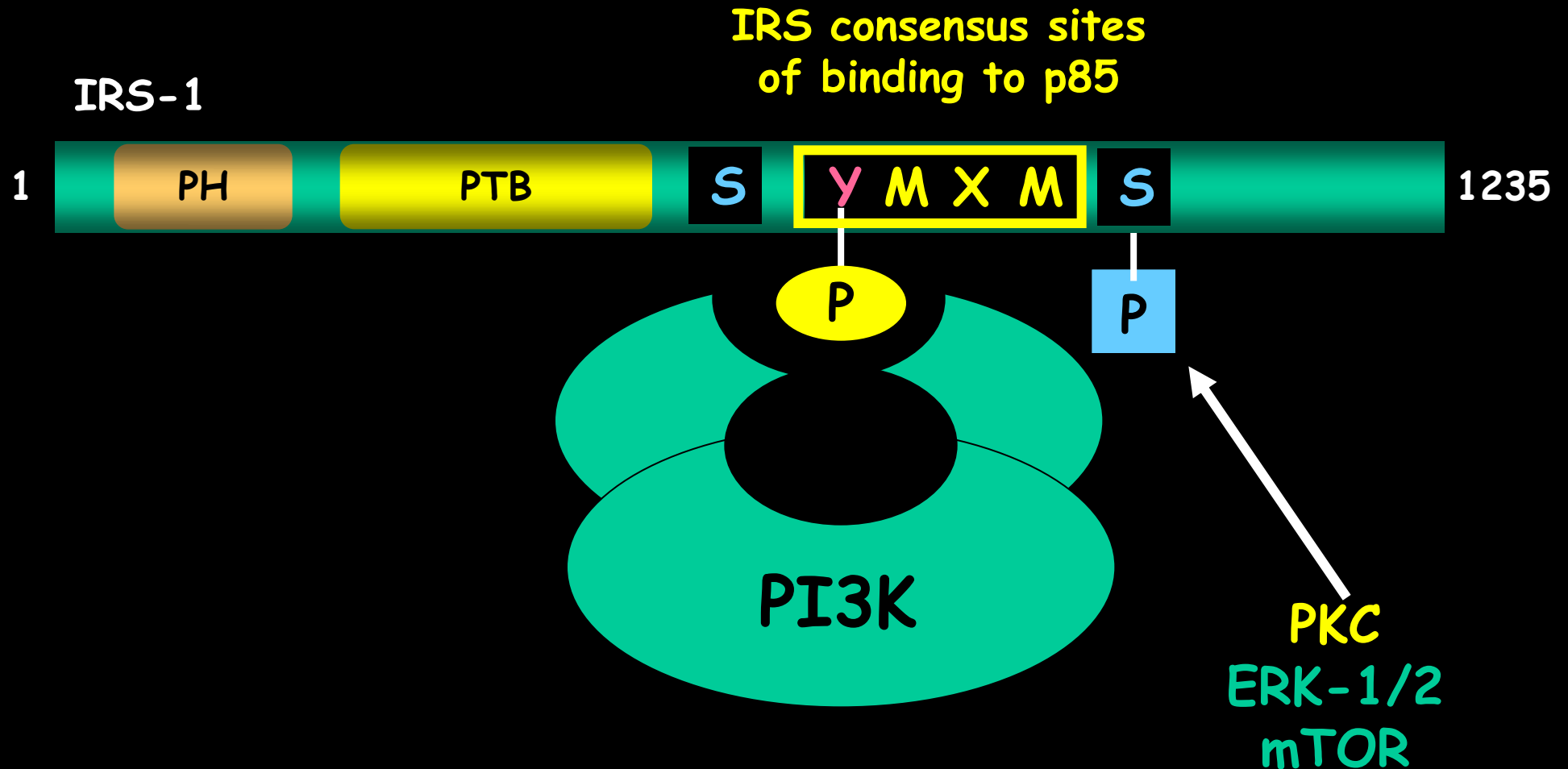
HGA REDUCES INSULIN-INDUCED TYROSINE PHOSPHORYLATION OF IRS-1 AND ITS ASSOCIATION WITH p85 SUBUNIT OF PI3-KINASE



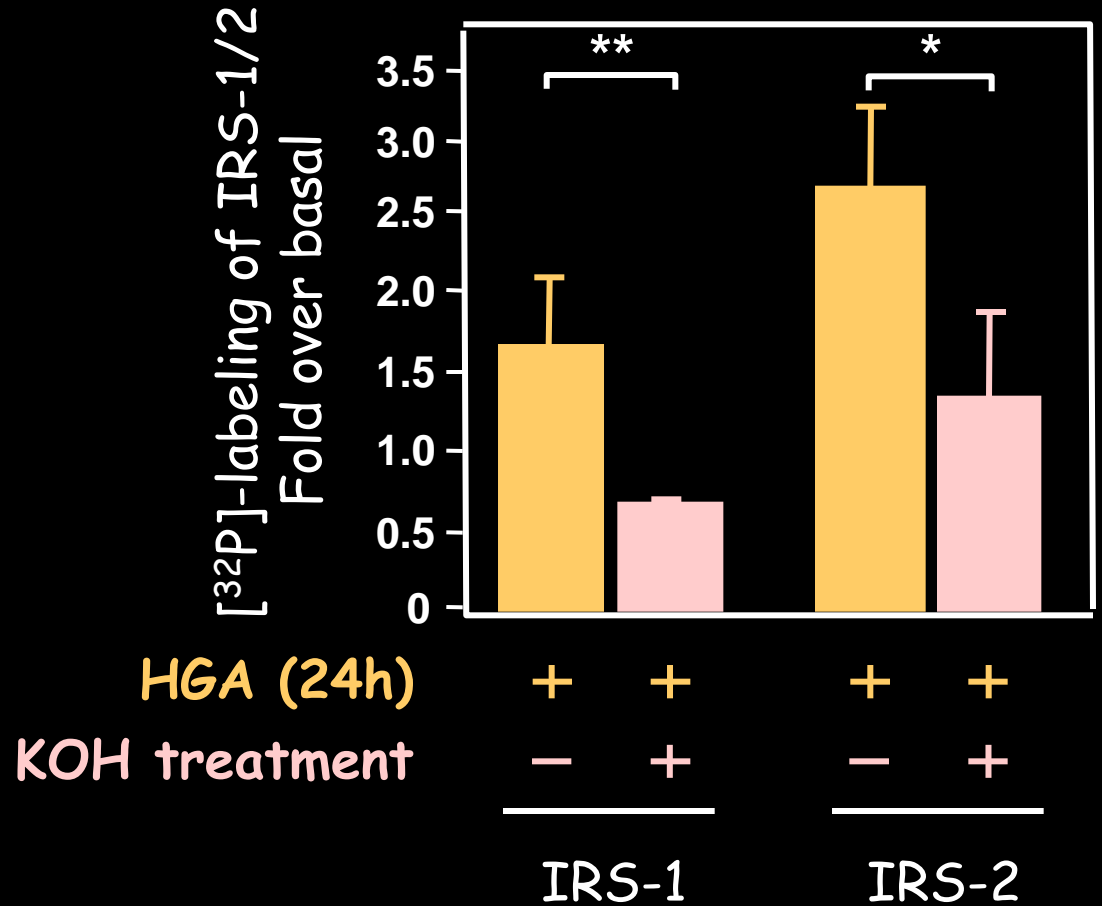
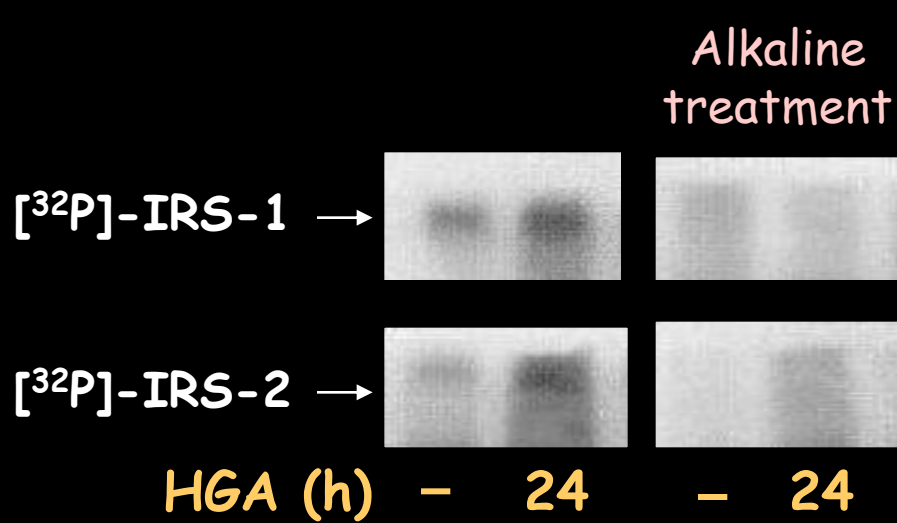
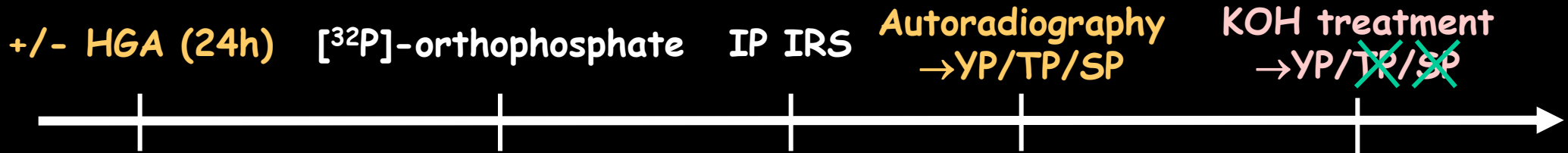
HGA REDUCES INSULIN-INDUCED TYROSINE PHOSPHORYLATION OF IRS-2 AND ITS ASSOCIATION WITH p85 SUBUNIT OF PI3-KINASE



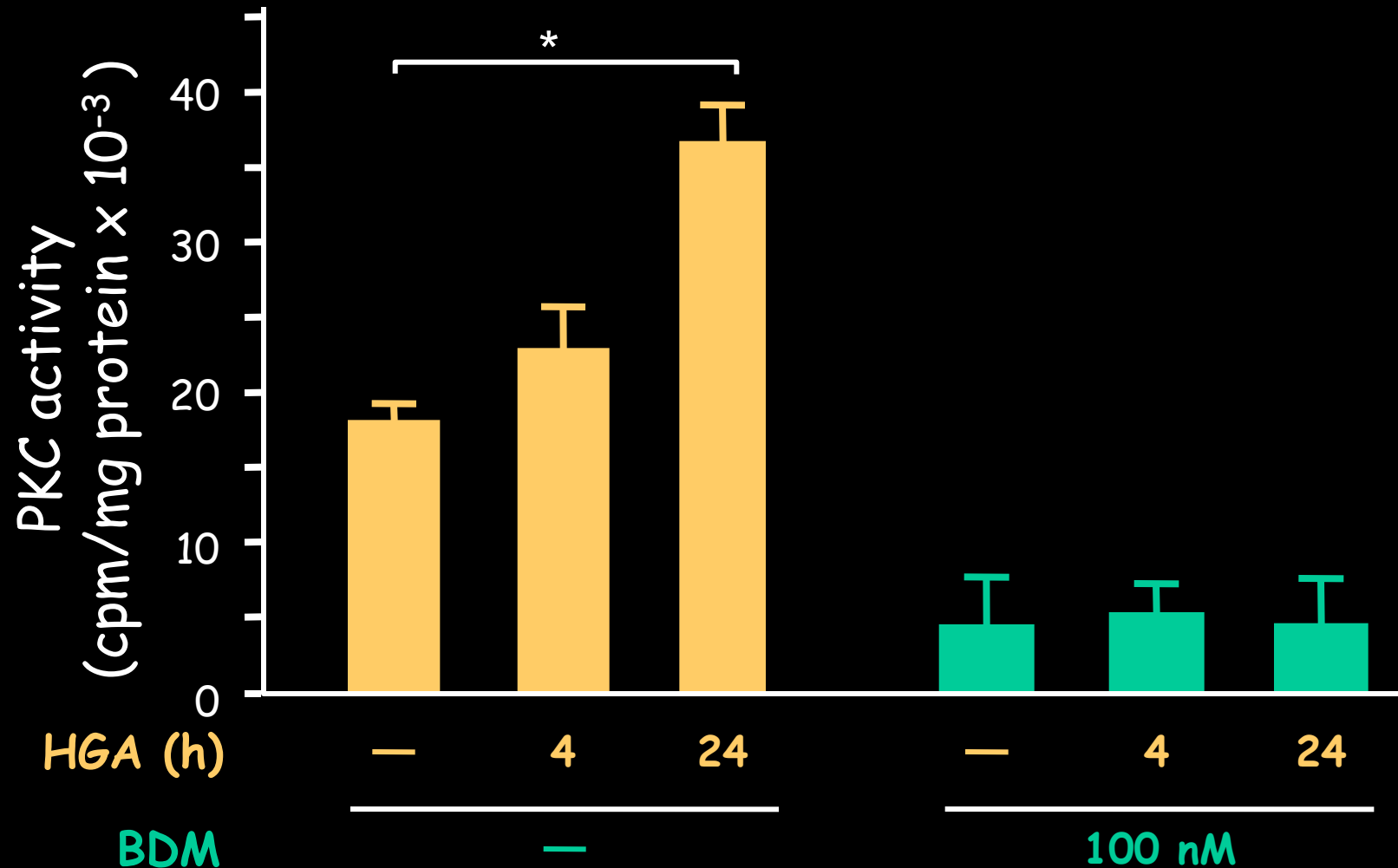
MECHANISM BY WHICH INSULIN-INDUCED IRS TYROSINE-PHOSPHORYLATION AND SUBSEQUENT PI3-K ACTIVATION COULD BE IMPAIRED



HGA LEADS TO AN INCREASE OF IRS-1/2 SERINE PHOSPHORYLATION

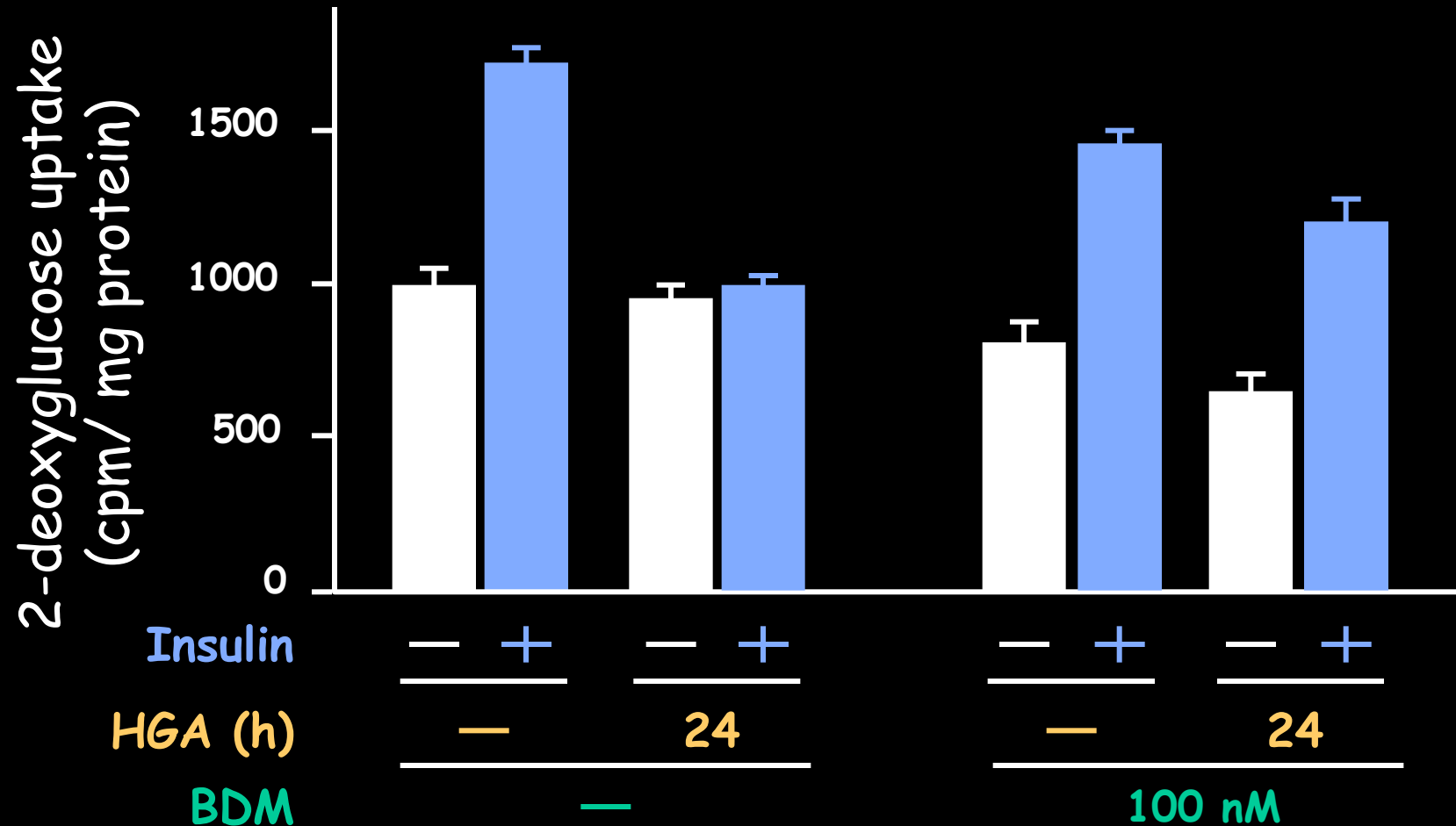


HGA INCREASES PKC ACTIVITY

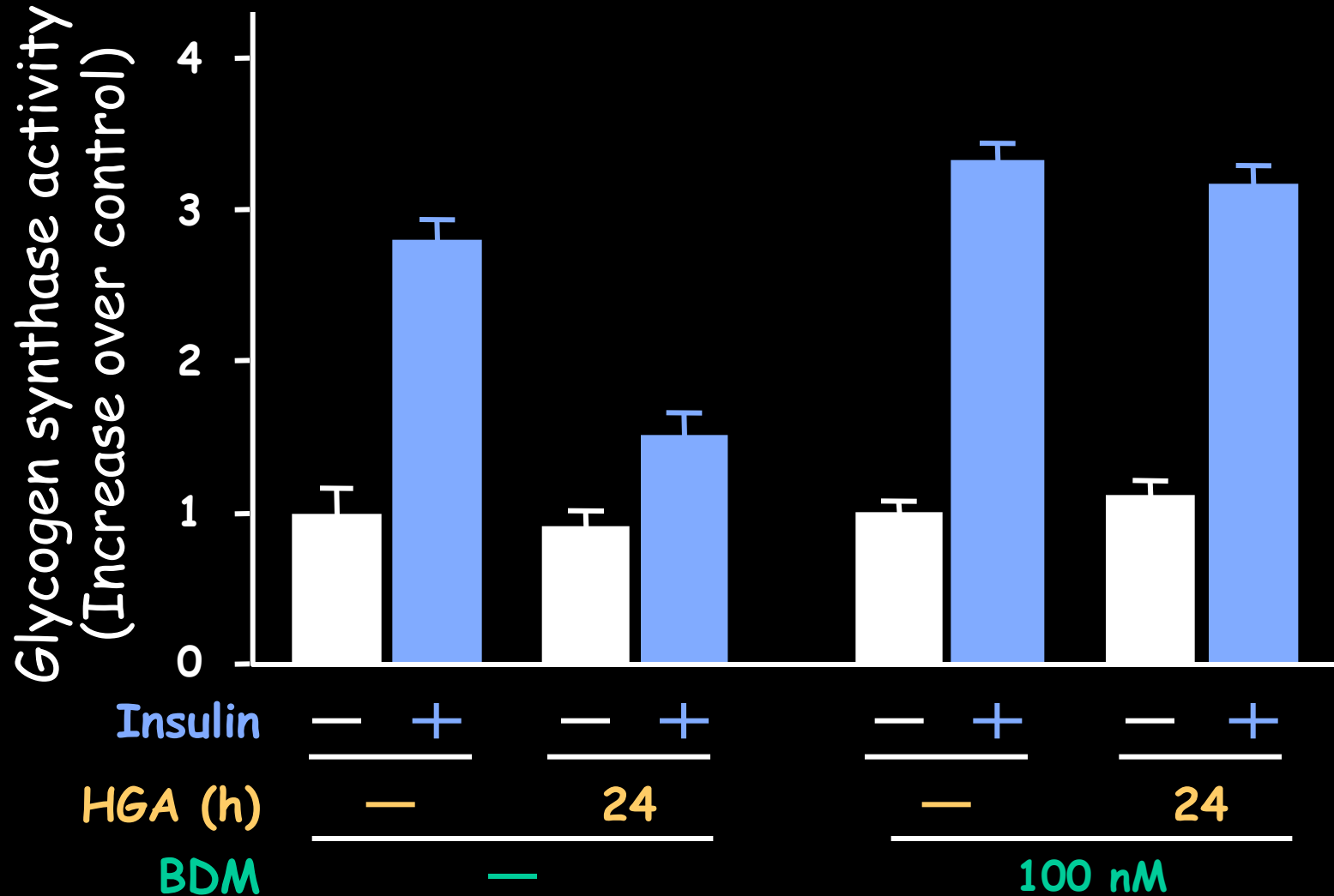


BDM (bisindolylmaleimide) or **GF109203X** : at 100 nM, classical and novel PKC inhibitor

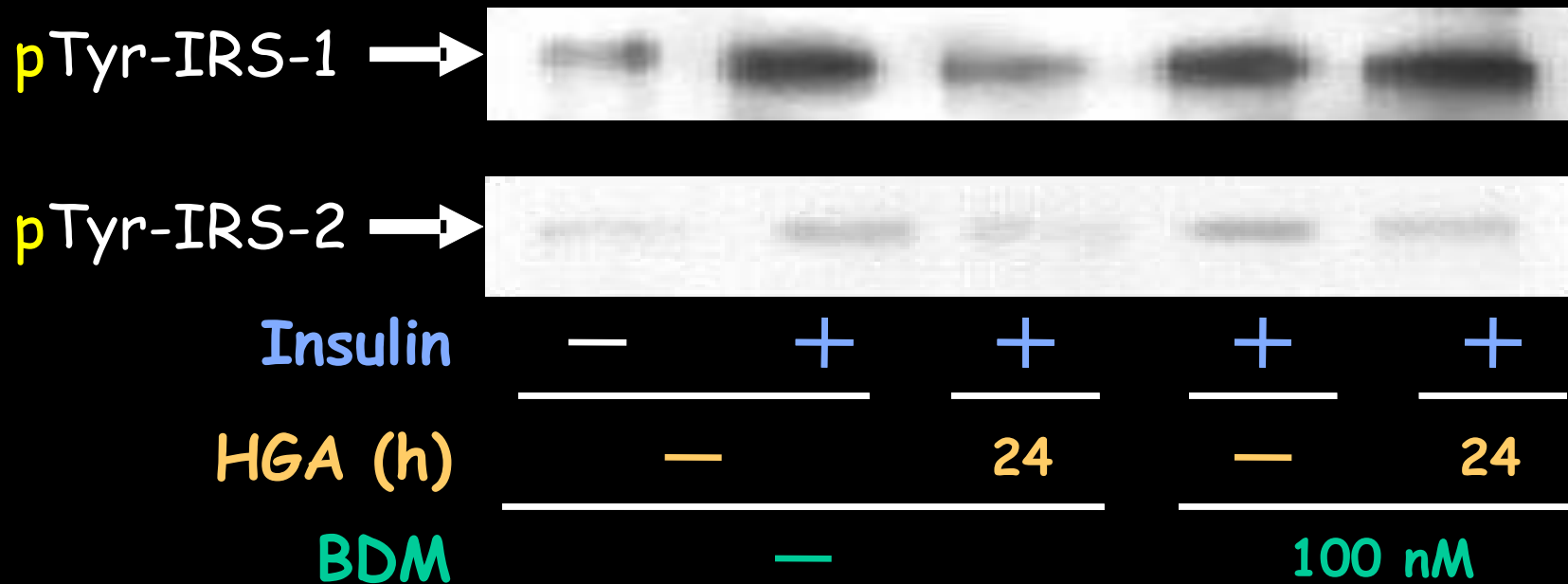
INHIBITION OF PKC PREVENTS HGA-INDUCED DECREASE IN INSULIN-STIMULATION OF GLUCOSE TRANSPORT



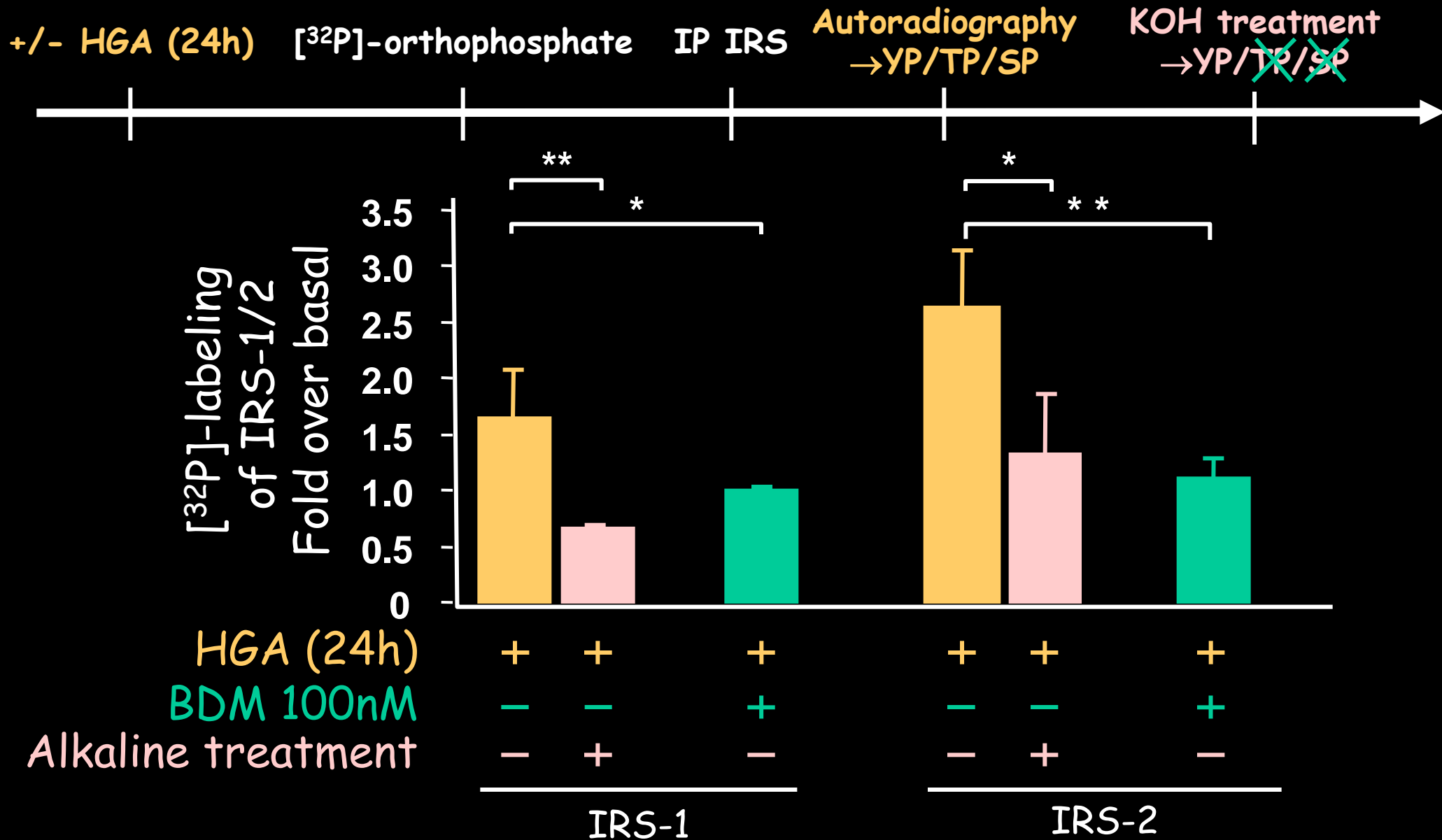
INHIBITION OF PKC PREVENTS HGA-INDUCED DECREASE IN INSULIN-STIMULATION OF GLYCOGEN SYNTHASE



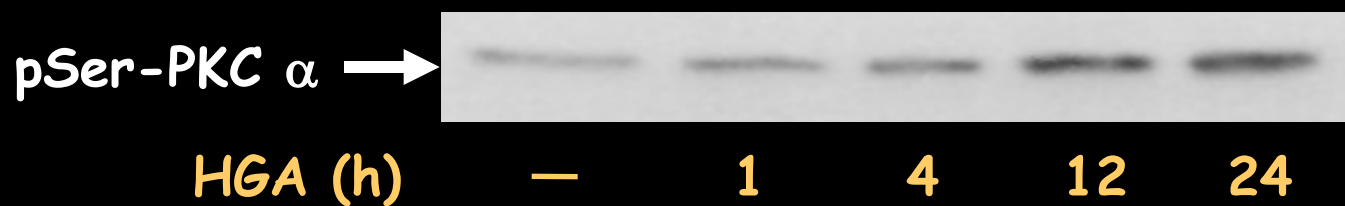
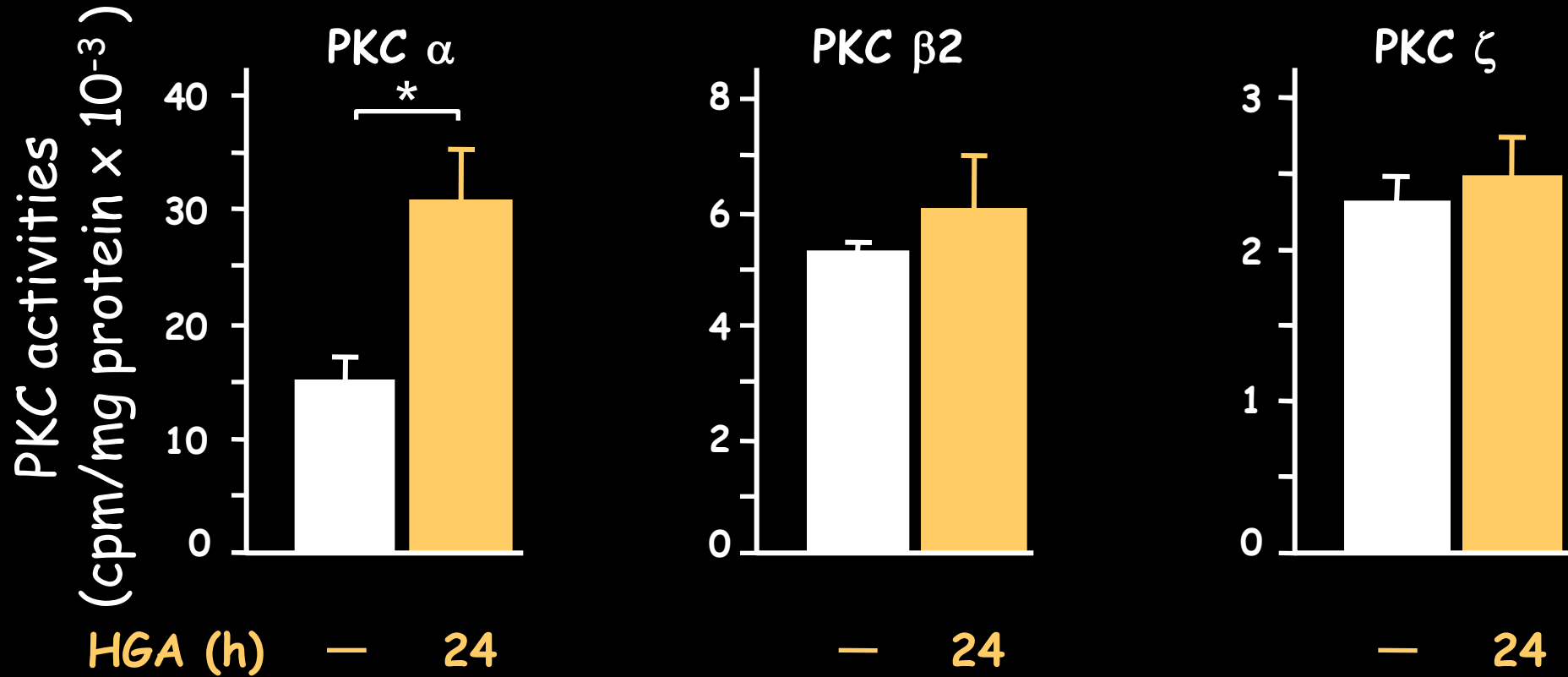
BLOCKADE OF PKC RESCUES HGA-INDUCED INHIBITION OF IRS-1/2 TYROSINE PHOSPHORYLATION



HGA LEADS TO A PKC-DEPENDENT INCREASE IN IRS-1/2 SERINE PHOSPHORYLATION



HGA INCREASES PKC α ACTIVITY



rat L6 skeletal muscle cells

