



HAL
open science

**Etude des interactions moléculaires (affinité /
fonctionnalité) d'un récepteur biologique d'intérêt, le
RAGE, impliqué dans des pathologies à composante
inflammatoire**

Christophe Furman

► **To cite this version:**

Christophe Furman. Etude des interactions moléculaires (affinité / fonctionnalité) d'un récepteur biologique d'intérêt, le RAGE, impliqué dans des pathologies à composante inflammatoire. Sciences du Vivant [q-bio]. ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE, Université de Lille, 2020. tel-04488669

HAL Id: tel-04488669

<https://hal.univ-lille.fr/tel-04488669v1>

Submitted on 4 Mar 2024

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

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



COLLEGE DOCTORAL
École Doctorale
BIOLOGIE SANTÉ



ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

**Mémoire en vue de l'obtention de
L'Habilitation à Diriger des Recherches**

*Etude des interactions moléculaires (affinité / fonctionnalité)
d'un récepteur biologique d'intérêt, le RAGE, impliqué dans des
pathologies à composante inflammatoire*

Christophe FURMAN

Maître de Conférences

86^e Section, Sciences du Médicament et des produits de Santé

Inserm U1167 : Facteurs de risques et déterminants moléculaires des maladies
liées au vieillissement

11 décembre 2020



RESUME

Une inflammation incontrôlée et persistante est un facteur déterminant de la vitesse du processus de vieillissement et peut devenir la base fondamentale de nombreuses pathologies chroniques, notamment la polyarthrite rhumatoïde (PR), les maladies inflammatoires de l'intestin (MII), les troubles métaboliques (diabète et obésité), les troubles cardiovasculaires (cardiopathie ischémique, athérosclérose), les maladies neurodégénératives (Parkinson et Alzheimer) et le cancer. Les maladies inflammatoires sont parmi les causes les plus fréquentes de maladies chroniques dans le monde. La charge croissante des coûts de santé peut être attribuée principalement à la gravité et à la complexité des troubles inflammatoires.

Parallèlement, un nombre de plus en plus important d'études implique le RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products), une protéine transmembranaire de la superfamille des récepteurs de type immunoglobuline, dans les troubles liés à l'âge. L'induction du RAGE par ses ligands (AGEs, DAMP, HMGB, protéines S100...) est souvent associée à une activité pro-inflammatoire et pro-oxydante. Ces études, ainsi que d'autres résultats, conduisent à l'hypothèse que l'inhibition du RAGE (invalidation du gène ou antagonisme d'activité) est capable de prévenir et de contrôler non seulement l'inflammation aiguë mais aussi l'inflammation chronique.

Le projet de recherche que je défends aujourd'hui concerne le développement et la validation de modèles *in vitro* afin d'évaluer l'affinité ainsi que la fonctionnalité d'antagonistes potentiels de ce récepteur.

A l'aide d'un kit ELISA principalement conçu pour le criblage des inhibiteurs de l'interaction AGE2 (AGE modifié par le glycéraldéhyde) -RAGE (RAGE soluble) *in vitro*, j'ai pu tester à ce jour 169 molécules, représentatives de familles chimiques distinctes, issues de la chimiothèque d'HEI (Ecole des hautes Etudes d'Ingénieur). Ce premier screening m'a permis d'identifier 15 hits présentant un potentiel d'inhibition de l'interaction AGE2-sRAGE comparable, voire meilleure que l'Azeliagon (inhibiteur de référence). L'étude de la cytotoxicité de ces hits sur un modèle de cellules HEK293 a été réalisée et s'est révélée négative. Afin d'étudier l'affinité de ces hits pour le RAGE, le développement de cellules HEK-293 transfectées de manière stable avec RAGE Full-length (protéine entière), couplé dans sa partie C-terminale avec la GFP (Green Fluorescent protein), me permet actuellement de déterminer de façon complémentaire, par la technique de Thermophorèse à MicroEchelle (MST), les constantes de dissociation (K_d) des inhibiteurs potentiels de RAGE. Des résultats préliminaires de K_d pour 3 hits ont été obtenus en MST. En parallèle, je développe des études d'interaction moléculaire par radiomarquage d'un composé de référence (Azeliagon tritié). Elles viendront confirmer les résultats obtenus en MST et permettront de compléter les résultats par la détermination de K_i (études de compétition).

L'étude fonctionnelle des différents Hits sélectionnés sera effectuée sur des cellules HEK-293 transfectées de manière stable avec RAGE Full-Length (protéine entière), avec le dominant négatif (sans la partie cytoplasmique) ou la forme N-tronquée (sans le domaine de liaison N-terminal) (en cours de validation au laboratoire). Les cellules seront stimulées avec des ligands de RAGE (HMGB1, S100A6, S100A12 ou la CML) en présence ou en absence des hits sélectionnés. La mesure du stress oxydant par cytométrie en flux et la technique de gène rapporteur NF-Kb/luciférase nous permettront d'identifier les meilleurs antagonistes des voies oxydantes et inflammatoires médiées par RAGE. Ces études seront complétées par l'analyse des expressions d'Akt et Erk en western blot et de l'IL-6 et du TNF α en RT-qPCR.

En collaboration avec d'autres membres de l'équipe, une fois la fonctionnalité des hits confirmée, ceux-ci seront testés sur un modèle de cardiomyocytes afin de déterminer les antagonistes qui bloquent l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par l'activation du RAGE. Nous utiliserons également le modèle *C. Elegans* (exprimant le RAGE humain) pour étudier la modulation *in vivo* de la génération contrôlée et prolongée de ROS par les antagonistes de RAGE et son impact sur la longévité du ver. Enfin, les leads seront évalués sur un modèle murin de vieillissement rénal induit par la CML.

ABSTRACT

Uncontrolled and persistent inflammation is a determining factor in the speed of the ageing process and can become the fundamental basis for many chronic diseases, including rheumatoid arthritis (RA), inflammatory bowel disease (IBD), metabolic disorders (diabetes and obesity), cardiovascular disorders (ischemic heart disease, atherosclerosis), neurodegenerative diseases (Parkinson's and Alzheimer's) and cancer. Inflammatory diseases are among the most common causes of chronic disease worldwide. The increasing burden of healthcare costs can be attributed primarily to the severity and complexity of inflammatory disorders.

At the same time, a growing number of studies involves RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products), a transmembrane protein of the immunoglobulin-like receptor superfamily, in age-related disorders. The induction of RAGE by its ligands (AGEs, DAMP, HMGB, S100 proteins, etc.) is often associated with pro-inflammatory and pro-oxidative activity. These studies, as well as other results, lead to the hypothesis that RAGE inhibition (gene invalidation or activity antagonism) is capable of preventing and controlling not only acute but also chronic inflammation.

The research project I am defending today concerns the development and validation of *in vitro* models to assess the affinity and functionality of potential antagonists of this receptor.

Using an ELISA kit mainly designed to screen for inhibitors of the AGE2 (glyceraldehyde-modified AGE)-RAGE (soluble RAGE) interaction *in vitro*, I have so far tested 169 molecules, representative of distinct chemical families, from the HEI (Ecole des Hautes Etudes d'Ingénieur) chemical library. This first screening allowed me to identify 15 hits presenting a potential of inhibition of the AGE2-SRAGE interaction comparable, or even better than Azeliragon (reference inhibitor). The cytotoxicity study of these hits on a HEK293 cell model was performed and was negative. In order to study the affinity of these hits for RAGE, the development of HEK-293 cells stably transfected with RAGE Full-length (whole protein), coupled in its C-terminal part with GFP (Green Fluorescent protein), currently allows me to determine in a complementary way, by the technique of Microscale Thermophoresis (MST), the dissociation constants (Kd) of potential RAGE inhibitors. Preliminary results of Kd for 3 hits have been obtained in MST. In parallel, I am developing molecular interaction studies by radiolabeling of a reference compound (tritiated Azeliragon). They will confirm the results obtained in MST and will allow to complete the results by Ki determination (competition studies).

The functional study of the different selected Hits will be carried out on HEK-293 cells transfected stably with RAGE Full-Lenght (whole protein), with the negative dominant (without the cytoplasmic part) or the N-terminal binding domain (without the N-terminal binding domain) (under validation in the laboratory). The cells will be stimulated with RAGE ligands (HMGB1, S100A6, S100A12 or CML) in the presence or absence of the selected hits. The measurement of oxidative stress by flow cytometry and the NF-Kb/luciferase reporter gene technique will allow us to identify the best

antagonists of the oxidative and inflammatory pathways mediated by RAGE. These studies will be complemented by the analysis of Akt and Erk expression in western blot and IL-6 and TNF expression in RT-qPCR.

In collaboration with other members of the team, once the functionality of the hits is confirmed, they will be tested in a cardiomyocyte model to determine the antagonists that block the cardiomyocyte hypertrophy induced by RAGE activation. We will also use *C. Elegans* model (expressing human RAGE) to study the *in vivo* modulation of the controlled and prolonged generation of ROS by RAGE antagonists and its impact on the longevity of the worm. Finally, leads will be evaluated in a mouse model of CML-induced renal aging.

SOMMAIRE

PARTIE 1 :

2002-2019 TRAVAUX DE RECHERCHE POSTERIEURS AU DOCTORAT

I-2001-2005 Contrat Post-Doctoral Unité INSERM U545.....	11
la) Les macrophages et l'athérosclérose : identification et étude de certains gènes impliqués dans la formation des cellules spumeuses, l'inflammation artérielle et la rupture des plaques d'athérome. Effet protecteur de l'acide Boswellique.....	11
Introduction.....	11
Présentation du sujet.....	11
Résultats obtenus.....	12
lb) L'athérogénèse : rôle anti-inflammatoire de la Thioredoxine-1 humaine extracellulaire.....	12
Introduction.....	12
Présentation du sujet.....	12
Résultats obtenus.....	13
II-2006-2010 Poste de MCU EA 2692 (Pr J.P. Hénichart).....	14
Etude du mécanisme d'action d'inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR sur des lignées cancéreuses prostatiques humaines.....	14
Introduction.....	14
Présentation du sujet.....	14
Résultats obtenus.....	15
III-2011-2015 Poste de MCU EA 4483 (Pr F. Broly).....	15
Etude de la susceptibilité génétique du tissu prostatique face à son environnement chimique.....	15
Introduction.....	15
Présentation du sujet.....	15
Résultats obtenus.....	16

IV-2015-2019 Poste de MCU Unité INSERM U995 (Pr P. Desreumaux)	17
IVa) Etude de l'affinité ainsi que de la fonctionnalité d'antagonistes potentiels des récepteurs CB2 et P2X7 dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)	17
Introduction.....	17
Présentation du sujet.....	17
Résultats obtenus.....	18
IVb) Etude de l'affinité d'antagonistes potentiels du récepteur 5-HT6 et étude de la cytotoxicité d'agonistes potentiels du récepteur sigma-1 dans le traitement de maladies neurodégénératives	19
Introduction.....	19
Présentation du sujet.....	19
Résultats obtenus.....	20

PARTIE 2:

2020 TRAVAUX DE RECHERCHE ACTUELS ET PERSPECTIVES

I-Contexte scientifique des travaux de recherche actuels	22
Ia) Présentation de l'Unité Inserm U1167 - RID-AGE - Facteurs de Risque et Déterminants Moléculaires des Maladies liées au Vieillessement	22
Ib) Projet de recherche de l'équipe 5 « Glycation: from inflammation to aging »	22
II-Caractérisation du Récepteur aux AGE (RAGE) : état de l'art	24
IIa) Le récepteur aux produits de glycation avancée (RAGE)	24
Structure du RAGE.....	24
Isoformes de RAGE.....	29
Ligands de RAGE.....	30
<i>Les Produits de glycation avancée (AGEs)</i>	30
<i>Les protéines S100 (calgranulines)</i>	33
<i>Les fibrilles amyloïdes</i>	34
<i>HMGB1</i>	34
<i>L'acide quinoleique</i>	35

<i>Autres ligands de RAGE</i>	35
IIb) Pourquoi le RAGE est un récepteur multiligands ?	35
IIc) Signalisation intracellulaire après l'activation de RAGE	36
IId) Pathologies associées à l'activation de l'axe ligand-RAGE	38
IIe) RAGE en tant que cible thérapeutique : inhibiteurs connus de RAGE	40
Inhibiteurs de RAGE : domaine extracellulaire	40
<i>FPS-ZM1</i>	41
<i>L'Azeliragon (TPP488)</i>	41
III- Objectifs	44
IV- Contribution personnelle : développement d'un modèle d'étude d'interactions moléculaires	46
IVa) Etude de l'interaction moléculaire de ligands potentiels de RAGE à l'aide d'une molécule de référence radiomarquée	46
Radiomarquage du FPS-ZM1	47
Modèle cellulaire sur-exprimant le RAGE	48
Principe de la méthode	48
Résultats.....	50
IVb) Etude de l'interaction moléculaire de ligands potentiels de RAGE à l'aide d'un kit ELISA	54
Principe de la méthode	54
Résultats.....	56
IVc) Etude de l'interaction moléculaire de ligands potentiels de RAGE par la technique de thermophorèse à microéchelle (MST)	57
Principe de la méthode	58
Résultats.....	59
IVd) Etude de la fonctionnalité des composés sélectionnés	62
Principe de la méthode	62
Résultats.....	62
V- Conclusion, perspectives et valorisation	65
VI- Références	69

ABREVIATIONS

AD (Alzheimer Disease)
ADAM-10 (A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10)
AGE (Advanced Glycation End-products)
AOPPs (Advanced Oxydation Protein products)
AP1 (Activator Protein-1)
BCAE1 (Beta-site APP-Cleaving Enzyme 1)
BPCO (Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive)
CEL (carboxyethyllysine)
CML (carboxyméthyllysine)
CML-BSA (CML-serum albumine bovine)
cRAGE (clived RAGE)
DAMP (damage-associated molecular patterns)
dCML (dietary CML)
DIAPH1 (Diaphanous-related formin 1)
DN-RAGE (Dominant Negative-RAGE)
EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)
ELISA (Enzymes Linked Immunoabsorbant Assay)
ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2)
esRAGE (endogenous soluble RAGE)
gDNA (genomic DNA)
GLO1 (Glyoxalase-I)
GlpA (Glycérol-Phosphate déshydrogénase A)
GO (glyoxal)
GOLD (glyoxal-lysine dimer)
HMGB1 (high mobility group box 1)
HRP (Horse Radish peroxidase)
HSP70 (Heat Shock Protein 70)
IL1-β (Interleukin-1 β)
JAK (Janus kinase)/**STAT** (Signal Transducer and Activator of Transcription proteins)
JNK (c-Jun N-terminale kinase)
K_d (dissociation Constant)
K_i (inhibition Constant)
LPA (Lysophosphatidic Acid)
Mac-1 (Macrophage-1 antigen (intégrine de type beta2))
MAPK (Mitogen activated Protein Kinases)
MAPK (mitogen-activated protein kinase)
MCP-1 (*Monocyte Chemotactic protein-1*)
mDia1 (Protein Diaphanous homolog 1)
MG (méthylglyoxal)
MG-H1 (Méthylglyoxal hydroimidazolone)
MMP-9 (matrix metalloproteinase-9)
MMPs (métalloproteinases)
MOLD (méthylglyoxal-lysine dimer)
MRC (Maladie Rénale Chronique)
MST (Microscale Thermophoresis)
mtDNA (mitochondria DNA)
MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88)
NF-κB (nuclear factor κ-light-chain enhancer of activated B cells)
NOX1 (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase 1)
P2X7R (P2X7 Receptor)

PAMP (pathogen-associated molecular patterns)
PI3K/AKT (phosphatidylinositol 3-kinase)
PKCζ (Protein kinase C ζ)
PLGA (*PolyLactic-co-Glycolic Acid*)
PPARγ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ)
PRR (pattern recognition receptors)
RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products)
RAGE FL (RAGE full-length)
REDD2 (*RElated in Development and DNA Damage response 2 gene*)
SASP (senescence-associated secretory phenotype)
sRAGE (soluble RAGE)
TIMP-1 (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*)
TIRAP (Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein)
TLR (Toll-like Receptor)
Trx-1 (Thiorédoxine-1)
VDUP1 (Vitamin-D3 Up-regulated Protein-1)

PARTIE 1 :

2002-2019 TRAVAUX DE RECHERCHE

POSTERIEURS AU DOCTORAT

J'ai suivi une formation scientifique en biologie cellulaire et biochimie à l'université de Paris 7. Mon DEA (Stress oxydant et pathologies associées, université Paris V, validé en 1998), ainsi que ma thèse de doctorat de l'université de Lille2 en sciences pharmaceutiques (soutenue en 2001) ont été réalisées dans le laboratoire du Professeur Patrick Duriez au sein de l'unité INSERM U545, dirigée par le Professeur Jean-Charles Fruchart. Au cours de ma thèse, mon activité de recherche a porté sur l'interaction des lipoprotéines de basse densité oxydées (*LDL Ox*) avec la paroi vasculaire, en particulier les cellules endothéliales.

I-2001-2005 Contrat Post-Doctoral Unité INSERM U545

Après ma thèse, j'ai rejoint le laboratoire du Dr Mustapha Rouis (DR INSERM U545) où j'ai pu m'intéresser à l'étude de gènes potentiellement impliqués dans l'inflammation vasculaire et la stabilité de la plaque d'athérosclérose (Ia). Mon activité de recherche s'est notamment orientée vers l'étude de la régulation du système thiorédoxine réductase / thiorédoxine dans des macrophages humains traités par des LDL oxydées et les propriétés anti-inflammatoires de la thiorédoxine (Ib).

Ia) Les macrophages et l'athérosclérose : identification et étude de certains gènes impliqués dans la formation des cellules spumeuses, l'inflammation artérielle et la rupture des plaques d'athérome. Effet protecteur de l'acide Boswellique.

Introduction

Ces travaux ont fait l'objet de la thèse de Clarisse Cuaz-Perolin (étudiante en pharmacie de Lille2), dont la direction a été assurée par le Dr M. Rouis (50%). J'ai participé à la coordination de ces différents travaux de thèse (50% pour la période 2003-2005 puis 20%). Il est à souligner que j'ai été le maître de stage de Clarisse Cuaz-Perolin lors de la préparation de son DEA.

Présentation du sujet

Les lésions athéroscléreuses sont caractérisées par l'accumulation, au niveau de l'intima artérielle, de macrophages chargés de lipides (cellules spumeuses). Ces lipides proviennent essentiellement de lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées. La transformation des macrophages en cellules spumeuses se manifeste par l'expression de plusieurs gènes ayant un rôle important dans l'inflammation et la rupture des plaques d'athérome. Parmi ces gènes, nous avons identifié l'adipophiline qui joue un rôle clé dans l'accumulation des triglycérides. Nous avons également identifié le gène REDD2 (*RElated in Development and DNA Damage response 2 gene*) et avons montré son rôle dans la toxicité des macrophages à travers l'effondrement de l'expression de la thiorédoxine-1, enzyme oxydo-réductrice, qui a pour conséquence l'augmentation des radicaux oxygénés intracellulaires. Ce mécanisme entraîne la mort des macrophages par nécrose accentuant localement

l'inflammation. De plus, nous avons observé une surproduction par les macrophages nécrosés des métalloprotéases (MMPs) et notamment de la métallo-élastase (MMP-12) sans augmentation de l'expression de leur inhibiteur spécifique, le TIMP-1 (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*). Ce déséquilibre semble contribuer à l'augmentation de l'inflammation et des surfaces des lésions artérielles ainsi qu'à l'induction de l'anévrisme. Nous avons donc évalué l'effet d'une surexpression du gène du TIMP-1 humain sur les lésions artérielles au niveau d'une lignée de souris susceptibles à l'athérosclérose. Nos études ont montré que la surexpression de ce gène n'a pas permis de protéger les souris contre l'athérosclérose. En revanche, une protection significative contre l'anévrisme a été observée. Des études cliniques ont permis de consolider ces résultats en indiquant une association significative entre les taux plasmatiques de la MMP-12 et l'apparition d'anévrisme chez des sujets n'ayant pas de facteurs de risque connus. D'autre part, nous avons étudié l'effet de l'acide Boswellique (un anti-inflammatoire naturel) sur l'inhibition de l'inflammation artérielle chez des souris C57Bl/6.ApoE^{-/-}, susceptibles à l'athérosclérose, traitées avec une endotoxine bactérienne pour mimer un processus inflammatoire. Nous avons pu démontrer que l'acide Boswellique est un puissant inhibiteur de l'inflammation en bloquant notamment l'expression du système NF-κB et de gènes qui en dépendent comme MCP-1 (*Monocyte Chemotactic protein-1*). L'effet de l'acide Boswellique se traduit par une forte baisse de la surface des lésions artérielles sur le même modèle de souris. En conclusion, nos études ont permis d'identifier des gènes impliqués dans la transformation des macrophages en cellules spumeuses, la mort cellulaire et la fragilisation de la paroi artérielle. Ces gènes pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques dans l'athérosclérose.

Résultats obtenus

Ces travaux ont donné lieu à 3 publications :

- C. Cuaz-Perolin *et al.*, *J. Vasc. Res.* (2006) 43, 493-501
- G. Larigauderie *et al.*, *FEBS Journal* (2006) 273, 3498-3510
- C. Cuaz-Perolin *et al.*, *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2004) 24, 1830-1835

Ib) L'athérogénèse : rôle anti-inflammatoire de la Thiorédoxine-1 humaine extracellulaire

Introduction

Ces travaux font l'objet de la thèse de Ludivine Billiet dont la direction a été assurée par le Dr M. Rouis (50%). J'ai participé à la coordination de ces différents travaux de thèse (50%). Il est à souligner que j'ai été le maître de stage de Ludivine Billiet lors de la préparation de son DEA.

Présentation du sujet

Les thiorédoxines, dont il existe trois formes chez l'homme, sont des protéines qui présentent une activité oxydo-réductase et qui sont exprimées de manière ubiquitaire dans les cellules de

mammifère et de procaryote. Parmi les trois formes connues de thiorédoxine, le gène codant pour la thiorédoxine-1 (Trx-1), cytoplasmique, est le plus étudié. La Trx-1 est connue pour être également une protéine qui peut être sécrétée, nous nous sommes alors intéressé, dans un premier temps, à son rôle extracellulaire.

Comme les macrophages sont des cellules fortement impliquées dans de nombreuses pathologies inflammatoires dont l'athérosclérose, nous avons donc évalué l'impact de la Trx-1 recombinante humaine (Trx-1rh) sur l'expression de gènes, par puces à ADN, dans des macrophages humains activés par le LPS. Nos résultats montrent que la Trx-1rh est capable de réduire les expressions du messenger et de la protéine de l'IL1- β (Interleukine-1 β), cytokine pro-inflammatoire, de façon concentration-dépendante. Cet effet résulte en partie de la réduction de l'activation de NF- κ B, facteur de transcription impliqué dans l'activation de l'IL1- β . Nous avons également montré que la diminution de l'activité de NF- κ B est le résultat de la diminution des expressions (ARNm et protéines) des sous-unités p50 et p65 d'une part et de la diminution de l'ARNm et de la protéine de I- κ B d'autre part. En conclusion, cette étude nous a permis de définir un nouveau mécanisme par lequel la Trx-1rh exerce son activité anti-inflammatoire dans les macrophages.

La Trx-1 est connue pour jouer un rôle majeur dans la régulation de la balance redox de la cellule et donc dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans des phénomènes physiologiques telle que la prolifération cellulaire. L'activité de la Trx-1 est connue pour être inhibée par la protéine VDUP1 (Vitamin-D3 Up-regulated Protein-1). Comme le récepteur nucléaire PPAR γ est exprimé par les macrophages humains et que l'activation de PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ) est associée à la diminution de l'expression de gènes proinflammatoires et à l'induction de l'apoptose de ces cellules, nous avons, dans un deuxième temps, étudié l'effet d'un agoniste de PPAR γ , le GW929, sur la régulation de l'expression du gène de VDUP1 dans les macrophages humains. Nous avons montré que le GW929 augmente de manière concentration-dépendante les expressions du messenger (ARNm) et de la protéine de VDUP1 dans les macrophages humains. Les études de transfection de différents fragments du promoteur de VDUP1, complétées par une étude gel shift, nous ont permis de définir la présence d'un élément de réponse fonctionnel pour le PPAR γ dans le promoteur du gène de VDUP1. De plus, l'augmentation de l'expression de VDUP1 par un agoniste de PPAR γ dans les macrophages humains, est associée à une augmentation de l'activité de la caspase 3 et à l'induction de l'apoptose. Ces résultats suggèrent donc que l'activation de PPAR γ induit l'apoptose de macrophages humains en modifiant le statut redox de la cellule *via* la régulation du gène de VDUP1.

Résultats obtenus

Ces travaux ont donné lieu à 3 publications :

- L. Billiet *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2008), 384(3):564-76.
- L. Billiet *et al.*, *J. Cell Physiol.* (2008), 214(1):183-91.
- L. Billiet *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2005) 48, 40310-40318.

J'ai souhaité, au cours de ce post-doctorat, m'initier à l'enseignement et pu ainsi participer de façon active au travail pédagogique effectué auprès des étudiants au cours de travaux pratiques de physiologie et d'histologie en 2^{ème} et 3^{ème} année des études de pharmacie et de travaux pratiques de biochimie clinique en 4^{ème} année des études pharmaceutiques. De plus, j'ai pu dispenser, au cours de la même période, des enseignements de physiologie-anatomie (systèmes cardiovasculaire et musculaire) aux étudiants du **DEUST-TOPS** (Diplôme d'Etude Universitaire Scientifique et Technique – Technologie de l'Organisation dans les Professions de Santé) et des enseignements de biologie cellulaire et moléculaire à des étudiants de 1^{ère} année de l'**Institut Lillois d'Ingénierie de la Santé** (ILIS).

II-2006-2010 Poste de MCU EA 2692 (Pr J.P. Hénichart)

En septembre 2005, la mission qui m'avait été confiée, suite à mon recrutement en qualité de Maître de Conférences en pharmacobiochimie au sein de l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol (ICPAL) dirigé alors par le Professeur J-P Hénichart (EA2692), était de développer et d'animer l'activité du laboratoire de pharmacologie de l'ICPAL. J'ai pu ainsi, en collaboration avec une équipe de pharmacochimistes et d'une composante modélisation moléculaire, mettre en place des dosages d'activités enzymatiques spécifiques et des nouvelles techniques d'exploration moléculaire indispensables à l'évaluation pharmacologique de nouveaux candidats médicaments dans le domaine du cancer.

Etude du mécanisme d'action d'inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR sur des lignées cancéreuses prostatiques humaines.

Introduction

Ces travaux font l'objet de la thèse d'Aurélien Telliez dont la direction a été assurée par le Dr N. Pommery (70%). J'ai participé à la coordination de ces travaux de thèse dès mon arrivée à l'ICPAL (septembre 2005) jusqu'à la soutenance de la thèse (30%).

Présentation du sujet

Le récepteur de l'épidermal growth factor (EGFR) est une protéine tyrosine kinase jouant un rôle clé dans le développement des cellules et tissus normaux et présentant une activité augmentée

dans un grand nombre de cancers, dont le cancer de la prostate. L'objectif de ce travail a été de déterminer le mécanisme d'action d'inhibiteurs potentiels de l'EGFR (4-anilinoquinazolines) *in vitro*, sur des lignées cancéreuses prostatiques humaines hormonodépendantes (LNCaP) et hormonoindépendantes (PC3 et DU145). Les composés synthétisés ont montré un pouvoir proapoptotique et anti-invasif intéressant par rapport à un composé de référence connu, l'Iressa (ZD1839). Afin de progresser dans la compréhension de leur mécanisme d'action, des analyses de puces à ADN, QPCR et western blot ont été menées et ont permis de déterminer l'impact des composés sur l'expression de certains gènes.

Résultats obtenus

Ces travaux ont donné lieu à 1 publication :

- A. Telliez *et al.*, *Anticancer Agents Med Chem* (2006), 6, 187-208.

Suite au départ à la retraite du directeur de l'équipe EA2692 (Pr. J-P Hénichart) et d'une réorganisation de l'équipe de recherche, j'ai décidé de rejoindre l'équipe dirigée par le Professeur F. Broly en septembre 2008 (EA4483 : Impact de l'environnement chimique sur la santé humaine). Au sein de son groupe de recherche, il m'a été confié l'étude de la susceptibilité génétique du tissu prostatique face à son environnement chimique (polluants et/ou médicaments). Dans ce cadre, j'ai pu également développer une thématique de recherche concernant le développement d'une formulation nanoparticulaire d'inhibiteurs de la tubuline, connus ou innovants, dans le traitement du cancer de la prostate (d).

III-2011-2015 Poste de MCU EA 4483 (Pr F. Broly)

Etude de la susceptibilité génétique du tissu prostatique face à son environnement chimique.

Introduction

Ces travaux ont fait l'objet de la thèse de Delphine Le Broc-Ryckewaert dont la direction a été assurée par le Dr N. Pommery (50%). J'ai participé à la coordination de ces différents travaux de thèse (50%).

Présentation du sujet

Il existe une immense diversité génétique d'un individu à l'autre, due au caractère polymorphe du génome humain. L'efficacité des enzymes impliquées dans le métabolisme des cancérogènes (activation ou détoxification en vue de l'élimination de l'organisme) dépend des variations

nucléotidiques présentes dans le génome (polymorphismes génétiques). Ces différences d'efficacité des enzymes sont susceptibles de moduler les effets génotoxiques des facteurs environnementaux. La situation est encore plus complexe dans le cas des cancers hormono-dépendants, puisque de nombreuses enzymes polymorphes sont impliquées dans le métabolisme hormonal.

Nous avons mesuré dans la prostate (non pathologique et pathologique), l'expression d'un ensemble cohérent de gènes connus ou suspectés de coder (nous en avons prédéfinis 380), chez l'homme, des enzymes, des transporteurs ou des facteurs nucléaires impliqués dans la prise en charge cellulaire des xénobiotiques. Sur les 380 gènes prédéfinis, 300 sont exprimés à la fois dans le tissu cancéreux et dans le tissu non pathologique (étude menée sur 15 patients). Cependant, nous avons noté des différences d'expression pour certains d'entre eux entre les deux tissus. Nous avons ensuite évalué l'impact de ces différences d'expression sur les capacités métaboliques du tissu prostatique. De plus, nous avons également étudié, *in vitro*, l'impact (survie cellulaire, modification des capacités métaboliques...), d'un polluant chimique, le cadmium (connu comme facteur de susceptibilité dans la survenue du cancer de la prostate) sur des cultures primaires de cellules épithéliales prostatiques humaines ou la lignée cancéreuse hormono-indépendante PC3. Nous avons montré qu'une concentration de 5 μM de cadmium modifiait l'expression de certains gènes du métabolisme et que ces différences d'expression influençaient l'activité pharmacologique (effet antiprolifératif) de médicaments anticancéreux (poisons du fuseau).

Nous avons poursuivi ce travail par l'étude pharmacologique de nouvelles formulations nanoparticulaires, contenant du paclitaxel, sur une lignée cancéreuse prostatique humaine hormono-indépendante PC3. Le paclitaxel est un anticancéreux actif sur les microtubules et présente une faible solubilité d'où l'intérêt de son utilisation dans cette étude. Nous avons pour cela synthétisé et caractérisé des nanoparticules de type PLGA (*poly(lactic-co-glycolic acid)*), de charge et de taille différentes, dans lesquelles nous avons encapsulé le paclitaxel avec une efficacité d'encapsulation variant entre 65 et 85%. Les résultats que nous avons obtenus montrent que des cellules PC3 traitées par des nanoparticules contenant du paclitaxel, de taille inférieure à 100 nm (partie innovante de ce projet), chargées négativement ou positivement diminuent de façon significative la viabilité et augmentent de façon significative l'effet antiprolifératif de ces cellules comparé à des cellules traitées par le paclitaxel seul. Des études de microscopie confocale ont montré une délivrance cytoplasmique de ces nanoparticules dans les cellules PC3.

Résultats obtenus

Ces travaux ont donné lieu à 2 publications :

- N. Wlodarczyk, *et al. J. med. Chem.*, (2011), 54: 1178-1190
- Le Broc-Ryckewaert D *et al. Int J Pharm.* (2013), 454(2):712-719.

En parallèle de ces travaux de recherche j'ai mis en place, avec le soutien financier de l'ICPAL et du PRIM (Pôle de Recherche Interdisciplinaire pour le Médicament), **une plateforme de binding** (interaction moléculaire) dont je suis le **responsable scientifique** depuis septembre 2008.

En janvier 2015, j'ai rejoint l'unité de recherche Inserm U995 dirigée par le Pr Pierre Desreumaux et plus particulièrement l'équipe dirigée par le Pr Philippe Chavatte (Therapeutic Innovation Targeting Inflammation) où je me suis plus largement consacré à la mise en place de protocoles d'étude de l'interaction moléculaire de ligands potentiels de récepteurs d'intérêts impliqués dans les MICI, dont le récepteur P2X7.

IV-2015-2019 Poste de MCU Unité INSERM U995 (Pr P. Desreumaux)

IVa) Etude de l'affinité ainsi que de la fonctionnalité d'antagonistes potentiels des récepteurs CB2 et P2X7 dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

Introduction

Ce travail fait partie de collaborations initiées avec le laboratoire du Pr P. Chavatte, responsable de l'équipe de chimie thérapeutique au sein de l'équipe Inserm UMR995.

Présentation du sujet

La caractérisation pharmacodynamique d'un candidat médicament impliquant tout d'abord l'étude, *in vitro*, de son affinité pour sa cible moléculaire, j'ai, à l'aide de molécules radiomarquées, participé ou mis en place des protocoles destinés à la mesure de l'affinité et/ou de la fonctionnalité de ligands potentiels de récepteurs biologiques d'intérêts.

Dans ce cadre, j'ai mis en place, en collaboration avec l'équipe du Pr Philippe Chavatte (U995), les méthodologies qui ont permis l'étude des interactions moléculaires d'agonistes du récepteur aux cannabinoïdes CB2, molécules potentiellement impliquées dans le traitement de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Ce projet, débuté en 2009, avait pour objectif de concevoir et synthétiser de nouveaux agonistes CB₂ destinés au traitement des MICI mais également au traitement des douleurs intestinales ou abdominales (troubles fonctionnels intestinaux ou syndrome de l'intestin irritable) qui touchent 10 à 20 % de la population mondiale. Le système endocannabinoïde a été identifié au sein du tractus gastro-intestinal et joue un rôle dans la motilité intestinale et l'inflammation. De nombreuses études ont montré l'importance du récepteur CB₂ dans la médiation des effets protecteurs de l'intestin lors d'épisodes inflammatoires. Ma contribution dans ce projet a

été la mise en place des études de l'affinité et de la fonctionnalité de ligands potentiels du récepteur CB₂ humain (Plateforme de Binding). Plusieurs composés présélectionnés ont été évalués sur différents modèles expérimentaux de colite et de douleur viscérale chez la souris et le rat.

Le récepteur P2X7 (P2X7R) a été identifié dans de nombreuses études comme un acteur clef lors de phénomènes inflammatoires. L'inhibition de son activité entraîne notamment la diminution de la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β dans de nombreux modèles cellulaires inflammatoires. Par une approche de type « ligand-based » et grâce à une expertise de modélisation moléculaire développée au sein de notre laboratoire, notre équipe de chimistes a synthétisé de nombreux antagonistes potentiels du récepteur P2X7 humain. Grâce à deux collaborations distinctes menées d'une part avec le laboratoire du Dr S. Adriouch à Rouen (U905 (collaboration effective depuis septembre 2014)) et celui du Pr F. Nolte (Université de Hambourg, All. (MTA signée en novembre 2016), qui nous ont permis d'obtenir des plasmides codant pour les récepteurs P2X7 et P2X4 humains, nous avons produit des cellules (lignée HEK293) dotées d'une expression stable de ces protéines. Nous avons par la suite ainsi pu tester, d'une part, la fonctionnalité de nos antagonistes potentiels par une méthode de cytométrie en flux, à l'aide de fluorochromes spécifiques permettant d'étudier le flux calcique à travers le récepteur d'intérêt ainsi que la formation d'un large pore, et d'autre part, l'affinité et la sélectivité de nos composés vis-à-vis de ces récepteurs. Les résultats obtenus nous ont permis de mieux comprendre le mode d'interaction de nos composés avec le récepteur d'intérêt (compétiteurs du site ATP ou ligands allostériques) et d'affiner ainsi leur structure chimique afin de potentialiser leur fonctionnalité.

Résultats obtenus

Ces travaux ont donné lieu à 13 publications :

- Spencer J, *et al. Tetrahedron Lett* (2012), 53 (13): 1656-1659.
- El Bakali J *et al. J. Med Chem.* (2012), 55(20): 8948-8952.
- Gembus V, *et al. Eur. J. Med. Chem.* (2012), 58: 396-404.
- Lipka E *et al. Chromatographia* (2012), 75: 337-345.
- Renault N, *et al. Chem Biol Drug Des.* (2013), 81(4):442-454.
- Baudelet D *et al. J Chromatogr A.* (2014), 1363:257-269.
- Baudelet D, *et al. Electrophoresis* (2014), 35(19):2892-2899.
- Baudelet D *et al. J Chromatogr B.* (2015), 986-987:35-43.
- Homerin G, *et al. Tetrahedron Lett* (2016), (57)1165-1170.
- Furman C *et al. Electrophoresis* (2017), (19)2536-2541.
- Homerin G *et al. J Med Chem* (2017), (54)151-163.
- Homerin G *et al. J Med Chem* (2020), (5):2074-2094.
- L. Douguet *et al. Nature Cancer* (2020), N° soumission: #: NATCANCER-A01173 (*en révision*)

En tant que plateforme, je collabore également à l'étude d'affinités et/ou de fonctionnalités de composés potentiellement impliqués dans le traitement d'autres pathologies. Ainsi, des études

d'interaction moléculaire d'antagonistes potentiels du récepteur sérotoninergique 5-HT₆, d'agonistes potentiels du récepteur sigma-1 et d'antagonistes potentiels du récepteur purinergique A_{2a} dans le traitement de maladies neurodégénératives ont été, ou sont actuellement développés.

IVb) Etude de l'affinité d'antagonistes potentiels du récepteur 5-HT₆ et étude de la cytotoxicité d'agonistes potentiels du récepteur sigma-1 dans le traitement de maladies neurodégénératives

Introduction

Ce travail fait partie de collaborations initiées avec le laboratoire du Pr P. Melnyk, responsable de l'équipe de chimie thérapeutique onco-neuro au sein de l'équipe Inserm UMR1172.

Présentation des sujets

Récepteur 5-HT₆

Les récepteurs 5-HT₆ sont des récepteurs couplés aux protéines G qui interagissent avec les systèmes de transmission cholinergique, glutamatergique, GABAergique et dopaminergique. Dans le système nerveux central, ces récepteurs ont été considérés comme des cibles thérapeutiques potentiels dans la prise en charge de pathologies telles que la psychose, la perte de poids ou la maladie d'Alzheimer. Des composés de type benzothiazolone, dans lesquels une chaîne alkylamino et un cycle aromatique aux positions 3 et 6 de cet hétérocycle respectivement selon un pharmacophore précédemment publié, ont été synthétisés. Les composés finaux ont été évalués dans des études d'affinité vis-à-vis du récepteur 5-HT₆ à l'aide d'un radioligand radiomarqué de référence. Leurs effets cytotoxiques potentiels ont été déterminés sur la lignée cellulaire de neuroblastome humain SY5Y. Les résultats de ces études ont révélé que la plupart d'entre eux présentaient une inhibition inférieure à 50% à 100 nM, par rapport au dérivé SB 271046, qui lui présente un K_i de 1,7 nM. Le composé avec une chaîne diméthylamino en position 3 et un naphtylsulfonylamide en position 6, présente la meilleure affinité de la série sulfonylamide (K_i = 100 nM).

Récepteur sigma-1

Les récepteurs Sigma 1 sont des cibles biologiques qui semblent être impliqués dans des troubles neurodégénératifs et psychiatriques. Ces récepteurs, par leurs fonctions de chaperon, qui contrecarrent le stress du réticulum endoplasmique et bloquent la neurodégénérescence, peuvent servir de cible pour une nouvelle génération d'antidépresseurs ou d'agents neuroprotecteurs. L'implication de ces récepteurs a également été observée dans la douleur neuropathique et le cancer. Seuls quelques ligands, comme Igmésine et Anavex 2-73, ont été testés dans des essais cliniques. Ainsi,

le développement de ligands sigma 1 est intéressant pour une nouvelle génération de candidats médicaments. Des travaux antérieurs dans le laboratoire ont souligné la puissance des composés bicycliques benzannulés comme ligands potentiels du récepteur sigma-1. Les travaux ont ainsi été étendus à une série de nouveaux composés tricycliques. Des composés dérivés de la carboline et de la phénothiazine ont été conçus et synthétisés. Des études d'affinité par compétition *in vitro* pour les récepteurs sigma 1 et 2 ont montré que la plupart d'entre eux présentaient une forte affinité pour le récepteur sigma 1 ($K_i = 2,5-18$ nM) et une sélectivité vis-à-vis du récepteur sigma 2, sans effets cytotoxiques sur les cellules SY5Y.

Récepteur A2a

L'adénosine est un neuromodulateur ubiquitaire impliqué dans de nombreux processus physiologiques dans le système nerveux central en agissant via différents récepteurs couplés à des protéines G dont le récepteur A2a. Ce récepteur est connu pour son rôle important dans la transmission neuronale et dans le processus dégénératif d'origine extrapyramidale et s'est révélé être ainsi une cible biologique intéressante dans le traitement de maladies neurodégénératives telles que la Maladie de Parkinson et la Maladie d'Alzheimer. L'étude de l'affinité et de la fonctionnalité d'antagonistes potentiels de ce récepteur est réalisée sur notre plateforme de binding.

Résultats obtenus

Ces travaux ont donné lieu à 5 publications :

- Moas Heloire V. *et al.* *Monat Chem.* (2013), 144: 429-435.
- Larchanche PE. *et al.* *Eur J Med Chem.* (2015), 92: 807-817.
- Donnier-Maréchal M. *et al.* *Eur J Med Chem.* (2015), 92:575-582.
- Donnier-Maréchal M. *et al.* *Eur J Med Chem.* (2015), 89:198-206.
- Duroux R. *et al.* *Eur J Med Chem.* (2018), 54:151-163.

PARTIE 2:

2020 TRAVAUX DE RECHERCHE ACTUELS ET PERSPECTIVES

Suite à une réorganisation interne de l'U995 à la fin du quinquennat 2015-2019, j'ai décidé de rejoindre l'équipe du Pr Eric Boulanger (équipe 6 de l'U995), dans la continuité d'une collaboration débutée en 2018, pour intégrer l'Unité U1167 du Pr Philippe Amouyel, au sein de l'équipe 5 dirigée par le Pr Eric Boulanger (Glycation: from inflammation to aging) afin de prendre la co-responsabilité, avec le Dr Alina Ghinet (directrice du laboratoire de chimie, HEI, Yncréa, Lille) du groupe « Drug Discovery ».

I-Contexte scientifique des travaux de recherche actuels

1a)-Présentation de l'Unité Inserm U1167 - RID-AGE - Facteurs de Risque et Déterminants Moléculaires des Maladies liées au Vieillissement.

L'Unité Inserm U1167 RID-AGE, dont la labellisation vient d'être renouvelée (2020-2024), est dirigée par le Pr Philippe Amouyel et s'appuie sur un label d'excellence, le Labex DISTALZ. Elle est constituée de 5 équipes :

- Team 1: Public health and molecular epidemiology of cardiovascular diseases (A. Meirhaeghe);
- Team 2: Molecular determinants of cardiac remodelling and heart failure (F. Pinet);
- Team 3: Molecular determinants of AD and related disorders (J.C Lambert);
- Team 4: Integrative structural biology (I. Landrieu);
- Team 5: Glycation: from inflammation to aging (E. Boulanger).

Cette Unité est supportée par les instances suivantes : l'INSERM, le CNRS, l'Université de Lille (la Faculté de Médecine et la Faculté de Pharmacie), le Centre Hospitalier Universitaire, et l'Institut Pasteur.

L'Unité, qui se concentre sur l'analyse des facteurs de risque et des déterminants moléculaires des maladies liées à l'âge, étudie les maladies cardio-vasculaires et cérébrovasculaires courantes ainsi que les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer sous les angles de l'épidémiologie, de la génétique, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la modélisation animale, de la biologie structurale et des biomarqueurs.

Afin d'étendre le champ de l'exploration, de la clinique vers les mécanismes plus fondamentaux, l'Unité RID-AGE a intégré pour ce nouveau quinquennat, l'équipe 4 dirigée par le Pr I. Landrieu et l'équipe 5 dirigée par le Pr E. Boulanger, équipe à laquelle j'appartiens.

1b)-Projet de recherche de l'équipe 5 « Glycation: from inflammation to aging »

La longévité humaine et le vieillissement dit « en bonne santé » sont des phénotypes complexes influencés par des facteurs génétiques et environnementaux tels que l'alimentation, l'activité physique et les facteurs psychosociaux. Le vieillissement est un processus multifactoriel

complexe caractérisé par une accumulation de changements délétères dans les cellules et les tissus, une détérioration progressive de l'intégrité structurelle et de la fonction physiologique dans plusieurs organes. La glycation, modification post-traductionnelle des protéines, est l'un de ces changements. Elle comprend une série de réactions chimiques complexes entre les dérivés aminés et les sucres réducteurs conduisant à des condensations d'amino-sucre. *In vivo*, la réaction de glycation dépend des concentrations de glucose et de substrat, du renouvellement des protéines et du temps (vieillesse). Les produits finaux de glycation avancée (AGE) constituent un groupe hétérogène de molécules qui sont formées par glycation des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Une autre voie pour former des AGE a été décrite plus récemment : la glycoxydatio. Des composés dicarboxylés hautement réactifs (méthylglyoxal ou glyoxal) peuvent se lier rapidement aux groupes amino pour former des protéines glyquées.

Les êtres humains sont exposés à deux sources principales d'AGE : les AGEs exogènes (exoAGEs) qui sont ingérés dans les aliments et les AGEs endogènes qui se forment dans le corps. Le régime occidental est riche en exoAGEs. Ces derniers se forment lorsque les aliments sont transformés à des températures élevées, telles que la friture, la cuisson au gril, le rôtissage, le grillage et le traitement à haute température utilisés par l'industrie alimentaire (produits laitiers UHT, viandes transformées, céréales de petit déjeuner, etc.). Les AGEs endogènes sont générés et accumulés à des taux plus élevés pendant le diabète (en raison d'une altération du métabolisme du glucose), l'insuffisance rénale (diminution du statut antioxydant et diminution de la clairance de l'AGE), l'inflammation (oxydation) et le vieillissement physiologique (temps). Les AGEs exercent leur toxicité à travers trois mécanismes : la glycation *in situ*, le dépôt d'exoAGEs et l'interaction avec des récepteurs comme RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products).

Pour le quinquennal 2020-2024, le but du projet de recherche de l'équipe est de comprendre par quels mécanismes biologiques, une exposition précoce ou permanente aux AGE, comme la CML alimentaire exogène, participe à l'installation de l'inflammation et en particulier de l'inflammation chronique de bas grade. Un des volets importants de ce projet est l'étude de l'interaction moléculaire de ligands connus du RAGE et, dans ce cadre, je m'intéresse notamment au développement d'antagonistes potentiels de ce récepteur.

II-Caractérisation du Récepteur aux AGE (RAGE) : état de l'art

IIa)- Le récepteur aux produits de glycation avancée (RAGE)

Le RAGE est une protéine présente chez les mammifères et qui appartient à la superfamille des immunoglobulines et à la famille des molécules d'adhésion cellulaire¹. Elle est exprimée dans tous les organes, notamment dans les muscles squelettiques, les poumons, le cœur, le foie et les reins. Elle est également exprimée dans les cellules circulantes de l'immunité adaptative et innée²⁻⁵. Si son expression est relativement faible dans la plupart des tissus dans des conditions basales, le RAGE est plus fortement exprimé dans le poumon, notamment dans l'épithélium alvéolaire^{6,7}. Au moins 20 variants d'épissage de RAGE ont été décrits jusqu'à présent, mais seuls quelques-uns ont fait l'objet d'une protéine entièrement décrite. Les principales isoformes de RAGE sont conservées entre les espèces et l'ARN messager codant pour le RAGE complet (RAGE full-length) est le variant le plus exprimé dans les organes^{8,9}. Avec l'âge, l'expression tissulaire de RAGE est augmentée et pourrait donc jouer un rôle important au cours du vieillissement et les pathologies qui y sont associées¹⁰. Principalement décrite à la membrane plasmique, cette protéine est également exprimée dans le cytoplasme et dans le noyau, où elle pourrait, dans ce dernier, avoir un rôle dans la réparation des dommages causés à l'ADN¹¹.

Structure du RAGE

Le RAGE humain est une protéine transmembranaire constituée d'un domaine extracellulaire (résidus d'acides aminés 23-342), d'un domaine transmembranaire (résidus d'acides aminés 343-363) et d'un domaine cytoplasmique (résidus d'acides aminés 364-404)¹². La structure extracellulaire de RAGE peut être subdivisée en trois domaines de type immunoglobuline : un domaine variable (V) (résidus d'acides aminés 23-116) et deux domaines constants C1 (résidus d'acides aminés 124-221) et C2 (résidus d'acides aminés 227-317) (figure 1).

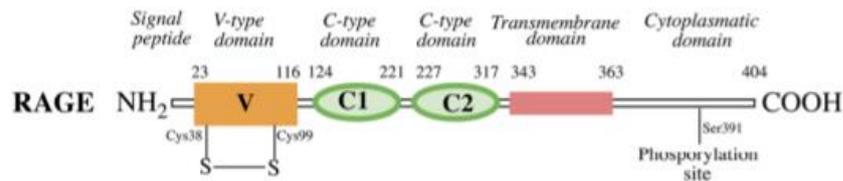
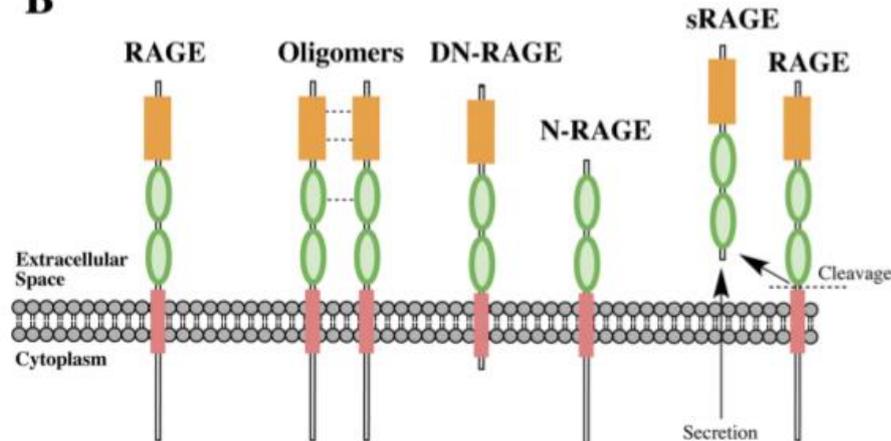
A**B**

Figure 1 : Structure du RAGE complet, y compris le domaine variable (V), les domaines constants (C1 et C2), la région transmembranaire et la queue cytoplasmique. Un pont disulfure entre les Cys38 (brin B) et Cys99 (brin F) relie les deux feuillets β du domaine V (A). Isoformes de RAGE. Les principales isoformes RAGE comprennent (à partir de la gauche) le RAGE complet, le RAGE complet oligomérisé, le RAGE dominant négatif (DN-RAGE), le RAGE N-tronqué (N-RAGE) et le RAGE soluble (sécrété) (sRAGE) (B)¹².

La structure du domaine V est constituée de huit brins (A', B, C, C', D, E, F et G) reliés par six boucles formant deux feuillets β reliés par un pont disulfure entre la Cys38 (brin B) et Cys99 (brin F)^{13,14}(figure 2). Le domaine C1 se replie en un domaine immunoglobuline classique de type C. La surface moléculaire des domaines V et C1 est représentée par une cavité hydrophobe et de grandes zones chargées positivement. Plusieurs liaisons hydrogène et interactions hydrophobes se produisent entre les domaines V et C1. Une cristallographie aux rayons X, une spectroscopie RMN et des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que le domaine extracellulaire VC1 est capable de lier une grande variété de ligands de RAGE à caractère acide (chargés négativement), tels que les AGEs, la famille des protéines de type S100/calgranulines, la protéine HMGB1 (high mobility group box 1), et la protéine β amyloïde ($A\beta$)¹⁵⁻¹⁹.

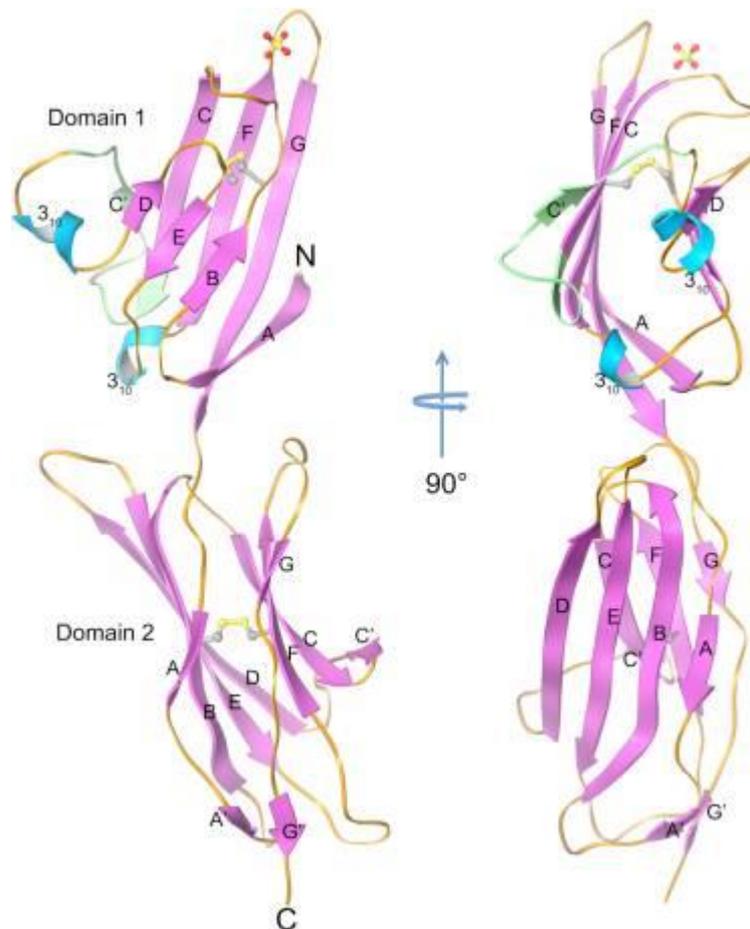


Figure 2 : Diagramme en ruban montrant des vues orthogonales de la structure cristalline du domaine VC1 de RAGE. Domaine 1 = V, domaine 2 = C1²⁰.

En outre, une dimérisation ou une oligomérisation ligand-dépendante de RAGE, par le biais de l'auto-association des domaines V-V ou C1-C1, a été décrite. Ainsi, la structure cristallographique d'un complexe RAGE-S100 englobant le domaine extracellulaire entier du récepteur a révélé un complexe de stœchiométrie 2 : 2 au sein duquel deux molécules de RAGE interagissent de manière symétrique avec la protéine S100A6, un membre de la famille S100, présente sous forme homodimérique. Cette conformation permet de rapprocher les régions proximales à la membrane des deux molécules de récepteur et de fixer leur distance respective à 60 Å, distance qui permet de positionner correctement les domaines cytoplasmiques de deux molécules de RAGE, assurant ainsi la transmission effective du signal dans la cellule²¹ (figure 3). La stabilité d'un tel complexe VC1 oligomérisé pourrait expliquer son affinité/spécificité pour une large gamme de ligands protéiques et la transduction du signal qui en résulte^{13,22-24}.

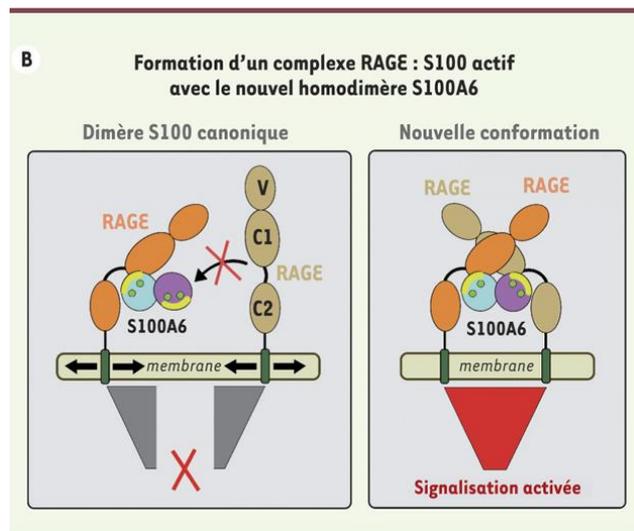


Figure 3 : Modèle illustrant comment la nouvelle conformation du dimère S100A6 permet de recruter deux molécules de récepteur parallèlement à la membrane et de bloquer la position relative de leurs régions transmembranaires à une distance qui semble compatible avec le recrutement de molécules effectrices à l'intérieur des cellules. Le site de liaison à RAGE sur chaque monomère S100A6 est indiqué par un arc jaune tandis que les ions calcium sont représentés par des ronds verts. RAGE : receptor for advanced glycation end-products²¹.

Contrairement au complexe VC1, les données provenant d'expériences de protéolyse, de colorimétrie, de dichroïsme circulaire et de RMN ont décrit C2 comme une unité structurelle indépendante, connectée de manière flexible à C1 par l'intermédiaire de 12 résidus d'acides aminés¹⁶. Par analogie avec le domaine V, les études par diffraction de rayons X et par RMN confirment que C2 existe sous la forme de deux feuillets β composés de huit brins (A, A', B, C, E, F, G, et G') stabilisés par des ponts disulfures entre les brins B et F. La structure C2 semble également inclure une grande surface chargée négativement avec des résidus acides dirigés vers la surface de l'oligomère VC1¹³.

Le domaine extracellulaire (VC1C2) de RAGE humain (UniProtKB Q15109) partage une homologie de séquence de 79,6 %, 79,2 % et 96,5 % avec la souris (Q62151), le rat (Q63495) et le primate (rhésus macaque; F1ABQ1), respectivement²⁵. Les résidus chargés positivement impliqués dans la liaison des AGEs au RAGE, y compris la Lys52, l'Arg98 et la Lys110, sont conservés chez les quatre espèces, ce qui suggère un schéma commun de liaison^{14,18}.

Le domaine transmembranaire de RAGE est une structure hélicoïdale contenant un motif "GxxxG", favorisant l'homodimérisation hélice-hélice du récepteur, qui serait impliqué dans la transduction du signal¹³. L'alignement de séquence et la superposition du domaine C-terminal du RAGE, obtenu par une caractérisation RMN, avec les structures de la glycérol-phosphate déshydrogénase (GlpA), connue pour former un dimère d'hélice transmembranaire, montrent une interaction possible entre deux motifs GxxxG de RAGE et leur implication dans son homodimérisation¹³ (figure 4).

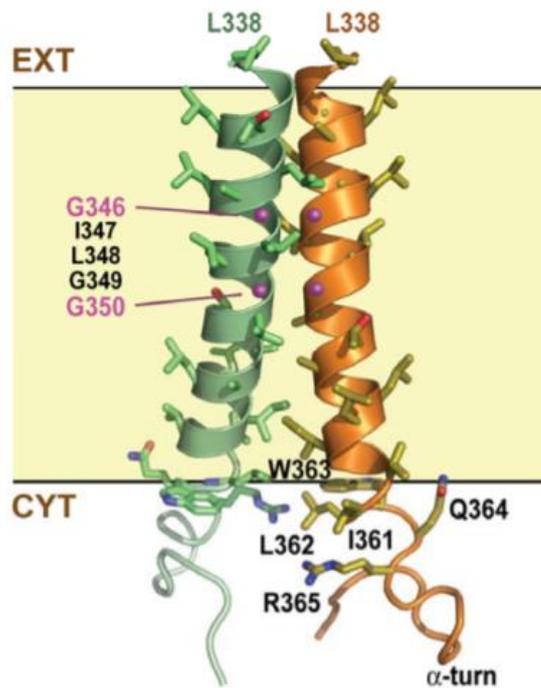


Figure 4 : Probable homodimérisation de RAGE par sa région transmembranaire. Modèle d'homodimérisation en hélice de la partie transmembranaire de RAGE humain (hRAGE) basé sur la structure RMN du dimère de l'hélice transmembranaire de la GlpA et sur la structure RMN de la région terminale C de RAGE humain comprenant les résidus 363 à 376. Les résidus ont été attribués en alignant la séquence 342ALxxGIxxGLxxA354 de hRAGE à la séquence 75LlxxGVxxGVxxT87 de la GlpA. Grâce à la superposition de la partie C-terminale de hRAGE (Trp363 à Pro376), déterminée par RMN, la construction d'un modèle en hélice couvrant les résidus Gly337-Arg365 a été réalisée¹³.

La queue cytoplasmique de RAGE (résidus d'acides aminés 364-404) est constituée de 42 acides aminés. Cette région est divisée en au moins trois parties : un domaine membranaire de 17 acides aminés, riche en acides aminés basiques (Arg366, Arg368, Arg369 et Glu371), un domaine central de 17 acides aminés contenant des acides glutamiques et un site de phosphorylation (Ser391) et une extrémité C-terminale^{26,27}. Des études de liaison *in vitro* ont démontré que ces deux domaines (membranaire et central) sont cruciaux pour l'interaction du domaine cytoplasmique de RAGE avec des molécules effectrices telles que la diaphanous-related formin 1 (DIAPH1), la protéine TIRAP (Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein) et les kinases ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2). Il en résulte une activation intracellulaire de NF- κ B (nuclear factor κ -light-chainenhancer of activated B cells) médiée par la voie de la MAPK (mitogen-activated protein kinase)²⁷. Le domaine cytoplasmique de RAGE joue un rôle important dans la transduction induite par RAGE. Sa délétion, *in vitro et in vivo*, supprime sa fonctionnalité et réduit les effets pathologiques associés^{28,29}.

Isoformes de RAGE

Il existe différentes isoformes de RAGE qui sont dérivées de la structure décrite précédemment (figure 5).

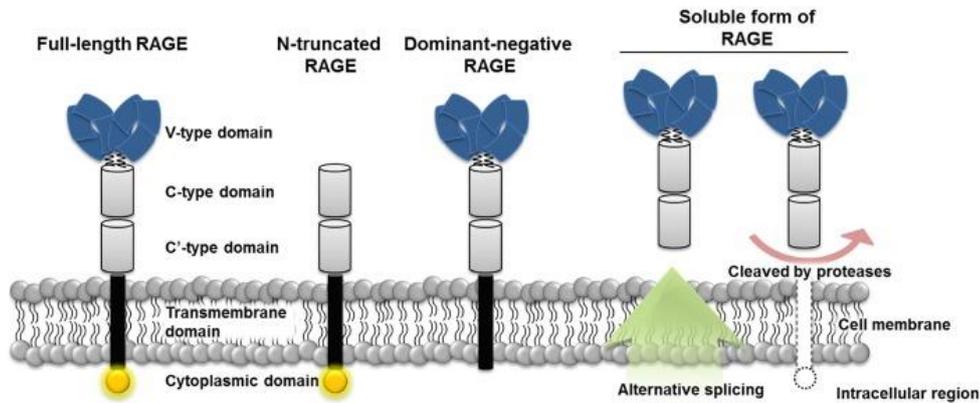


Figure 5 : Structures du récepteur des produits finaux de glycation avancée et ses trois principales isoformes. Le récepteur pleine longueur des produits finaux de glycation avancée (RAGE) possède trois domaines extracellulaires différents (V, C1, C2), un domaine transmembranaire et un domaine cytosolique. L'isoforme N-tronquée ne possède pas de domaine de type V. La forme dominante négative n'a pas de domaine cytosolique. Le RAGE soluble est formé soit par épissage alternatif, soit par l'activité d'une protéase. Il est sécrété et empêche les ligands de se lier au RAGE. V : domaine variable ; C : domaine constant³⁰.

La première isoforme est communément appelée RAGE pleine longueur (FL-RAGE) ou simplement RAGE. Les autres isoformes sont soit le résultat d'un épissage ou d'un clivage alternatif de FL-RAGE. On retrouve ainsi le RAGE dominant-négatif (DN-RAGE) dont le domaine intracellulaire est absent en raison du clivage par une γ -secretase ou un épissage alternatif^{31,32}, le RAGE N-tronqué (Δ N-RAGE), dépourvu du domaine V en raison d'un épissage alternatif³², et le RAGE soluble (sRAGE) qui comprend le RAGE soluble endogène (esRAGE), résultant d'un épissage alternatif⁸, et le RAGE clivé (cRAGE), résultant du clivage constitutif et inductible du domaine extracellulaire de FL-RAGE par des métalloprotéases, dont l'ADAM-10 (A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10) et d'autres métalloprotéases comme la MMP-9 (matrix metalloproteinase-9)^{33,34}. Le domaine intracellulaire, restant attaché à la membrane, peut être libéré par une γ -secretase³⁵. D'autres isoformes ont été décrites, notamment dans le cerveau, mais elles sont beaucoup moins exprimées ou étudiées³². Enfin, d'autres variants d'épissage ont également été décrits mais sans rôle majeur ou conséquences physiologiques associées⁸. Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons principalement à la forme FL-RAGE.

Ligands de RAGE

L'une des principales caractéristiques de RAGE est le nombre et la variété de ses ligands. À ce jour, on en dénombre plus de 20, tous ayant des origines, des rôles et des structures très différents (figure 6).

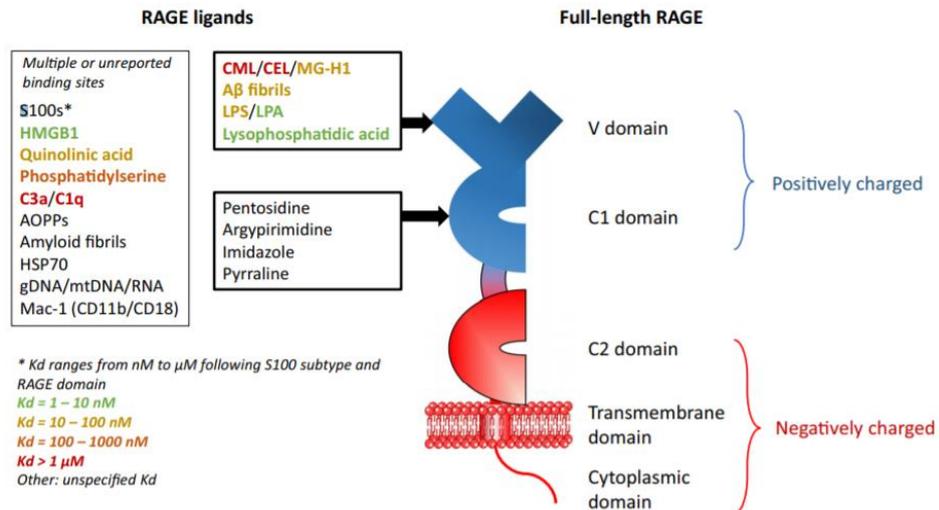


Figure 6 : Ligands de RAGE. La plupart des ligands RAGE interagissent avec le domaine VC1. Abeta : protéine Beta Amyloïde, AOPPs: produits protéiques d'oxydation avancée, CEL : carboxyethyllysine, CML : carboxyméthyllysine, gDNA : ADN génomique, HMGB1 : highmobility group box 1; HSP70 protéine de choc thermique 70 ; LPA : Lipide A du LPS (Lipopolysaccharide), LPS : lipopolysaccharide, Mac-1 :macrophage-1 antigen (intégrine de type beta2) ; MG-H1 : dérivé du méthylglyoxal³⁶

Un certain nombre d'entre eux sont des protéines, des peptides ou des acides aminés chimiquement modifiés, tels que les AGEs (y compris la CML (Carboxy-Methyl Lysine), la CEL (Carboxy-Ethyl Lysine) et la MG-H1), les produits protéiques d'oxydation avancée (AOPP) ou la phosphatidylsérine et les fibrilles amyloïdes. Des protéines impliquées dans les processus inflammatoires peuvent également se lier à RAGE, comme la protéine HMGB1 ou les protéines S100. On trouve également comme ligands de RAGE des composants des parois bactériennes, les lipopolysaccharides (LPS), des molécules plus petites comme l'acide quinoléique ou l'acide lysophosphatidique, et divers types d'acides nucléiques. Beaucoup de ces ligands présentent des motifs moléculaires associés aux PAMP (pathogen-associated molecular patterns), aux DAMP (damage-associated molecular patterns) ou au SASP (senescence-associated secretory phenotype), capables de reconnaître des récepteurs spécifiques appelés PRR (pattern recognition receptors).

Les ligands de RAGE les mieux caractérisés à ce jour sont décrits ci-dessous

Les Produits de glycation avancée (AGEs)

Les produits finaux de glycation avancée (AGE) sont une famille de molécules issues de la réaction entre un nucléophile, tel que le groupe amino d'une lysine, et un composé carbonyle tel que des sucres réducteurs. Une base de Schiff instable est initialement formée, qui évolue vers un produit

d'Amadori plus stable. Ces premiers produits de glycation sont cliniquement représentés par l'hémoglobine glyquée, la fructosamine et l'albumine glyquée (figure 7).

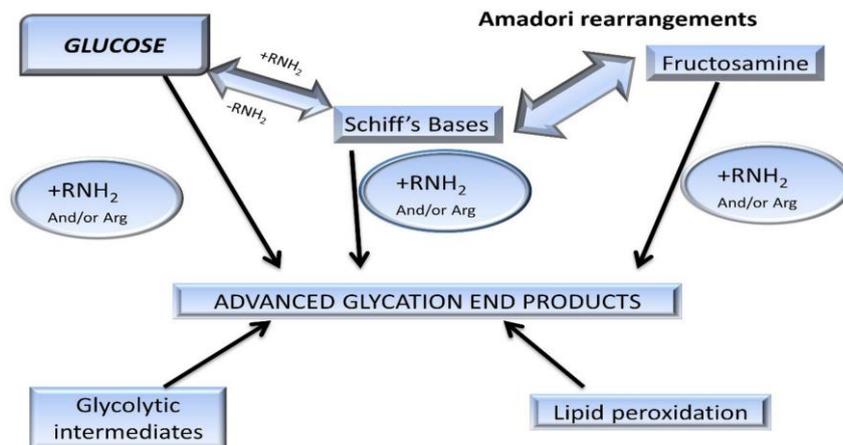


Figure 7 : Voie de la glycation des protéines formant les produits de la réaction de Maillard. Les réarrangements d'Amadori sont mis en évidence dans les premiers produits d'addition réversibles, tels que les bases de Schiff. Ces produits d'addition glyqués sont irréversiblement modifiés en produits finaux de glycation avancée³⁷.

Des réarrangements inter- et intra-moléculaires de la base de Schiff et du produit d'Amadori conduisent à la génération d'oxoaldéhydes tels que le glyoxal (GO), le méthylglyoxal (MG) et la 3-désoxyglucosone qui interagissent rapidement avec des macromolécules, conduisant à la génération irréversible d'AGE. La N ϵ -carboxyméthyllysine (CML) et la N ϵ -carboxyéthyllysine (CEL) sont toutes deux formées la liaison du glyoxal et du méthylglyoxal, respectivement, à une lysine. La CML peut également être le résultat de la fragmentation d'une fructoselysine. La pyrroline est formée par l'addition de désoxyglucosone et conduit à la formation, après réarrangements, d'un cycle stable. Les AGE dérivés de l'arginine semblent plus complexes car les composés carbonylés peuvent réagir avec les deux groupes amino disponibles. Ainsi, l'hydroimidazolone 1 (MG-H1) dérivée du méthylglyoxal et de l'argyrimidine (ou argpyrimidine) possèdent toutes deux un cycle dans leur structure. Enfin, les AGE réticulés, qui nécessitent plus de temps pour se former, sont encore plus complexes dans leur structure car ils impliquent deux acides aminés différents. Le dimère de lysine du glyoxal (GOLD) et le dimère de méthylglyoxal-lysine (MOLD) sont néanmoins des structures assez simples car elles n'impliquent qu'un seul cycle entre deux lysines. La différence entre GOLD et MOLD est définie par la nature (C ou H) du radical lié au cycle. La pentosidine et le glucosepane sont, quant à eux, formés par deux cycles entre une lysine et une arginine (figure 8). Il est à noter que les AGE qui ont un cycle aromatique peuvent être détectés par fluorescence.

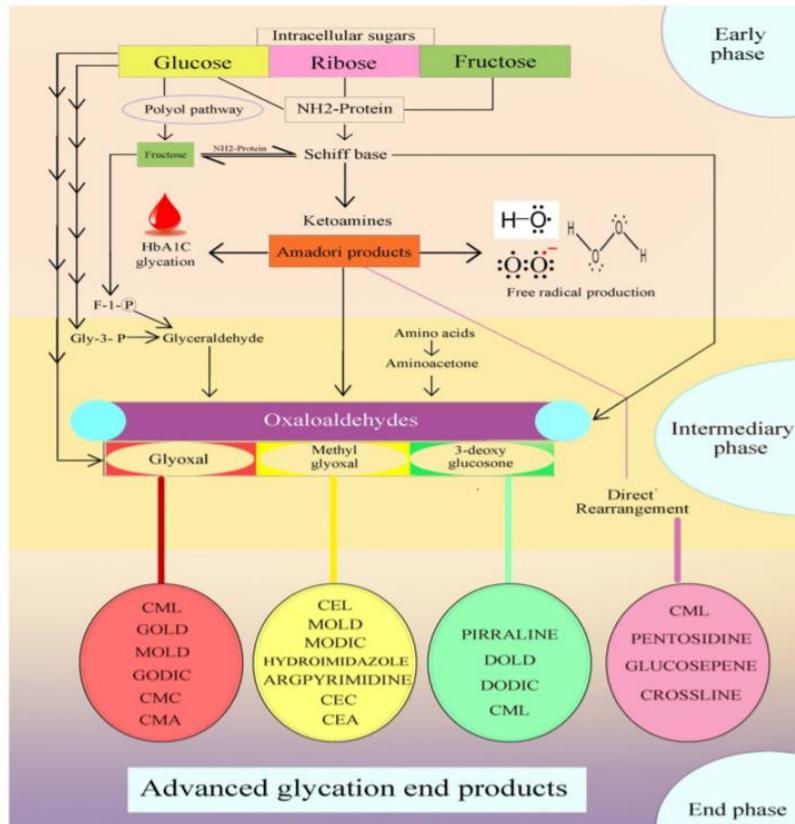


Figure 8: Représentation schématique de la production endogène de produits finaux de glycation avancée. Des réactions non enzymatiques entre des sucres réducteurs et des groupements amino de protéines produisent des bases schiff, qui subissent ensuite un réarrangement d'Amadori. D'autres modifications chimiques, par la voie des polyols, conduisent à des composés carbonyles hautement réactifs (GO, MG et 3-DG) qui réagissent ensuite avec les groupements amino de protéines, formant une variété d'AGE tels que la CML, la CEL, la pyralline, le GOLD, le MOLD etc³⁷

Alors qu'il faut des mois ou des années pour former des AGE *in vivo* à 37°C, ils peuvent être produits en quelques minutes ou secondes par des procédés de cuisson utilisant des températures élevées. Leur concentration *in vivo* est élevée dans des pathologies telles que le diabète³⁸, la maladie d'Alzheimer (AD)³⁹ et la cataracte⁴⁰ et augmente avec l'âge⁴¹. Les tissus composés de protéines avec une demi-vie longue, comme le cristallin ou le collagène, sont plus susceptibles d'accumuler des AGE et sont altérés par cette accumulation^{40,42}. Les AGE se forment de manière endogène ou sont d'origines exogènes et, bien que le RAGE soit désigné comme le récepteur des AGE, il n'est pas démontré aujourd'hui, en raison de leur hétérogénéité (figure 9), que tous soient capables d'interagir avec ce récepteur.

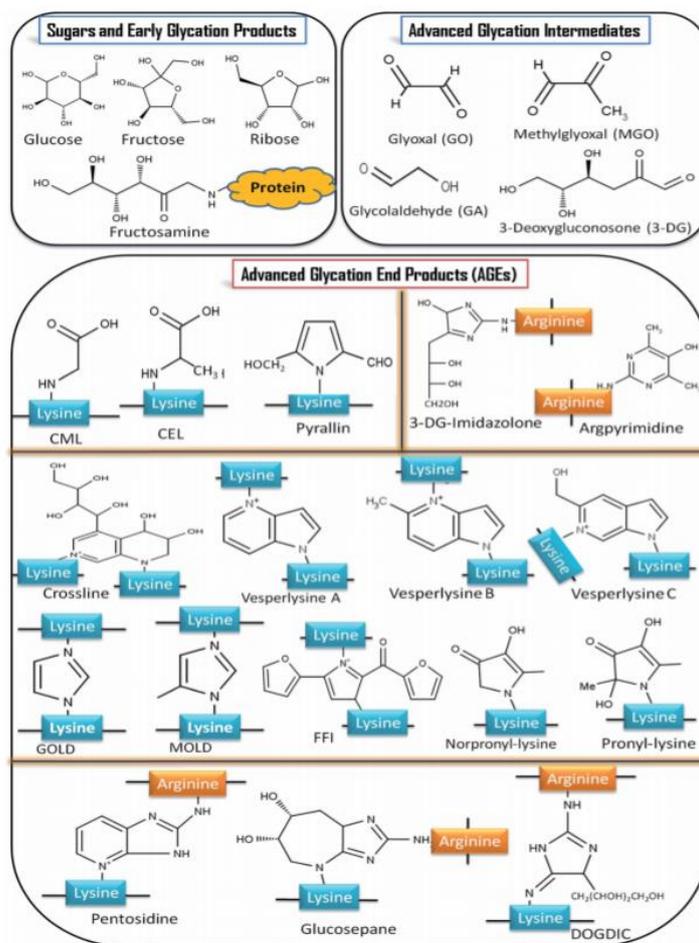


Figure 9 : structures des différents sucres et des produits finaux de glycation précoce, intermédiaire et avancée (Saurabh Awasthi, RCS advances, 2016).

Il a été décrit que l'hydroimidazolone-1 (MGH1) dérivée du méthylglyoxal interagit avec le domaine V de RAGE humain avec un $K_d = 40 \text{ nM}$ ¹⁸. D'autres expériences de RMN et de mesure de la fluorescence ont démontré que la carboxyméthyllysine liée à des peptides et des protéines (CML) ainsi que la carboxyéthyllysine (CEL) étaient également capable d'interagir avec le domaine V avec un $K_d = 100 \text{ } \mu\text{M}$ ^{14,22}. Cependant, la CML et la CEL libres, la lysine modifiée non liée à d'autres résidus d'acides aminés, ne semblent pas interagir avec le RAGE²². Ceci a été confirmé par l'observation qu'un excès de CML libre ne peut inhiber l'interaction de la CML-BSA (CML-serum albumine bovine) avec le 125I-sRAGE dans une expérience de compétition de liaison par radiomarquage⁴³. Des analyses de modélisation moléculaire *in silico* prédisent également que la pentosidine, l'argyrimidine, l'imidazole et la pyralline seraient capables d'interagir avec le domaine C1 de RAGE⁴⁴.

Les protéines S100 (calgranulines)

Un autre groupe de molécules, les calgranulines, a également été signalé comme interagissant avec le RAGE. Les calgranulines représentent la famille de protéines de type S100, liant le calcium et impliquée dans différents processus cellulaires tels que la migration, la prolifération ou la

différenciation cellulaire⁴⁵. Les protéines S100, surexprimées en contexte cancéreux ou lors de cardiomyopathies, sont libérées dans le milieu extracellulaire, interagissent alors avec leur récepteur et déclenchent des voies de signalisation intracellulaires qui activent plusieurs facteurs de transcription, dont NF- κ B et AP1^{46,47}. Il a été démontré que la majorité des 21 membres de la famille des protéines S100 interagissent avec les domaines V, C1 et même C2 de RAGE^{12,48}. Les constantes de dissociation (Kd) calculées pour ces interactions s'échelonnent du μ M au nM et sont dépendantes de l'oligomérisation des protéines S100^{49,50}. Certains travaux suggèrent que la protéine S100B interagit avec les zones chargées positivement du domaine V²², tandis que d'autres suggèrent une interaction hydrophobe dépendante du Ca²⁺ dans la boucle C'D du domaine V²⁰. Les détails de la structure et de la stoechiométrie du complexe RAGE-S100B dans des conditions physiologiques restent encore inconnus et peuvent en fait varier en fonction des protéines membranaires et des peptidoglycanes présents. Des résultats suggèrent que les résidus Trp61 et Trp72 du domaine V pourraient tous deux servir de médiateurs pour la liaison de la protéine S100B à RAGE et donc devenir une cible de choix pour l'élaboration d'antagonistes potentiels⁵¹.

Les fibrilles amyloïdes

Les fibrilles amyloïdes sont définies par des structures insolubles, super enroulées et riches en feuilles formant des fibrilles β . L'enchevêtrement de ces fibrilles constitue le composant principal de la substance amyloïde. De nombreuses protéines telles que le peptide A β , le sérum amyloïde de type A (SAA), les chaînes légères d'immunoglobuline ou même l'insuline peuvent être à l'origine de l'accumulation de fibrilles amyloïdes, encore appelée amylose⁵². L'amylose est liée à un certain nombre de pathologies, notamment la maladie d'Alzheimer où les plaques A β sont augmentées. Il a été démontré que les fibrilles amyloïdes A β interagissent avec le domaine V de RAGE avec un Kd = 70 - 80 nM et que cette interaction joue un rôle dans la neurotoxicité d'A β ^{53,54}. D'autres fibrilles amyloïdes de type SAA, des peptides dérivés de prions et de l'amyline (polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques) ont également été identifiées comme des ligands potentiels de RAGE. Enfin, la transthyrétine (protéine de transport de la thyroxine (T4) et du rétinol (vitamine A) soluble et fibrillaire présente une affinité pour le RAGE, définie par un Kd = 120 nM⁵⁵.

HMGB1

La « High-Mobility Group Box 1 » (HMGB1) est considérée comme la protéine de liaison à l'ADN non-histone la plus abondante. Elle est principalement localisée dans le noyau mais peut transiter vers le cytoplasme lorsqu'elle est acétylée, régulant ainsi sa fonction. En interagissant avec les protéines impliquées dans l'autophagie, l'HMGB1 cytosolique régule potentiellement les processus associés à l'apoptose⁵⁶. L'HMGB1 est impliquée dans la formation des nucléosomes et peut moduler la transcription en interagissant avec les facteurs de transcription et les histones⁵⁷. L'HMGB1 peut

également être libérée dans le milieu extracellulaire par des processus actifs ou passifs. La libération active implique généralement un stress sévère, comme une inflammation ou une ischémie, qui peut inhiber la désacétylation de l'HMGB1 et conduire à sa séquestration dans le cytoplasme jusqu'à ce qu'elle soit finalement sécrétée^{58,59}. La libération passive de l'HMGB1 se produit lors d'un processus de nécrose⁶⁰. L'HMGB1 augmente avec l'âge dans le rein et le foie chez la souris⁶¹. L'HMGB1 circulante est associée à un ensemble de processus pro-inflammatoires, à la sénescence et à diverses pathologies⁶². Parmi les ligands de RAGE, l'HMGB1 a l'une des affinités les plus élevées, avec un $K_d = 25 \text{ nM}$ ¹⁹.

L'acide quinoléique

L'acide quinoléique, un métabolite neuroactif de la voie de la kynurénine, produit sa neurotoxicité en suractivant le récepteur NMDA, ce qui entraîne des déficits énergétiques, un stress oxydant et la mort cellulaire⁶³. L'excès d'acide quinoléique a été impliqué dans le développement de divers troubles neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington. Des études d'interaction moléculaire, effectuées sur les domaines VC1 humain et de rat ont permis d'identifier un schéma de liaison sur sept sites, y compris les sites de liaison connus de la CML, de la CEL et de la MG-H^{14,64}. Le K_d de l'acide quinoléique pour le VC1 a été estimé à environ 43 nM. L'administration, *in vivo*, d'acide quinoléique à des rats a permis l'activation de la voie de signalisation médiée par le RAGE, en augmentant les niveaux de stress oxydant, de lactate déshydrogénase et d'oxyde nitrique, en augmentant l'expression de RAGE, de la cyclooxygénase de type 2 (COX-2) et de NF- κ B, ce qui a conduit à une mort neuronale dose-dépendante du striatum^{64,65}.

Autres ligands de RAGE

D'autres ligands de RAGE, bien que relativement peu étudiés, ont également été identifiés. Le LPS et son composant lipidique A interagissent tous deux avec le domaine V, potentiellement au niveau du site KGAPKKPPQRLEWKLN, avec un $K_d = 35 \text{ nM}$ et un $K_d = 2 \text{ nM}$, respectivement⁶⁵. Le RAGE interagit également avec des oligonucléotides présentant des motifs CpG, l'ADN double brin et l'ARN double brin^{20,66}. La phosphatidylsérine se lie au RAGE avec un $K_d = 0,563 \text{ } \mu\text{M}$ ⁶⁷. L'acide lysophosphatidique, un phospholipide endogène qui joue un rôle dans l'homéostasie et diverses pathologies, se lie également au domaine V de RAGE avec un $K_d = 9 \text{ nM}$ ²⁷.

IIb) Pourquoi le RAGE est un récepteur multiligands ?

Comprendre comment ces différents ligands lient le RAGE et déclenchent une signalisation cellulaire associée est essentiel pour concevoir des candidats médicaments ciblant ce récepteur. Avec un tel répertoire de différents ligands, la connaissance de la structure de la protéine peut non

seulement fournir des informations cruciales pour la conception rationnelle de médicaments, mais également nous éclairer sur la façon dont RAGE réagit en tant que PRR. La plupart des études sur la structure protéique de RAGE se sont concentrées sur le domaine extracellulaire ou de liaison aux ligands, en partie en raison de la difficulté de cristalliser les régions de signalisation transmembranaire et intracellulaire hautement chargées^{15,49,68}. Des analyses structurales ont révélé que la région extracellulaire peut être divisée en deux sous-domaines principaux : une unité structurale formée des domaines V et C1 (VC1), reliée au domaine C2 par une séquence de sept acides aminés. Le domaine VC1 présente une charge nette positive en raison de la teneur élevée en résidus de lysine et d'arginine dans le domaine V. Ceux-ci forment une zone positive à la surface du VC1. En effet, le domaine V de RAGE contient plus d'arginine et de lysine que toute autre protéine de type immunoglobuline contenant un domaine V¹⁵. Les principales caractéristiques communes des ligands de RAGE sont qu'ils contiennent des régions à forte charge négative et peuvent ainsi, en se liant au domaine VC1 chargé positivement, engendrer la formation de multimères⁶⁸. Il semble donc que la formation d'un multimère, au niveau des domaines VC1 de RAGE, soit la forme prédominante pour que la protéine puisse transduire un message cellulaire après la fixation du ligand. Ce domaine VC1 facilite donc la liaison des ligands par une combinaison de résidus chargés positivement et d'une poche hydrophobe créée par la formation d'un homodimère^{15,68}. La dimérisation de RAGE se produit en fonction des résidus d'acides aminés dans les domaines V et transmembranaire^{13,23}. Ainsi, la formation de multimères constitutifs de RAGE à la surface de la cellule, constitués de quatre molécules RAGE ou plus, se produirait avant la liaison du ligand. Ceci est conforté par le fait que les monomères de RAGE présenteraient une affinité relativement faible pour leurs ligands. Ces études révèlent ainsi que pour inhiber ce récepteur, deux approches peuvent être envisagées : empêcher la liaison des ligands au récepteur ou empêcher son assemblage en multimères à la surface de la cellule.

IIc) Signalisation intracellulaire après l'activation de RAGE

Lors de l'interaction avec ses ligands, le domaine intracellulaire de RAGE est phosphorylé par la protéine kinase C ζ (PKC ζ) au niveau de la sérine 391 (Ser391). Les protéines adaptatrices TIRAP (Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein) et MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) se lient alors au RAGE phosphorylé pour transduire une signalisation cellulaire, similaire à celle observée pour les récepteurs TLR (Toll-like Receptor)²⁶. La protéine mDia1 (Protein Diaphanous homolog 1) est également capable d'interagir, via son domaine de type formine (FH1), avec une partie d'un domaine intracellulaire en hélice α de RAGE. L'augmentation de la concentration locale de mDia1 au niveau de la membrane active mDia1 et ses effecteurs cellulaires²⁷, tels que les protéines c-Src, CDC42 et RAC1^{69,70}. Cette voie peut notamment induire l'activation de la NOX1 (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase 1) et donc la production d'espèces réactives de l'oxygène,

la migration cellulaire et l'activation de divers facteurs de transcription. De nombreuses études ont démontré que le stress oxydant, issu de la génération d'espèces réactives de l'oxygène lors de l'activation de RAGE, et la modulation de l'expression de certains gènes étaient inhibés en présence d'antioxydants tels que la N-acétylcystéine, le probucol ou la vitamine E. D'autres voies importantes de signalisation peuvent être activées lors du recrutement de différents adaptateurs et comprennent : la voie PI3K/AKT (phosphatidylinositol 3-kinase), la JNK (c-Jun N-terminale kinase), la JAK(Janus kinase)/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription proteins) et la voie MAPK (Mitogen activated Protein Kinases)⁷¹⁻⁷⁴. Un ensemble de facteurs de transcription, tels que NF- κ B, SP1, AP-1 (Activator Protein 1) ou les STAT, est ensuite activé et transloqué dans le noyau^{54,75,76}. Ces facteurs de transcription pro-inflammatoires engendrent la sécrétion de plusieurs médiateurs de l'inflammation tels que des facteurs de croissance, des cytokines et des molécules d'adhésion. Il est particulièrement intéressant de noter que NF- κ B et SP1 ont tous deux été décrits comme étant capables d'activer la transcription de RAGE^{71,77}, renforçant ainsi l'intensité et la durée de la signalisation de RAGE (figure 10).

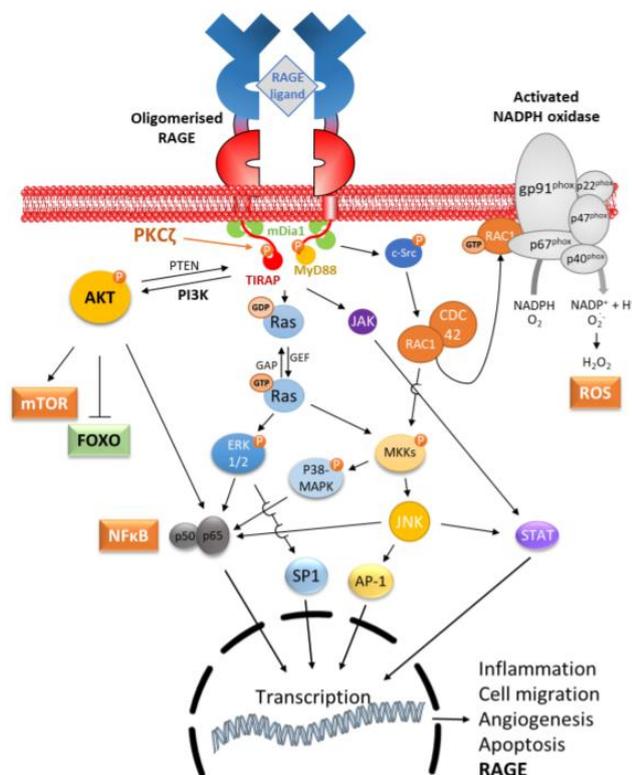
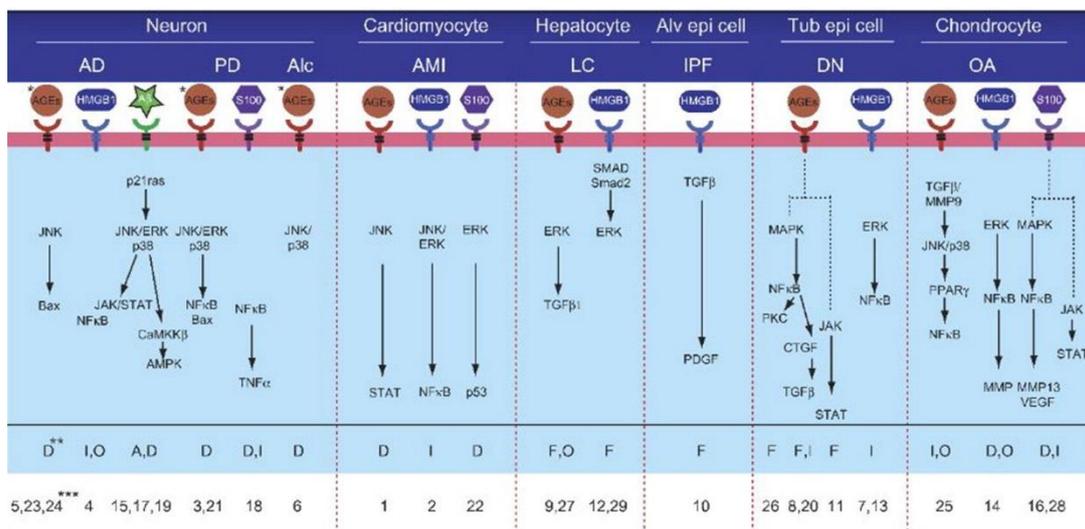


Figure 10 : Signalisation intracellulaire de RAGE. L'oligomérisation de RAGE lors de la liaison du ligand provoque sa phosphorylation sur la Ser391 par la PKC ζ , recrutant ainsi TIRAP et MyD88, et induisant l'activation de mDIA1. La voie PI3K/AKT/mTOR est activée tandis que FOXO est inhibée. Plusieurs voies MAPK sont également stimulées, activant les voies ERK 1/2, p38-MAPK et JNK. La voie JAK/STAT est également activée. Enfin, la protéine kinase c-Src est également phosphorylée, ce qui active le complexe RAC1/CDC42, puis les MAPK kinases (MKK) et la NADPH oxydase (production de NADP⁺ et d'espèces réactives de l'oxygène). D'importants facteurs de transcription sont impliqués, notamment NF- κ B, SP1, AP-1 et les STAT, favorisant l'inflammation, la migration cellulaire, l'angiogenèse, l'apoptose et l'expression de RAGE³⁶.

De manière plus indirecte, le RAGE peut participer à l'inflammation par le biais d'un dysfonctionnement mitochondrial, de l'activation de l'inflammasome et d'un stress du réticulum endoplasmique³³. D'autre part, l'expression de la GLO1 (Glyoxalase-I) est augmentée chez les souris RAGE^{-/-}, ce qui suggère que l'activité de RAGE peut, soit indirectement, soit directement, réguler à la baisse, l'activité de cet enzyme. D'autre part, l'inhibition de la GLO1 entraîne une accumulation d'AGE et une stimulation de RAGE⁷⁸.

IId) Pathologies associées à l'activation de l'axe ligand-RAGE

Le RAGE est exprimé dans divers tissus, notamment le cerveau, le cœur, le foie, les poumons, les reins et le cartilage, et joue un rôle important dans la progression de la maladie. L'expression basale de RAGE est faible mais elle augmente lors d'états physiopathologiques tels que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les maladies vasculaires, le diabète, le cancer, la maladie rénale chronique (MRC), la fibrose hépatique, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et les maladies inflammatoires, qui peuvent être le résultat de lésions cellulaires causées par la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, de cytokines et de molécules pro-inflammatoires (figure 12).



* AGEs from activated macrophage also involved.
 ** Mediated pathology : A, autophagy; D, cell death or degeneration; F, fibrosis; I, inflammation; O, oxidative stress
 *** Matched references are listed in Supplementary Table 1.

Figure 12: Implication de l'activation de l'axe ligand-RAGE dans diverses pathologies⁷⁹. AD; Alzheimer's disease, PD; Parkinson's disease, Alc; Alcoholic brain damage, AMI; Acute myocardial infarction, LC; Liver cirrhosis, IPF; Idiopathic pulmonary fibrosis, DN; diabetic nephropathy, OA; osteoarthritis, F; fibrosis, I; inflammation, O; oxidative stress, A; autophagy, D; degeneration, Cd; cell death.

Dans le diabète, il a été démontré que le RAGE était impliqué dans des complications microvasculaires et macrovasculaires⁸⁰. La CML, dans un régime alimentaire enrichi en cet AGE, induit

un vieillissement vasculaire accéléré chez des souris sauvages d'âge moyen, caractérisé par une augmentation de la rigidité vasculaire et une perturbation de l'élastine, une réduction de la relaxation aortique et une augmentation de l'expression de VCAM-1 et de RAGE, alors que l'expression SIRT1 est diminuée. Cependant, chez des souris RAGE-/- exposées à la même quantité de CML, tous les paramètres observés précédemment étaient complètement absents⁸¹. Il a également été démontré que le FPS-ZM1, un antagoniste de RAGE, a considérablement limité le vieillissement vasculaire et l'inflammation de l'aorte chez des rats âgés⁸².

Il a été démontré que la CML alimentaire (dCML, dietary CML) s'accumule préférentiellement dans les reins et que cette accumulation était indépendante de RAGE⁸³, avec un faible impact sur le vieillissement de ces organes chez les souris âgées étudiées. D'autre part, la délétion de RAGE a réduit de manière significative les caractéristiques du vieillissement rénal telles que la fibrose, l'atrophie tubulaire, l'hyalinose artériolaire et, plus important encore, la glomérulosclérose et l'amylose des apolipoprotéines A-II glomérulaires. L'inflammation rénale, caractérisée par la mesure des taux d'IL-6, de TNF- α et de VCAM-1, a également été réduite de manière significative³⁶. Ces résultats sont en accord avec d'autres résultats observés dans la néphropathie diabétique où la signalisation cellulaire médiée par RAGE contribue à l'établissement d'un environnement pro-inflammatoire conduisant à la glomérulosclérose et à la protéinurie⁸⁴. L'inflammation chronique est un facteur important de la maladie rénale chronique et le RAGE pourrait donc jouer un rôle important dans l'apparition et le développement de cette maladie⁸⁵.

Les premières études de RAGE dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer ont montré que l'activation de ce récepteur était responsable de l'inflammation de la microglie, essentielle à la formation des plaques amyloïdes Ab caractéristiques de la maladie⁸⁶. Il a également été démontré que l'activation de RAGE par les AGE induit la protéine de l'inflammasome NLRP3 et donc de la neuroinflammation, et que celle-ci est inhibée par le FPS-ZM1⁸⁷ (figure 13A). En outre, le RAGE a également été impliqué dans d'autres caractéristiques de l'apparition de la maladie d'Alzheimer, indépendamment de l'inflammation. On pense notamment que son interaction avec les peptides A β joue un rôle important dans le transport de ces peptides à travers la barrière hémato-encéphalique, favorisant ainsi la formation de plaques amyloïdes⁸⁸. L'utilisation du FPS-ZM1 dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer a permis de limiter le transport de la protéine A β ainsi que l'inflammation associée et de normaliser les fonctions cognitives⁵³. Suite à ces résultats, un essai clinique a été entrepris avec un autre antagoniste de RAGE, l'azeliragon (TTP488). Cet essai a atteint la phase 3 mais a été récemment interrompu en raison d'un manque d'efficacité dans la cohorte sélectionnée. Il est toutefois important de noter qu'aucun effet indésirable significatif n'a été signalé ou n'est responsable de l'arrêt de l'essai, et il est suggéré que le manque d'efficacité pourrait s'expliquer par le fait que le traitement a été initié de façon trop tardive. Cependant, dans une analyse post hoc de cet essai de phase 3 STEADFAST, un sous-groupe de patients atteints de la maladie d'Alzheimer légère et de diabète

de type 2 (défini par un taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) supérieur à 6,5% à tout moment au cours de l'étude) traités à l'Azéloragon a présenté un bénéfice potentiel à la fois sur le plan cognitif et fonctionnel et une diminution des biomarqueurs inflammatoires par rapport au même sous-groupe de patients traités avec un placebo. L'inhibition de RAGE reste donc intéressante en tant qu'approche thérapeutique dans les premiers stades de la déficience cognitive⁸⁹.

Ces résultats démontrent donc clairement que le RAGE est impliqué de manière significative dans l'augmentation de l'inflammation chronique et notamment l'« inflammaging ». L'inhibition pharmacologique de RAGE ou la délétion génétique de celui-ci modifie sensiblement l'apparition ou la progression de pathologies à composantes inflammatoires, ce qui constitue des éléments importants pour considérer le RAGE comme une cible pharmacologique d'intérêt.

Ile) RAGE en tant que cible thérapeutique : inhibiteurs connus de RAGE

L'exploration de différentes stratégies pour inhiber l'activation et la signalisation de RAGE repose, entre autres, sur différentes études montrant que les souris invalidées pour le gène du RAGE sont pour la plupart en bonne santé et qu'aucune anomalie de leur développement n'a été signalée. De plus, il a été observé que l'administration de RAGE soluble, d'antagoniste ou l'inactivation du gène dans plusieurs modèles de rongeurs ne produit pas d'effets toxiques significatifs. Les différentes stratégies mises en œuvre pour inhiber la signalisation de RAGE concernent l'inhibition de la partie extracellulaire à l'aide d'anticorps, de peptides (dérivés des protéines S100 ou HMGB-1), de glycosaminoglycanes, de petites molécules synthétiques, de médicaments repositionnés (Benazepril, Tranilast, perindopril) ou de produits naturels (hesperidine, matrine, papaverine) ou concernent l'inhibition de la signalisation intracellulaire médiée par le RAGE à l'aide d'inhibiteurs protéine-protéine entre la partie C-terminale de RAGE et la protéine Diaph-1⁹⁰.

Notre programme de recherche se focalisant sur l'identification de petites molécules antagonistes potentiels du domaine extracellulaire de RAGE, une présentation des molécules connues à l'heure actuelle est présentée dans le paragraphe suivant.

Inhibiteurs de RAGE : domaine extracellulaire

Aujourd'hui, un certain nombre de petites molécules inhibitrices ou antagonistes de RAGE ont été développées¹². Parmi les composés décrits, deux sont reconnus comme inhibiteur ou antagoniste de référence pour le RAGE. Il s'agit du FPSZM1 (figure 13A) (Constante d'inhibition, $K_i = 25$ nM) et de l'Azéloragon (TTP488, Concentration inhibitrice 50, $CI_{50} = 500$ nM) (Figure 13B).

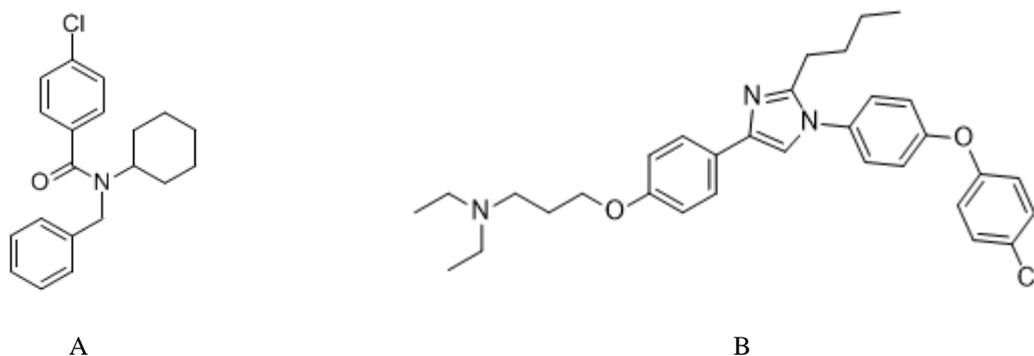


Figure 13 : Structures chimiques du FPS-ZM1 (A) et de l'Azélixiragon (B).

FPS-ZM1

Pour générer cet inhibiteur de RAGE, Deane et al.⁵³ ont criblé une chimiothèque de 5000 petites molécules afin d'étudier leur capacité à inhiber l'interaction de RAGE avec la protéine A β . Une fois les hits identifiés, une deuxième chimiothèque de 100 composés structurellement apparentés a été criblée, à la fois pour l'inhibition de l'interaction RAGE-A β mais également pour leur capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique. Ce composé, le FPS-ZM1 (N-Benzyl-N-cyclohexyl-4-chlorobenzamide), inhibe l'interaction entre les peptides A β 1-40 et A β 1-42 et le domaine V de RAGE *in vitro* et *in vivo*. En utilisant un test sans cellule avec du sRAGE immobilisé, le FPS-ZM1 a modulé la liaison de RAGE au peptide A β (K_i = 25 nM), à la protéine S100B (K_i = 230 nM) et à l'HMGB1 (K_i = 148 nM)⁵³. Les études de relation structure-activité du FPS-ZM1 ont révélé que les caractéristiques associées à sa liaison au RAGE sont (1) un noyau central d'amide tertiaire, (2) un benzène déficient en électrons, (3) une fraction hydrophobe, et (4) un cycle benzénique riche en électrons lié à l'amide avec un espaceur de type alkyle. De plus, des études d'interaction moléculaire *in silico* d'un analogue fluoré du FPS-ZM1 avec le domaine V ont montré que les modes de liaisons semblent dépendre largement d'interactions hydrophobes avec les Pro45, Leu49, Trp51, Pro66, Leu78 et Pro80⁵³.

Des études *in vitro* ont montré que le FPS-ZM1 diminue le stress oxydant intracellulaire médié par RAGE, le nombre de transcrits ainsi que l'activité de BACE1 (Beta-site APP-Cleaving Enzyme 1) ainsi que la translocation nucléaire de NF- κ B induite par le peptide A β 1-40. *In vivo*, ce composé a montré une diminution de la neuroinflammation dans un modèle murin, tout en diminuant l'accumulation de la protéine A β et en améliorant les performances cognitives. Le FPS-ZM1 n'a pas présenté de toxicité chez les souris, même à des doses élevées (500 mg/kg). Il est cependant intéressant de noter que l'étude du métabolisme de l'analogue fluoré, dans des microsomes hépatiques, a montré un T1/2 de ce composé à 0,66 minutes⁹¹.

L'Azélixiragon (TPP488)

La [3-(4-{2-butyl-1-[4-(4-chlorophénoxy)-phényl]-1H-imidazole-4-yl}-phénoxy)-propyl]-diéthylamine (Azélixiragon, également appelé PF-04494700 ou TTP488) est une molécule développée

par la société vTv Therapeutics Inc. Il a été démontré que ce composé inhibe l'interaction entre le RAGE et la protéine S100B, HMGB1, la CML et le peptide A β 1-42, avec, pour ce dernier, la détermination, par la technique de polarisation de la fluorescence, d'une IC50 d'environ 500 nM¹². Une valeur de Kd de 12,7 nM, vis-à-vis de la protéine recombinante sRAGE, ainsi qu'une grande sélectivité de la molécule ont été décrites⁸⁹, cependant, aucune information précise, quant à la méthode employée pour l'étude de ces interactions moléculaires, n'est disponible dans la littérature.

L'Azeliragon ralentirait le déclin cognitif chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer mais deux essais cliniques de phase III ont récemment été interrompus en raison d'un manque d'efficacité. L'analyse de sous-groupes de ces études indique un bénéfice potentiel chez les patients diabétiques (HbA1c 6,5%), dont on suppose qu'ils présentent des concentrations plus élevées de sRAGE ainsi qu'une expression plus importante du récepteur⁸⁹.

La structure de l'Azeliragon présente deux fragments hydrophobes, une chaîne aliphatique et un groupe aromatique déficient en électrons, attachés à un noyau central hétéroaromatique (figure 13B). Le noyau central est lié à une chaîne alkyle contenant un azote protonable. Des études de relation structure-activité (RSA) ont révélé que le groupement aminoalkoxy est essentiel pour l'inhibition de RAGE, alors qu'aucune différence significative de l'activité inhibitrice n'est observée en modifiant le cycle thiazole ou en insérant un amide ou un groupe amino entre le thiazole et le 4-chlorophénoxyphényle. La synthèse et l'étude d'autres composés, tels que des dérivés de type 2-aminopyridine, pyrazole-5-carboxamide, benzoxazole, ont permis de montrer que tous ces composés partagent un pharmacophore commun : un ou deux cycles aromatiques hydrophobes, un noyau central avec des atomes accepteurs/donneurs de liaisons hydrogène, et un groupement alkyle portant une amine protonable (figure 14). Il a été proposé, par des études d'interaction moléculaire *in silico*, que ces composés interagissent avec une poche constituée par les Lys43, Lys44, Arg48, Met102 et Arg104¹².

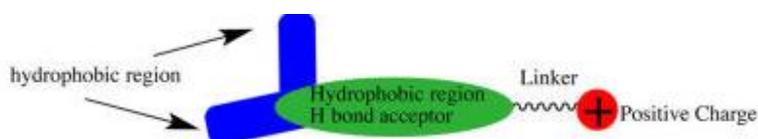


Figure 14 : *Pharmacophore proposé*

D'autres composés, de type alcaloïde, tels que la papaverine⁹² ont été identifiés, malgré une faible affinité pour le RAGE, comme des inhibiteurs potentiels de la voie de signalisation RAGE dépendante médiée par HMGB1 ou par le peptide A β . Des études d'interaction moléculaire *in silico* supposent que la matrine⁹³ (produit naturel cité précédemment) interagit avec le domaine V de la

protéine par des liaisons hydrogène et une interaction hydrophobe avec les Ile26, Leu34, Val35, Leu36 et Lys37⁹³.

Les sites d'interaction de ces différentes molécules avec le domaine V de RAGE est présentée dans la figure 15.

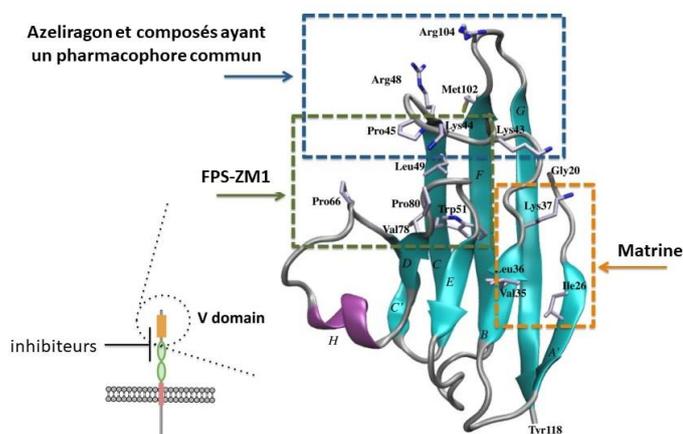


Figure 15 : *Domaine V de RAGE et sites de liaison de l’Azeliragon (et composés ayant un pharmacophore commun), du FPS-ZM1 et de la Matrine*¹².

III- Objectifs

Le RAGE, dont notre compréhension actuelle repose en grande partie sur la recherche menée dans la pathologie diabétique, est plus largement impliqué à la fois dans l'immunité et l'inflammation⁹⁴, et notamment dans ce que l'on appelle l'« inflammaging » (inflammation liée au vieillissement)⁹⁵. Ce récepteur est donc un récepteur transmembranaire à ligands multiples qui favorise l'activation de voies pro-inflammatoires et pro-oxydantes clés. Les réponses cellulaires, suite à l'activation du RAGE, sont diverses et impliquent l'expression de molécules pro-inflammatoires, -oxydantes, -adhésives, -apoptotiques, -angiogéniques et pro-fibrotiques. Le RAGE peut donc également être considéré comme un récepteur de reconnaissance de formes PRR (Pattern Recognition Receptor), et a été qualifié de récepteur de type TLR (Toll-like receptor) par certains auteurs.

Il a été démontré que la délétion de RAGE protège à la fois contre les maladies cardiovasculaires et les maladies d'Alzheimer chez les souris RAGE^{-/-}, et bien que l'impact des thérapies anti-RAGE reste à démontrer chez l'homme, les résultats obtenus en laboratoire soulignent le potentiel du ciblage de ce récepteur pour répondre à de multiples problèmes de santé publique. En outre, nous avons récemment fait état d'une prévention significative des lésions de néphrosclérose liées au vieillissement chez les souris RAGE^{-/-}, ce qui suggère que le RAGE joue également un rôle crucial dans le vieillissement rénal³⁶ et soulève la question de savoir si la signalisation RAGE pourrait être un moteur du vieillissement "physiologique".

L'expression membranaire de RAGE, même en l'absence d'un événement pathologique, pourrait favoriser des processus pro-inflammatoires persistants de bas grade qui, à leur tour, pourraient entraîner une production accrue de DAMP (damage-associated molecular patterns) et l'expression de RAGE⁹⁶. Ce cercle vicieux d'événements pro-vieillescence place le RAGE sous les feux de la rampe en tant qu'acteur clé de l'inflammation, notamment parce que les cellules sénescentes produisent également des ligands de RAGE tels que HMGB1 et les protéines S100s.

Ces résultats de la littérature conduisent donc à l'hypothèse que l'inhibition du RAGE (invalidation du gène ou antagonisme d'activité) est capable de prévenir et de contrôler non seulement l'inflammation aiguë mais aussi l'inflammation chronique. De nombreuses études sont menées aujourd'hui pour tenter d'inhiber ou de réduire les effets délétères de l'interaction ligand-RAGE. Les pistes thérapeutiques actuellement explorées pour contrer la voie de signalisation de l'axe ligand-RAGE sont les molécules ciblant les AGE, le domaine extracellulaire du RAGE ou les voies de signalisation intracellulaire post-récepteur.

Dans le cadre de notre programme de recherche, nous nous sommes focalisés sur l'identification d'antagonistes potentiels du domaine extracellulaire.

Le récepteur RAGE possède une multitude de ligands, et donc une multitude de motifs potentiels sont capables de bloquer ce récepteur. Cependant, un nombre relativement faible de molécules sont connues dans la littérature pour bloquer l'activité de RAGE. De plus, les molécules décrites en tant qu'antagonistes RAGE présentent un mauvais profil pharmacocinétique. Ceci explique probablement qu'aucune molécule antagoniste de RAGE ne soit pas encore mise sur le marché. Ce domaine de recherche est d'actualité, la concurrence est peu visible et, de ce fait, nous avons besoin d'agir rapidement.

Les atouts de notre approche sont :

- L'originalité de la cible du RAGE et des molécules synthétisées
 - L'innovation sera garantie par une analyse minutieuse de la brevetabilité et de la pharmacocinétique (log P, profil ADME, toxicité) des molécules proposées.
- Un large champ d'application de molécules bloquant le RAGE :
 - Phases aiguës ou chroniques de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), Psoriasis, Polyarthrite Rhumatoïde et Sclérose en Plaque ;
 - Complications macro- et micro- vasculaires du diabète ;
 - Vieillesse accélérée au cours de l'inflammation chronique de bas grade ;
 - Maladie d'Alzheimer et autre pathologie du système nerveux central ;
 - Vieillesse physiologique.
- Coût réduit de production par rapport aux biothérapies.

Afin de tester des molécules issues de la chimiothèque d'HEI (laboratoire du Dr Alina Ghinet), il m'a été confié la mise en place de modèles d'études des interactions moléculaires de ligands potentiels de RAGE pour déterminer leur affinité ainsi que leur fonctionnalité.

J'aborderai donc, dans la partie suivante, les différentes approches envisagées pour étudier l'affinité potentielle des ligands testés vis-à-vis du RAGE (étude de liaison par radiomarquage, ELISA, thermophorèse à microéchelle (MST)) ainsi que les résultats obtenus et décrirai, dans une dernière partie, nos avancées récentes dans la mise au point d'un modèle cellulaire qui nous permettra d'explorer la fonctionnalité de ces ligands potentiels (propriétés antagonistes, agonistes).

IV- Contribution personnelle : développement d'un modèle d'étude d'interactions moléculaires

IVa) Etude de l'interaction moléculaire de ligands potentiels de RAGE à l'aide d'une molécule de référence radiomarquée

De nombreuses techniques ont été utilisées pour étudier l'interaction de ligands potentiels de RAGE et déterminer, soit une concentration inhibitrice 50 (concentration d'un composé inhibant de 50% la liaison de RAGE à un ligand de référence) par la technique ELISA (Enzymes Linked ImmunoabSorbant Assay), soit un K_d ou constante de dissociation à l'équilibre (concentration d'un composé liant la moitié des récepteurs RAGE présents dans l'échantillon) par les techniques de polarisation de fluorescence, de résonance plasmonique de surface, de thermophorèse à microéchelle ou par le radiomarquage d'un ligand de référence. Cette dernière technique a également été utilisée pour déterminer les constantes d'affinités (K_i) ou de certains composés.

Afin d'étudier les interactions moléculaires de ligands potentiels de RAGE de composés issus de la chimiothèque d'HEI, il nous était indispensable de mettre au point une technique nous permettant de réaliser ces mesures. Responsable d'un plateau technique permettant la manipulation de radionucléides et ayant, dans de nombreux projets, réalisé des études d'affinité ligand-récepteur par cette méthode, c'est donc la technique par radiomarquage d'un ligand de référence qui a tout d'abord été choisie.

Le principe de cette technique repose, dans un premier temps, sur des études de saturation. Des cellules ou des homogénats membranaires, exprimant le récepteur d'intérêt, sont incubés avec une concentration croissante de ligand radiomarqué, qui peut être un analogue marqué d'un ligand endogène ou exogène de ce récepteur. Cette première étape permet d'obtenir le K_d et le B_{max} (densité du récepteur d'intérêt dans les cellules ou l'homogénat) du composé de référence. Dans un deuxième temps, des expériences de compétition de liaison entre une concentration fixe du ligand radiomarqué de référence et des concentrations croissantes de ligands potentiels du récepteur permettent de déterminer le K_i (figure 16).

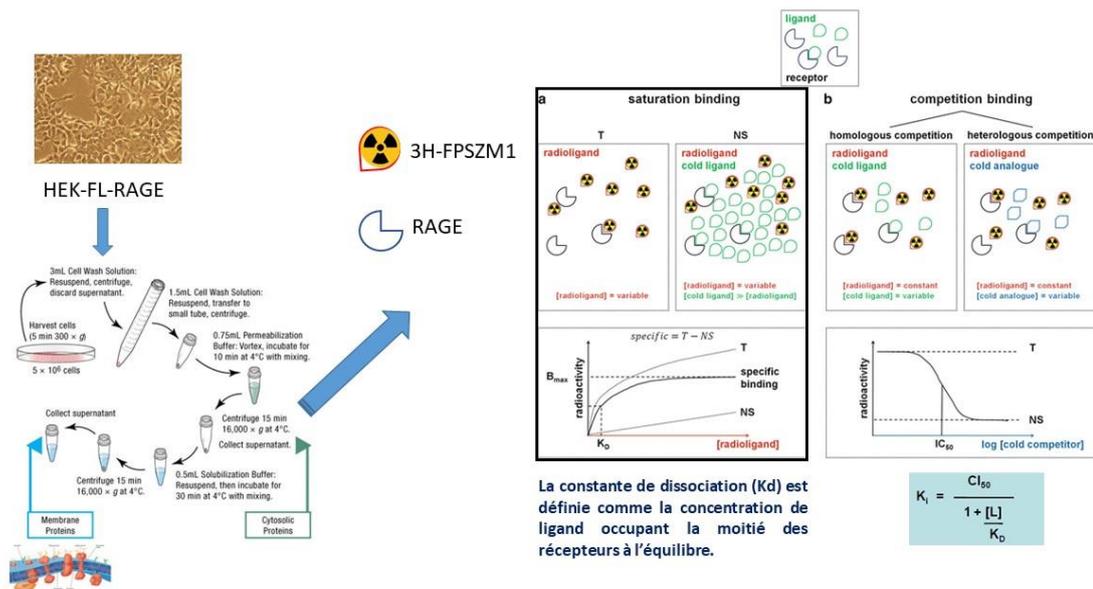


Figure 16 : Principe de la méthode d'étude de l'affinité et de la fonctionnalité de ligands potentiels de RAGE à l'aide d'un radioligand.

Dans la littérature, des études d'affinité ont été réalisées par cette technique avec, comme ligand de référence de RAGE, la protéine A β radiomarquée à l'iode 125. Notre laboratoire n'étant pas autorisé à détenir ce type de radionucléide, nous avons décidé de radiomarquer au tritium un ligand de référence, identifié comme antagoniste de RAGE, le FPS-ZM1.

Radiomarquage du FPS-ZM1

Le composé FPS-ZM1 radiomarqué au tritium n'étant pas disponible commercialement, nous avons synthétisé (laboratoire HEI) son précurseur iodé, où l'halogène est situé sur le cycle benzyle lié à l'azote de l'amide. L'échange halogène/ tritium a été réalisé par la société Pharmaron (Pharmaron UK limited) (figure 17).

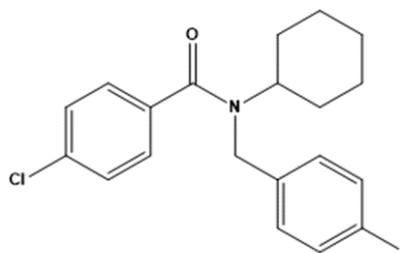


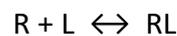
Figure 17 : Précurseur iodé du FPS-ZM1

Modèle cellulaire sur-exprimant le RAGE

A mon arrivée au sein de l'équipe du Pr Boulanger, un modèle de cellule HEK293 (human embryonic kidney 293 cell line), transfecté de manière stable par un plasmide codant le FL-RAGE (provenant du laboratoire du Dr Anne-Marie Schmidt, New York University) était disponible au laboratoire. Un homogénat de membranes de cellules HEK293-FL-RAGE a été préparé à l'aide d'un tampon de lyse (RIPA ou Mper contenant 1% d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases) et utilisé pour étudier l'interaction moléculaire de RAGE avec le FPSZM-1 tritié dans une expérience de saturation.

Principe de la méthode

Cette méthode est basée sur le fait que la fixation du ligand à son récepteur suit la loi d'action de masse :



A l'équilibre, les vitesses d'association et de dissociation sont égales :

$$\frac{(L)(R)}{(RL)} = \frac{K_{-1}}{K_1} = K_d$$

Où L = Ligand, R = Récepteur, LR = complexe Ligand-Récepteur, K-1 = vitesse de dissociation, K1 = vitesse d'association.

D'autres part, la densité de récepteurs RAGE dans l'homogénat (Bmax) peut être défini par :

$$B_{max} = (R) + (RL)$$

Alors,

$$(RL) = \frac{B_{max} \times (L)}{K_d + (L)}$$

Ainsi, en incubant des concentrations croissantes du ligand de référence radiomarqué avec une concentration fixe d'homogénat de membranes, il est possible de déterminer le Bmax de l'homogénat ainsi que le Kd du ligand pour le récepteur. En réalisant cette même expérience en présence d'une concentration élevée de ligand de référence non radiomarqué, il est possible de déterminer la liaison spécifique du ligand de référence pour le récepteur d'intérêt (figure 18).

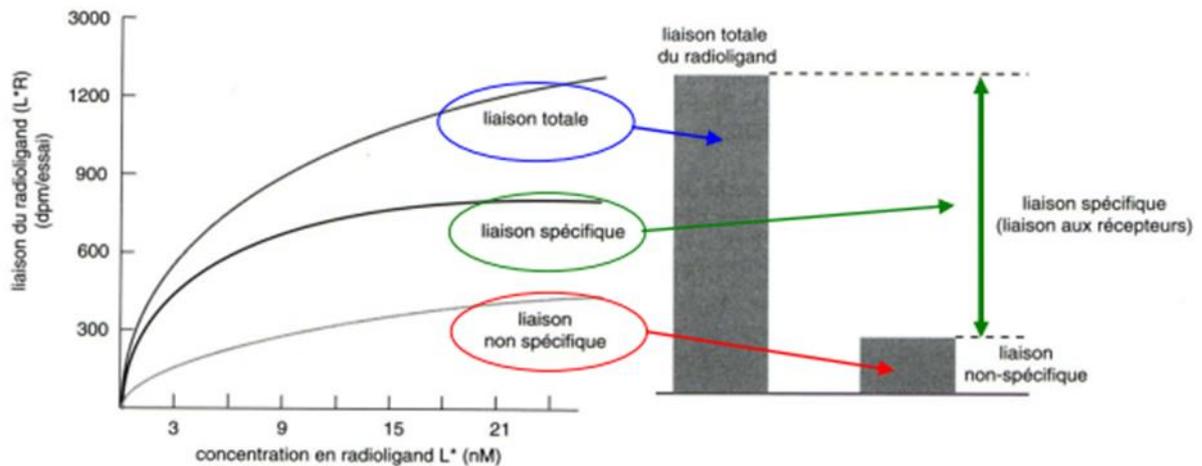


Figure 18 : *Expérience de saturation. Détermination du K_d spécifique à l'équilibre.*

Pour les tests de saturation, 7 concentrations croissantes (0,1- 2 μ M) de [3 H]FPS-ZM1 diluée dans un tampon d'affinité (Tris-HCl 50 mM, PH 7.4) ont été ajoutées aux suspensions de membranes diluées (2, 5 et 10 μ g), et incubées 1h à température ambiante afin de déterminer la fixation totale du radioligand. La fixation non-spécifique a été déterminée en pré-incubant les solutions de membranes diluées avec le FPS-ZM1 non radiomarqué (10 μ M) durant 5 min à température ambiante avant l'ajout du radioligand. Au bout d'une heure d'incubation, l'ensemble du contenu de chacun des tubes a été transféré dans une microplaque, puis la réaction de fixation a été arrêtée par une filtration au travers d'une plaque filtrante (Harvester, PerkinElmer, Boston, MA). La plaque filtrante a été lavée 10 fois avec du tampon de lavage (Tris-HCl 50mM, pH 7,4) froid (4°C), puis le nombre de désintégrations radioactives ont été mesurées en utilisant un Top Count (PerkinElmer, Boston, MA) après l'ajout de liquide scintillant.

Résultats

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 19 :

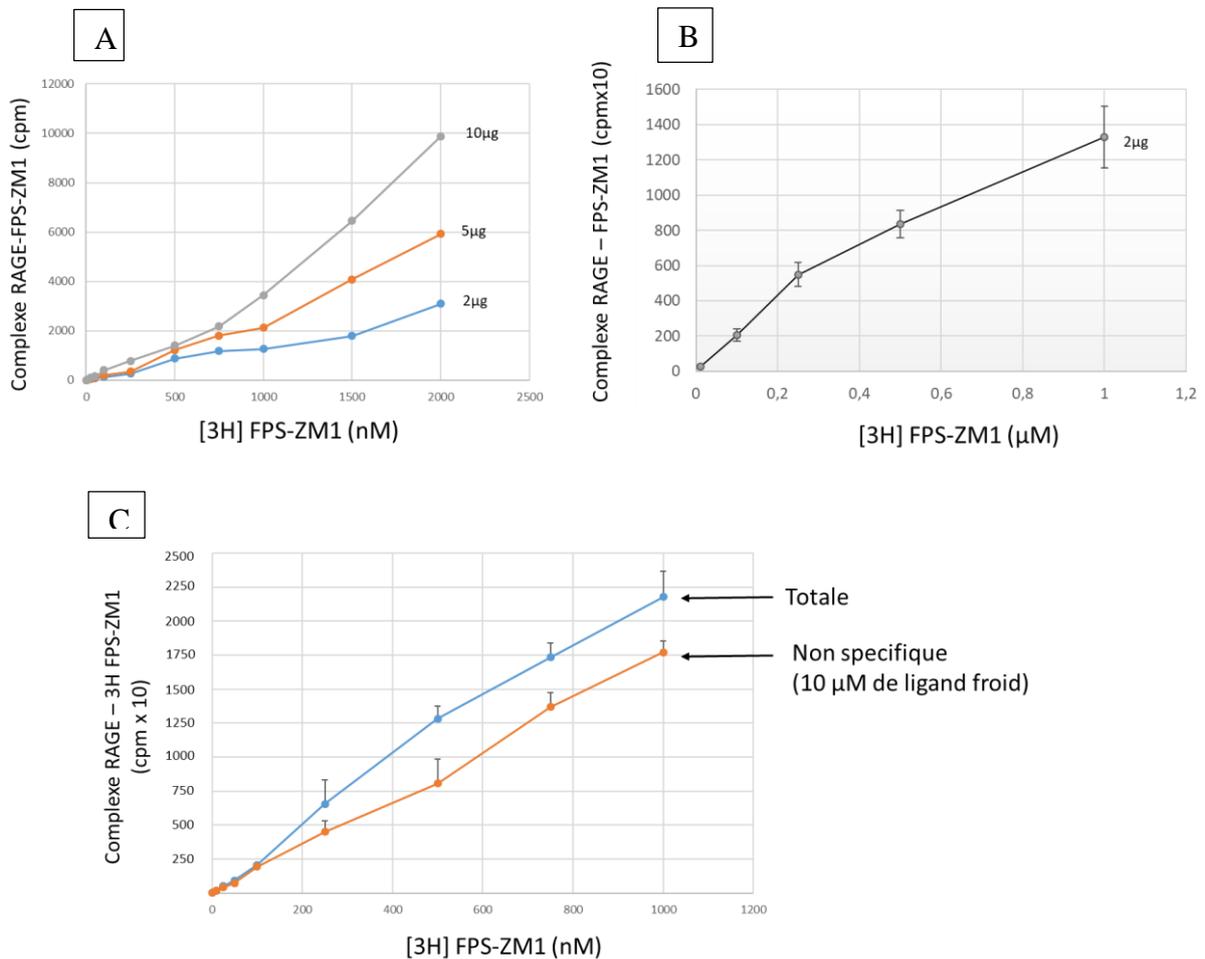


Figure 19 : Courbes de saturation RAGE - $[^3\text{H}]\text{FPS-ZM1}$ avec 2, 5 ou 10 μg d'homogénat, dans un tampon d'affinité Tris-HCl 50 mM, pH7.4 et des concentrations croissantes de $[^3\text{H}]\text{FPS-ZM1}$ (A) et (B). Même expérience de saturation avec 2 μg d'homogénat et 10 μM de FPS-ZM1 non radiomarqué (C).

Cette première étude de saturation montre que nous n'avons pas obtenu de plateau de saturation des récepteurs par le ligand radiomarqué, et ceci quelles que soient les concentrations d'homogénats testées. De plus, il a été constaté une importante liaison non spécifique du $[^3\text{H}]\text{FPS-ZM1}$. Ces résultats nous interrogent, d'une part sur la densité des récepteurs RAGE présents dans notre homogénat et d'autre part sur la sélectivité d'interaction du FPS-ZM1. Afin de tenter de répondre à ces deux questions, nous avons réalisé des expériences de saturation sur des membranes issues de cellules HEKFL-RAGE et des membranes issues de cellules HEK sauvages, dans deux tampons d'affinité différents. Une expérience de saturation dans un tampon d'affinité Tris-HCl 50mM, pH 7.4 sur des plaques filtrantes pré-imbibées avec du polyéthylène imine (PEI) à 0,5% a également été réalisée. Les résultats sont rassemblés figure 20.

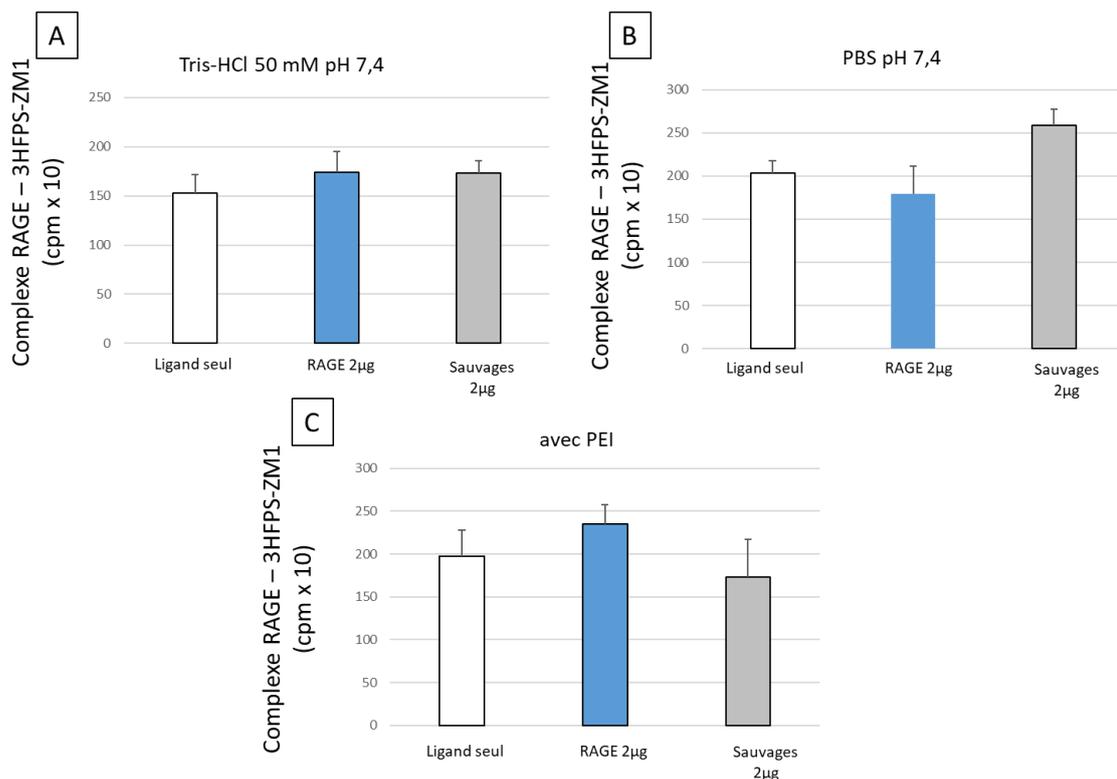


Figure 20: Etude de saturation de membranes HEK-FL-RAGE (2 µg) et HEK sauvages (2 µg) en présence de 1µM de [³H]FPS-ZM1, dans un tampon d'affinité composé de Tris-HCl 50 mM, pH7.4 (A), PBS, pH7.4 (B) ou Tris-HCl 50 mM, pH7.4 et filtres pré-imbibés avec du PEI 0,5% (C). L'étude du ligand radiomarqué seul (en l'absence de membranes) est également réalisée.

Nous constatons, d'après les résultats ci-dessus, aucune différence significative de liaison du ligand radiomarqué sur les membranes issues des HEK-FL-RAGE ou les membranes issues des HEK sauvages. Nous en déduisons donc que ceci peut être la conséquence d'une trop faible densité de récepteurs RAGE dans l'homogénat issu de cellules HEK-FL-RAGE comparée aux cellules sauvages et/ou une liaison non spécifique importante du [³H]FPS-ZM1 dans les deux cas. Cependant, l'étude du ligand radiomarqué seul (en l'absence de membranes) nous permet d'observer une liaison importante du ligand avec le filtre (mesure de coups par minute (cpm) comparable à celles obtenues en présences de membrane). Cette liaison du ligand au filtre a été comparée à un autre ligand radiomarqué de référence stocké au laboratoire et utilisé dans le cadre d'autres études d'interaction moléculaire que le RAGE. Les résultats sont présentés figure 21.

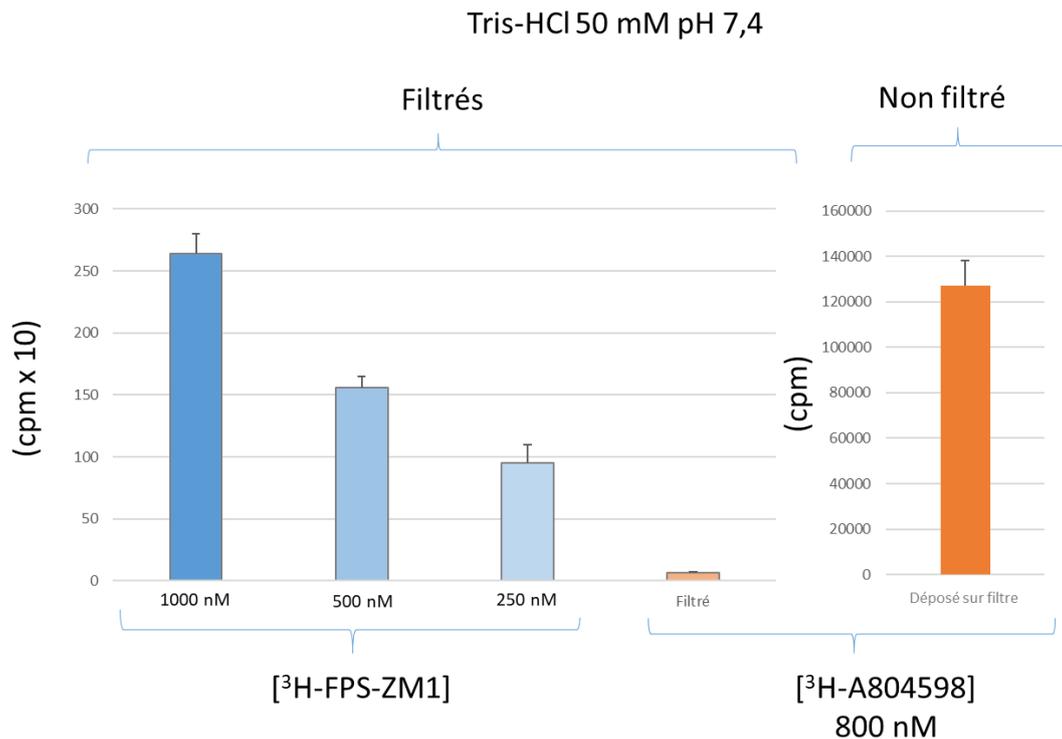


Figure 21 : Etude de l'interaction ligand – filtre (³H-FPS-ZM1 versus ³H-A804598 (ligand de référence du récepteur P2X7).

Nous observons, d'après les résultats présentés dans la figure 21, une interaction concentration dépendante du [³H]-FPS-ZM1 avec les filtres des plaques filtrantes, ce qui n'est pas le cas du [³H]-A804598, ligand de référence du récepteur P2X7. Afin de diminuer cette interaction ligand – filtre, nous avons étudié l'effet d'une pré-incubation de deux types de plaques filtrantes (GFB (taille des pores du filtre = 0,6 nm) ou GFC (taille des pores du filtre = 1,2 nm)) avec des détergents (Triton X-100 (0,1%), Tween-20 (0,1%)) ou l'addition de ces mêmes détergents dans le tampon d'affinité. Aucune diminution de l'interaction du [³H]-FPS-ZM1 avec les filtres n'a été constaté.

Une étude de l'expression de RAGE par Western-blot a également été réalisée dans des cellules HEK-FL-RAGE ou des cellules sauvages ainsi que dans les homogénats membranaires respectifs de ces cellules (figure 22).

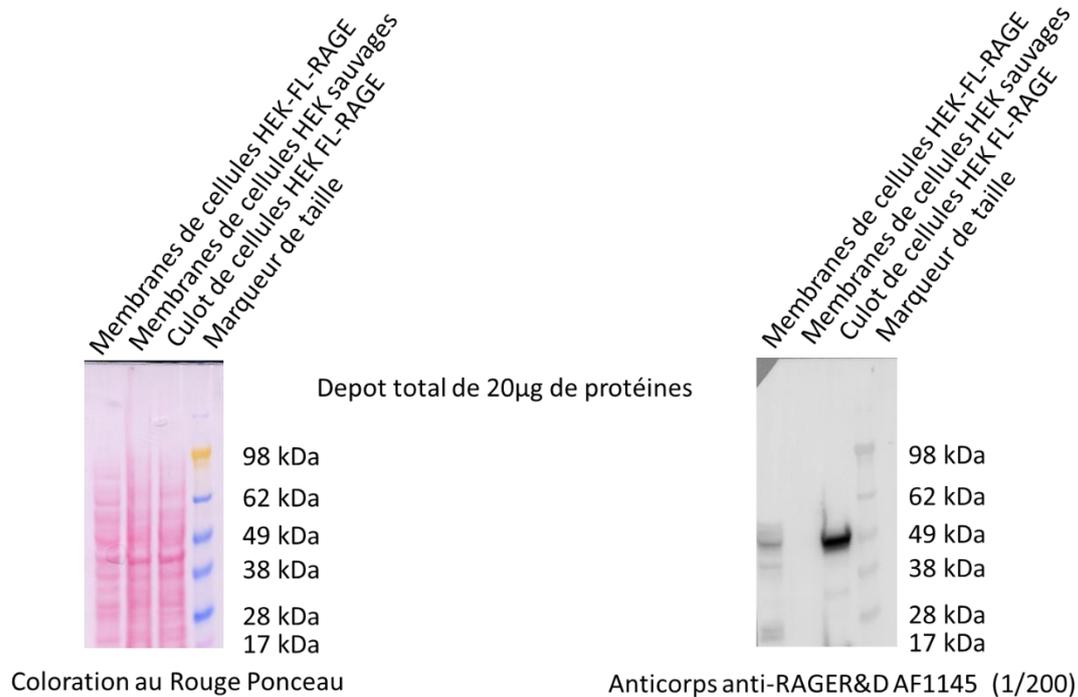


Figure 22 : Etude par Western-blot de l'expression de RAGE dans des extraits membranaires de cellules HEK sauvages et FL-RAGE ainsi que dans des culots de cellules HEK-FL-RAGE.

Alors qu'une expression significative du récepteur est observée dans le culot de cellules HEK-FL-RAGE comparée à des cellules HEK sauvages, celle-ci est bien plus faible dans l'homogénat membranaire des cellules HEK-FL-RAGE. Cette faible densité de récepteurs RAGE membranaires dans ces cellules, comparée aux cellules sauvages ne nous a donc peut-être pas permis d'observer des différences significatives d'interaction moléculaire dans les expériences de saturation précédemment décrites.

A l'heure actuelle, ce test ne nous permet pas de d'obtenir des paramètres d'interaction moléculaire entre le récepteur RAGE et des ligands potentiels de ce récepteur. Des études d'optimisation sont en cours de réalisation, à la fois sur l'obtention d'un modèle cellulaire exprimant une densité plus importante du récepteur RAGE à la membrane ainsi que sur le choix du ligand radiomarqué de référence. Concernant ce dernier, nous avons décidé de procéder au radiomarquage du deuxième ligand de référence de RAGE, l'Azédiragon.

Afin d'avancer dans cette étude, il était impératif de nous intéresser au développement ou à l'utilisation d'outils de screening pharmacologique capables de nous renseigner, le plus simplement et le plus rapidement possible, sur l'affinité de ligands potentiels de RAGE (issus de la chimiothèque d'HEI).

IVb) Etude de l'interaction moléculaire de ligands potentiels de RAGE à l'aide d'un kit ELISA

Après avoir consulté la littérature, j'ai choisi d'effectuer ces premiers screening de molécules à l'aide d'un kit ELISA (Créative BioMart® AGE-RAGE *in vitro* binding assay kit), principalement conçu pour le criblage des inhibiteurs de l'interaction AGE2 (AGE modifié par le glycéraldéhyde) -sRAGE (RAGE soluble) *in vitro*. En outre, ce kit peut être utilisé pour l'évaluation rapide et sensible de candidats inhibiteurs de cette liaison ainsi que pour la caractérisation de l'interaction AGE2-sRAGE *in vitro*. Le sRAGE (RAGE soluble) recombinant utilisé dans ce kit a spécialement été conçu pour conserver la bonne conformation afin de se lier efficacement aux AGE2-BSA mais pas à la BSA (Albumine de Sérum Bovin), qui est immobilisée sur la surface de la microplaque. Cette technique permet de mesurer l'interaction entre le sRAGE recombinant et l'AGE2-BSA dans un système de test en phase solide tel qu'un système ELISA classique. Elle permet de déterminer les concentrations inhibitrices 50, CI_{50} , des molécules évaluées comme inhibiteurs potentiels. Ci-dessous est représenté le principe du test développé (figure 23).

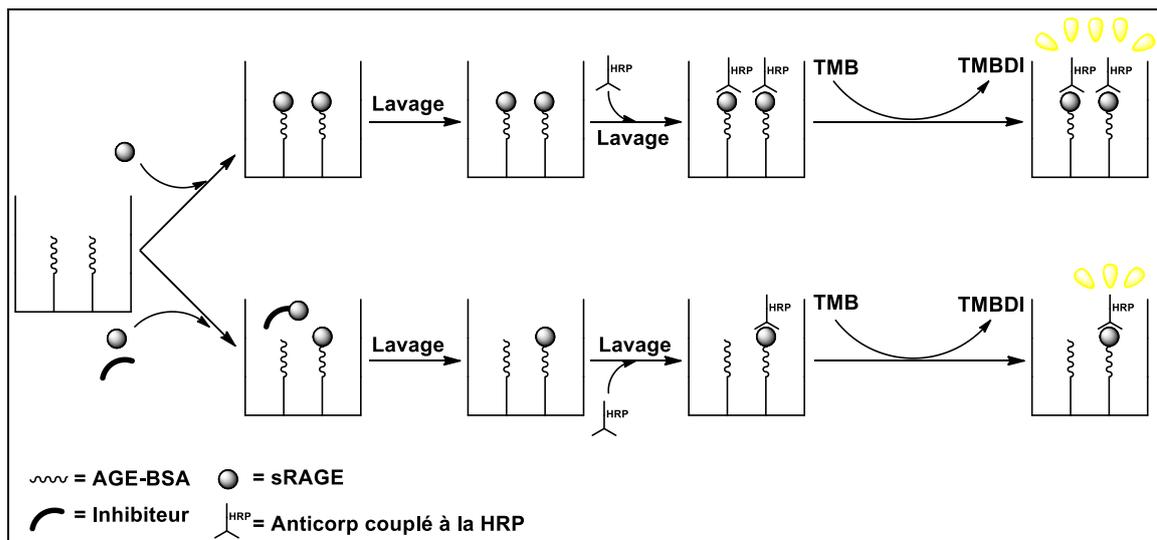


Figure 23 : Principe du test ELISA (HRP Horse Radish Peroxydase)

Principe de la méthode

Le fond des puits d'une plaque 96 puits a préalablement été sensibilisé avec une protéine glyquée (AGE-BSA). Des dilutions en série (100, 80, 60, 40, 20, 10 et 5 UA/mL) d'une solution mère de sRAGE-His (sRAGE marquée à l'histidine) sont déposées en duplicate afin d'obtenir une gamme d'interaction de sRAGE avec la protéine glyquée. Dans les autres puits, après l'addition d'un tampon de réaction, d'un inhibiteur de référence interne ainsi que 10 μ M (concentration finale dans le puit) des composés à tester, la protéine sRAGE-His est ajoutée. Après une heure d'incubation à 25°C, une

incubation des puits avec un anticorps anti-RAGE marqué à la HRP (Horse Radish peroxydase) est réalisée. L'addition d'un substrat chromogénique ainsi que d'une solution d'arrêt de la réaction nous permet, en fonction de la gamme étalon, de quantifier le pourcentage d'inhibition de l'interaction entre la protéine glyquée et le sRAGE après une lecture au spectrophotomètre UV/visible à 450 nm. Les analyses des données ont été réalisées en utilisant le logiciel GraphPadPrism 5 (GraphPad software Inc., San Diego, CA). La figure 23 ci-dessous représente le schéma classique d'un plan de plaque (orange = dilutions en série (100, 80, 60, 40, 20, 10 et 5 UA/mL) d'une solution mère de sRAGE-His, vert = molécules contrôles, bleu = composés testés) : une plaque ELISA, sensibilisée avec de l'AGE-BSA, après addition de la solution stop ; les tracés des courbes étalon, sur une plaque sensibilisée avec l'AGE-BSA ou de la BSA).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100UA.ml ⁻¹	100UA.ml ⁻¹	1671	2182	1606	1542	1581	35	1401	2541	2306	2601
B	80UA.ml ⁻¹	80UA.ml ⁻¹	1671	2182	1606	1542	1581	35	1401	2541	2306	2601
C	60UA.ml ⁻¹	60UA.ml ⁻¹	2102	432	1597	1552	1375	1407	1844	2619	1423	2601
D	40UA.ml ⁻¹	40UA.ml ⁻¹	2102	432	1597	1552	1375	1407	1844	2619	1423	2601
E	20UA.ml ⁻¹	20UA.ml ⁻¹	1836	2176	1675	1934	1324	2544	1420	2466	1419	FPS-ZM1
F	10UA.ml ⁻¹	10UA.ml ⁻¹	1836	2176	1675	1934	1324	2544	1420	2466	1419	FPS-ZM1
G	5UA.ml ⁻¹	5UA.ml ⁻¹	1960	2002	2118	1026	2290	2241	2534	1474	2531	V.C
H	LC	LC	1960	2002	2118	1026	2290	2241	2534	1474	2531	V.C

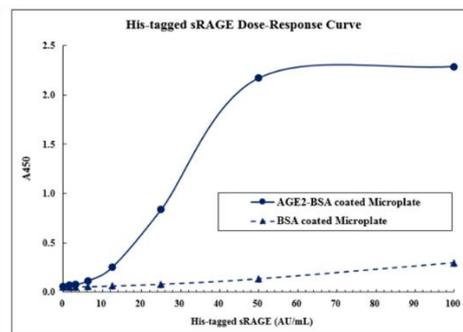
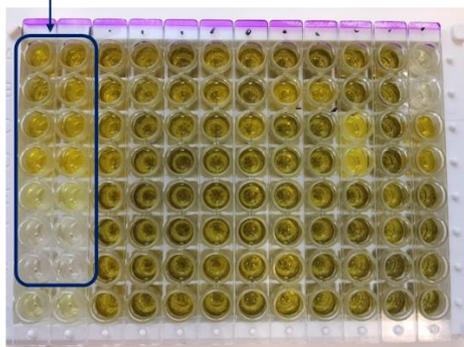


Figure 23: Représentation d'un plan de plaque du kit ELISA utilisé et visualisation de la plaque avant la lecture à 450 nm. Les tracés des courbes étalon, sur une plaque sensibilisée avec une protéine glyquée (AGE-BSA) ou de la BSA sont visualisables sur la droite de cette figure.

Pour les meilleurs composés testés dont le pourcentage d'inhibition de l'interaction AGE-BSA-sRAGE à 10 μ M est supérieur à 50%, il est possible de déterminer leur CI_{50} en réalisant le même type d'expérimentation mais cette fois-ci en présence de concentrations croissantes du composé à tester (figure 24).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000A/ml	1000A/ml	2548	2601 10µM	2601 10µM	3392	2619 50µM	2619 50µM	2107	1785	3426	1416 (insoluble)
B	600A/ml	600A/ml	2548	2601 7.5µM	2601 7.5µM	3392	2619 25µM	2619 25µM	2107	1785	3426	1416 (insoluble)
C	400A/ml	400A/ml	2401	2601 5µM	2601 5µM	607	2619 10µM	2619 10µM	2476	683	1765 (insoluble)	PPS-ZM1 10µM
D	400A/ml	400A/ml	2401	2601 2.5µM	2601 2.5µM	607	2619 5µM	2619 5µM	2476	683	1765 (insoluble)	PPS-ZM1 10µM
E	200A/ml	200A/ml	2944	2601 1µM	2601 1µM	1943	2619 1µM	2619 1µM	2588	729	1673 (insoluble)	Azeliragon 10µM
F	100A/ml	100A/ml	2944	2601 0.5µM	2601 0.5µM	1943	2619 0.5µM	2619 0.5µM	2588	729	1673 (insoluble)	Azeliragon 10µM
G	50A/ml	50A/ml	3264	2601 0.25µM	2601 0.25µM	1776	1310	1296	3453	Piroxicam	1382 (insoluble)	V.C
H	LC	LC	3264	3399	3399	1776	1310	1296	3453	Piroxicam	1382 (insoluble)	V.C

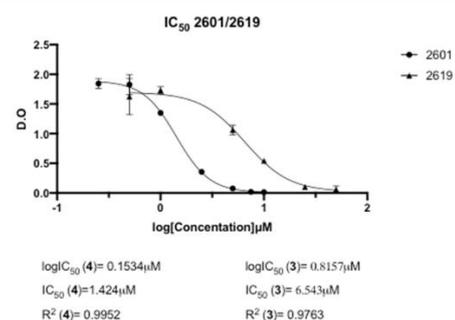
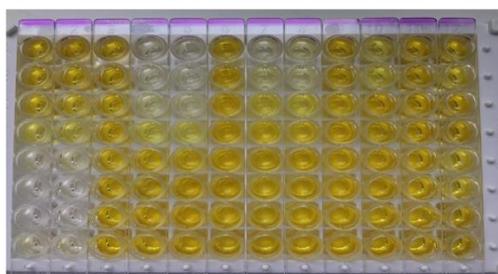


Figure 24: Détermination de l'IC₅₀ des composés 2601 et 2619.

Résultats

A ce jour, 169 molécules, représentatives de familles chimiques distinctes, issues de la chimiothèque d'HEI ont été testées à l'aide de ce kit. Ce premier screening m'a permis d'identifier 14 hits (tableau 1) présentant un potentiel d'inhibition de l'interaction AGE2-sRAGE comparable, voire meilleure que l'Azéiragon (inhibiteur de référence). Dans ce test, l'Azéiragon présente un pourcentage de l'inhibition de l'interaction AGE2-sRAGE de 46 à 50% à 10µM. L'étude de la cytotoxicité de ces hits sur un modèle de cellules HEK293 a été réalisée et s'est révélée négative.

Composé	ELISA (% Inh à 10 μ M)	ELISA (IC ₅₀ , μ M)
HEI 4	86	
HEI 6	64	
HEI 13	80	
HEI 19	90	
HEI 23	75	
HEI 1820	100	
HEI 1806	74	
HEI 2601	90 \pm 5.68	1.42 \pm 0.38
HEI 2619	53 \pm 8.54	6.54 \pm 0.52
HEI 2654	80	
HEI 1785	49	>10
HEI 1846	36	>10
HEI 1416	37	>10
Urolithin B	26	>10
FPS-ZM1	14	
Azeliragon	47	

Tableau 1 : % d'inhibition et IC₅₀ de composés testés à l'aide du kit ELISA

Afin de s'assurer que les hits sélectionnés interagissent avec la protéine RAGE et non avec la protéine glyquée (AGE-BSA), j'ai décidé de m'intéresser à une autre technique d'étude des interactions moléculaires, la thermophorèse à microéchelle (MST), afin de déterminer un paramètre d'affinité, le K_d, entre ces composés et le RAGE (et valider ainsi le potentiel de liaison au RAGE de ces molécules).

IVc) Etude de l'interaction moléculaire de ligands potentiels de RAGE par la technique de thermophorèse à microéchelle (MST)

La thermophorèse, ou effet Soret, désigne un phénomène basé sur la mise en mouvement de particules ou de molécules soumises à un gradient de température. La thermophorèse d'un composé varie en fonction de sa taille, de sa charge ou de son niveau de solvatation selon les termes de l'équation de Soret. Lors d'une interaction spécifique entre deux molécules, une au moins de ces propriétés est affectée (taille, charge, solvatation) et modifie en conséquence la courbe de thermophorèse. L'appareillage ainsi que le principe de la thermophorèse à microéchelle sont présentés figure 25.

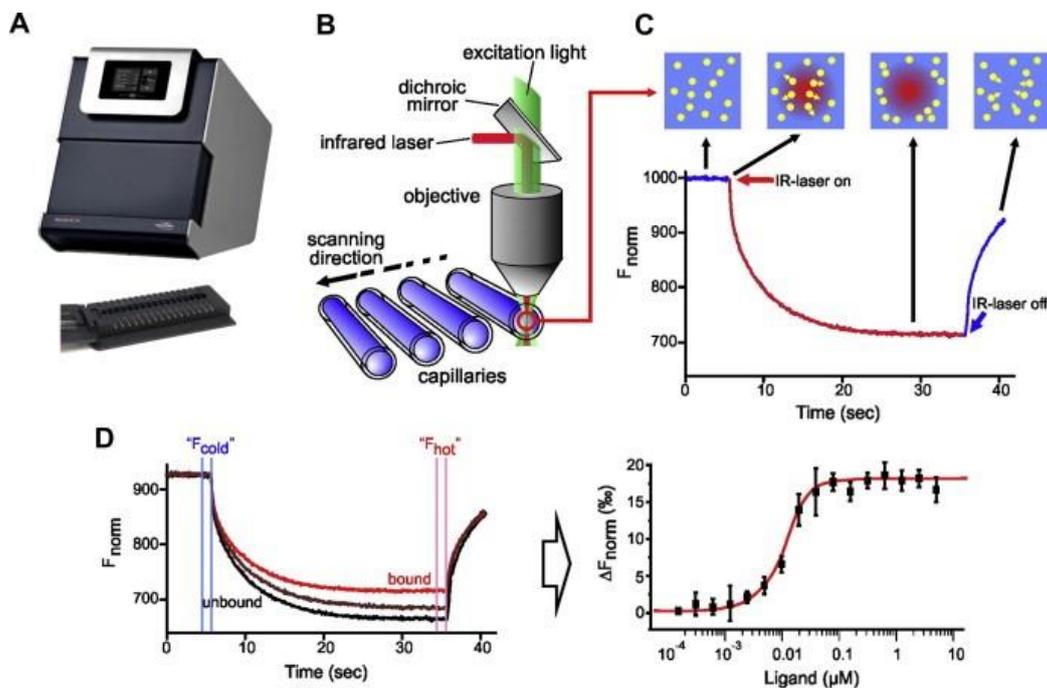


Figure 25 : (A) Un appareil de mesure de thermophorèse (MST-Monolith NT.115 de NanoTemper Technologies GmbH). (B) Représentation schématique du système optique. Les molécules fluorescentes dans les capillaires (16 capillaires de $\sim 4 \mu\text{L}$) sont excitées et la fluorescence détectée par le même objectif. Un laser IR chauffe localement et la thermophorèse des molécules fluorescentes à travers le gradient de température est détectée (C) Initialement, les molécules sont distribuées de manière homogène et une "fluorescence initiale" constante est enregistrée. Après l'activation du laser IR, le mouvement thermophorétique des molécules fluorescentes hors du point chauffé par le laser est mesuré. Après la désactivation du laser IR, il se produit une "backdiffusion" de molécules, uniquement due à la diffusion (D) Le mouvement thermophorétique d'une molécule fluorescente (trace noire, "non liée") change lors de la liaison à un ligand non fluorescent (trace rouge, "lié"), ce qui entraîne des courbes différentes. Le titrage du ligand non fluorescent entraîne un changement progressif de la thermophorèse, qui est représenté par ΔF_{norm} pour donner une courbe de liaison, dont dérivent les constantes d'affinité.

Basée sur le principe de la thermophorèse, la thermophorèse à microéchelle permet la mise en évidence d'interactions moléculaires entre biomolécules de nature physico-chimique différente, purifiées ou non.

L'équipement que nous avons utilisé (Monolith NT.115, Nanotemper, laboratoire du Pr P. Melnyk U1172) permet de détecter des variations de la mobilité d'une molécule fluorescente (dans notre cas, le RAGE couplé à une protéine GFP) soumise à un micro-gradient de température établi dans un capillaire, en présence de concentrations croissantes d'un interactant spécifique (les hits sélectionnés).

Principe de la méthode

A $10 \mu\text{L}$ d'une série de dilution du composé à tester, préparée dans un tampon d'affinité optimisé (PBS 1X, tween 20 0,05% ou 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , Tween 20 0,05% en fonction du ligand testé) est ajouté $10 \mu\text{L}$ d'un homogénat de membranes HEK-RAGE-FL-GFP.

L'enregistrement des courbes de thermophorèse est réalisé avec une intensité de LED à 100% et une intensité du laser IR ou MST power allant de 20 à 80%. L'allumage du laser IR a débuté 5 s après le début de l'enregistrement de la courbe de thermophorèse. Il a été éteint après 30 s d'enregistrement. L'étude a été menée à une température contrôlée égale à 23°C. le protocole simplifié d'une expérience de thermophorèse à microéchelle est présenté figure 26.

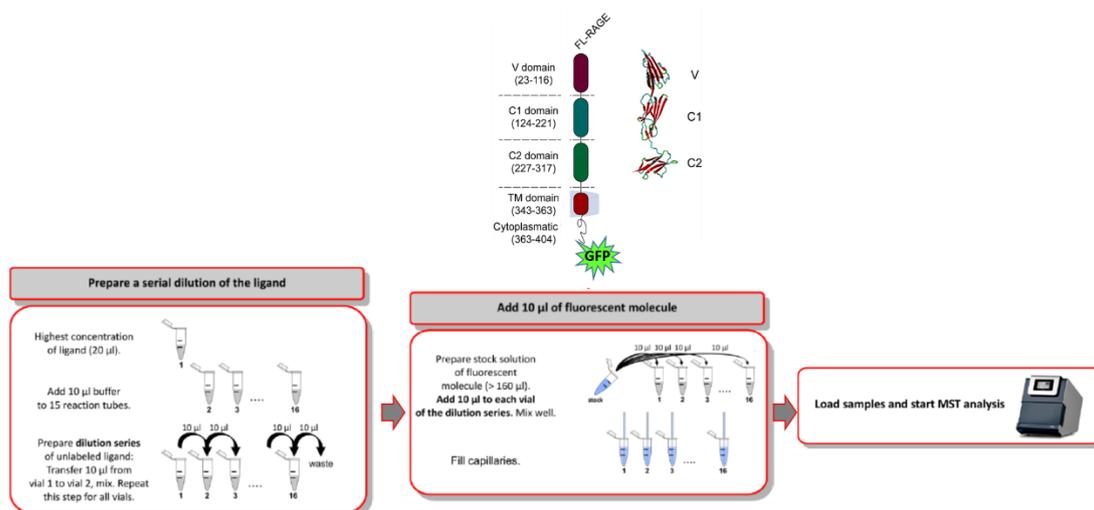


Figure 26 : *Protocole simplifié d'une expérience de thermophorèse à microéchelle*

Résultats

Lors de chaque expérience de thermophorèse, la fluorescence de base des homogénats membranaires est contrôlée via un « CapScan ». Celle-ci doit être comprise entre 200 et 1000 unités de fluorescence (FU, gamme dynamique de l'appareillage), idéalement aux alentours de 500 FU. D'autres paramètres sont également contrôlés tels que l'uniformité de l'intensité de fluorescence de la protéine dans toutes les conditions testées, la fluorescence intrinsèque éventuelle des composés testés ainsi que des réactions d'agrégation éventuelles entre l'homogénat membranaire et le capillaire. La figure 27 ci-dessous représente la vérification de ces paramètres effectuée en thermophorèse.

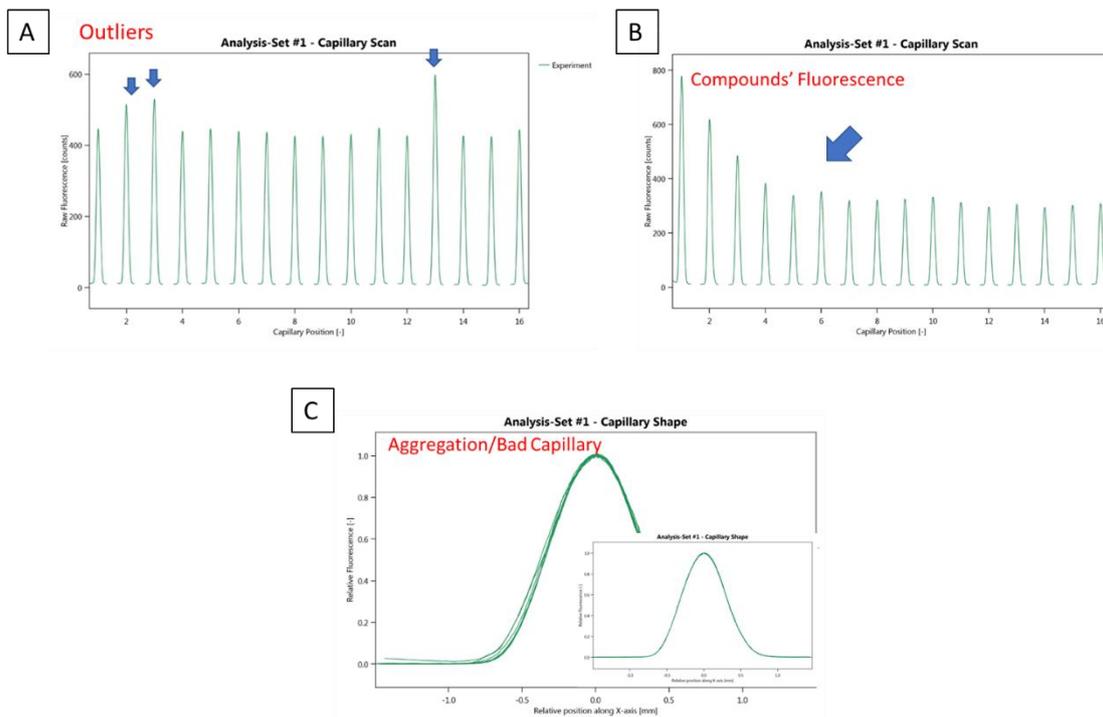
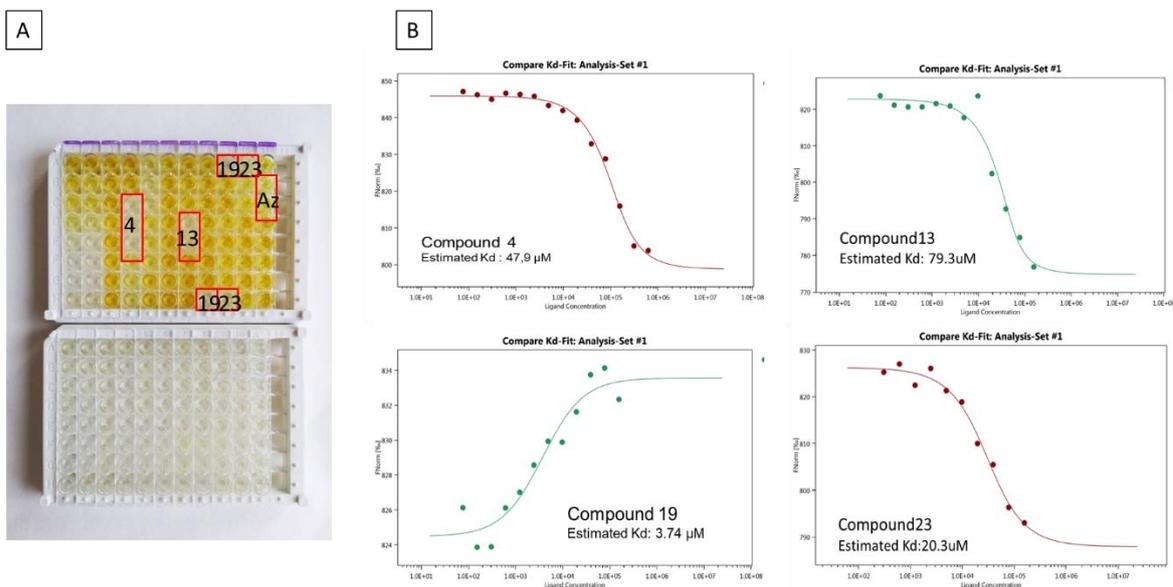


Figure 27 : Etude préalable de l'uniformité de l'intensité de fluorescence dans les capillaires (A), de la fluorescence intrinsèque éventuelle des composés (B) ainsi que de l'aggrégation entre les protéines de l'homogénat et les capillaires lors d'une expérience de thermophorèse.

Les résultats de thermophorèse (figure 28) ont été obtenus entre les homogénats membranaires exprimant FL-RAGE-GFP et une gamme de concentration des différents composés testés allant de 0,625 à 160 μM et de 2,4 nM à 5 μM lors de l'étude de l'interaction moléculaire entre le RAGE et l'HMGB1. A partir de ces isothermes de liaison, le logiciel extrapole une fraction liée et une fraction non liée et il est possible de déterminer la constante de dissociation K_d .



C

Composé	ELISA (% Inh à 10 μM)	ELISA (IC ₅₀ μM)	MST Kd /μM for RAGE
HEI 4	86		47.3±7,05
HEI 6	64		
HEI 13	80		79.3
HEI 19	90		3.74
HEI 23	75		20.3
HEI 1820	100		10.3
HEI 1806	74		14.6
HEI 2601	90±5.68	1.42±0.38	ND
HEI 2619	53±8.54	6.54±0.52	ND
HEI 2654	80		
HEI 1785	49	>10	
HEI 1846	36	>10	
HEI 1416	37	>10	
Urolithin B	26	>10	
FPS-ZM1	14		
Azeliragon	47		16.2±7.05
HMGB1			0.049±0.028

Figure 28 : Etude de l'inhibition de l'interaction AGE-BSA – sRAGE par des composés issus de la chimiothèque d'HEI (A). Etude des composés actifs par thermophorèse (B). Valeurs des pourcentages d'inhibition, des IC_{50} ainsi que des K_d obtenus à ce jour pour les composés les plus actifs (C).

L'obtention de molécules ayant une affinité pour le RAGE nous permet maintenant d'envisager des études de fonctionnalité afin de déterminer l'absence ou la présence d'effet antagoniste des composés sélectionnés.

IVd) Etude de la fonctionnalité des composés sélectionnés

Les études de fonctionnalité des composés sélectionnés par ELISA et par thermophorèse nécessitent un modèle cellulaire exprimant de façon stable le récepteur RAGE à la membrane. Un des modèles cellulaires les plus étudiés dans la littérature est le modèle HEK transfecté de manière stable par le RAGE-FL. A mon arrivée dans le laboratoire, ce modèle était en cours d'étude mais aucun résultat de fonctionnalité, en présence de différents ligands de RAGE connus, n'a pu être obtenu. Après l'étude de l'expression membranaire du récepteur (voir figure 22), le Pr E. Boulanger m'a confié le développement de ce modèle cellulaire.

Avec l'aide de Charles Paul-Constant, technicien en biologie cellulaire et moléculaire au laboratoire, nous avons procédé à l'étude de l'expression membranaire de RAGE du modèle alors disponible au laboratoire, par la technique de cytométrie en flux.

Principe de la méthode

Le principe de l'analyse des cellules en cytométrie en flux est basé sur la réaction d'immunofluorescence. Cette réaction associe la spécificité des anticorps monoclonaux et les propriétés des fluorophores. La technique de marquage que nous avons choisi est l'immunofluorescence indirecte où l'anticorps engagé dans la réaction est révélé par un deuxième anticorps lui-même fluorescent.

Des cellules HEK sauvages ou HEK-RAGE-FL sont incubées avec un anticorps primaire anti-RAGE de souris (abcam ab89911) puis avec un anticorps secondaire anti-souris de chèvre marqué à la phycoérythrine (R&D F0102B). Les contrôles internes réalisés sont les suivants : la mesure de l'autofluorescence des cellules, la mesure de la fluorescence résiduelle en présence de l'anticorps secondaire seul ou l'utilisation d'un isotype de souris. Les cellules en suspension passent une à une devant un ou plusieurs faisceau(x) laser et des détecteurs captent des signaux émis par chaque cellule:

- La lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui renseigne sur la taille des particules
- La lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter – SSC) qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des particules.
- Les signaux de fluorescence

Les données ainsi recueillies se présentent sous forme de graphiques auxquels s'ajoutent des statistiques concernant les populations cellulaires et les paramètres étudiés.

Résultats

Cette expérience nous a permis, d'une part, de constater qu'environ 20% seulement des cellules du modèle détenu au laboratoire présentaient une expression membranaire du RAGE et, d'autre part, de procéder à un tri de ces cellules de manière à obtenir, après réensemencement, trois

populations distinctes de cellules exprimant le RAGE membranaire de façon plus ou moins importante. Nous avons pu ainsi isoler des cellules exprimant faiblement, moyennement et fortement le RAGE à la membrane. Après cette étape de tri et de réensemencement, 80% de la population cellulaire expriment le RAGE. Cette différence d'expression a été confirmée dans une expérience préliminaire d'immunocytochimie (figure 29).

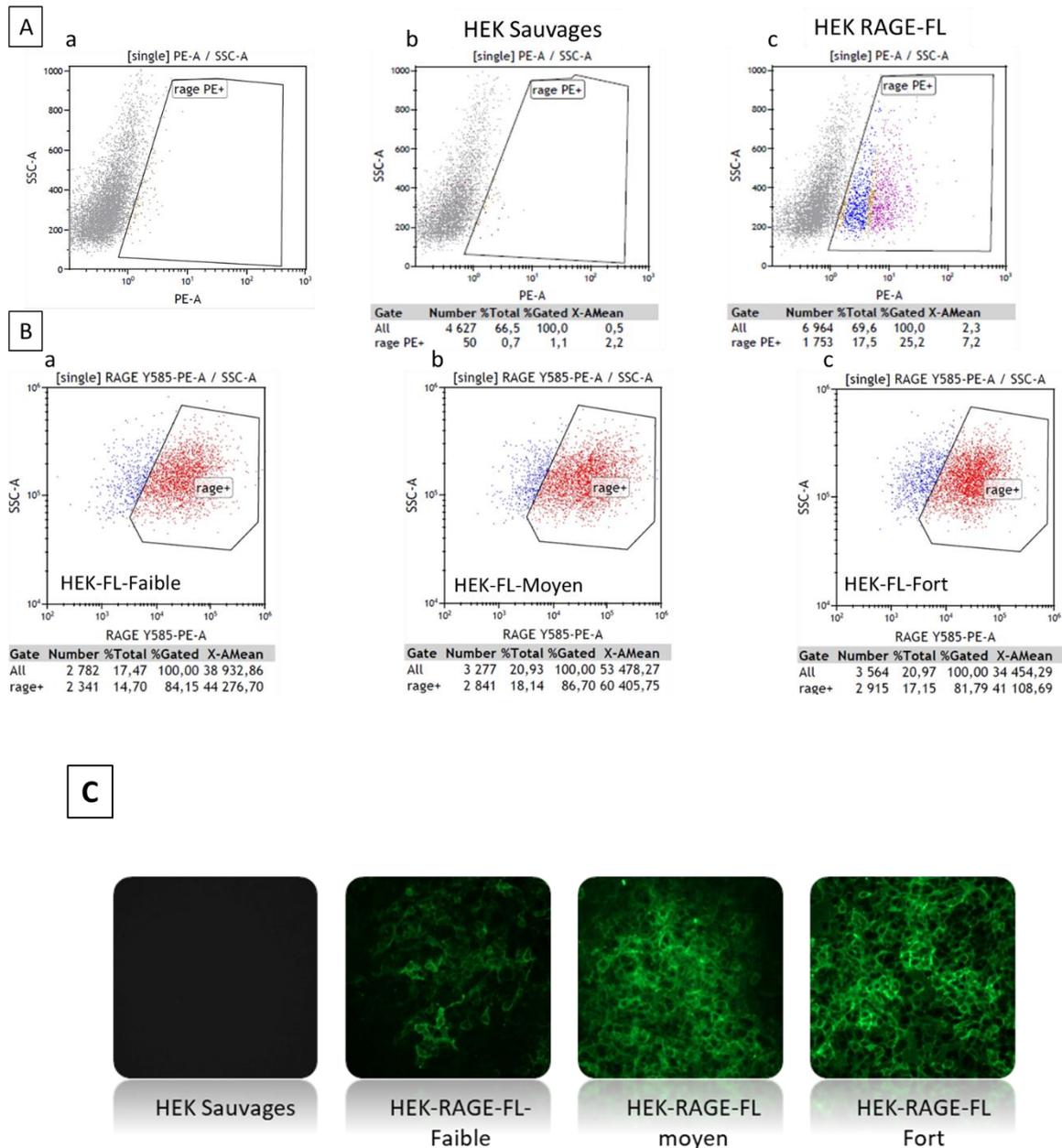


Figure 29 : Graphiques obtenus lors de l'étude par cytométrie en flux de cellules HEK sauvages et de cellules HEK-RAGE-FL (A). Autofluorescence des cellules HEK-RAGE-FL (a), expression de RAGE dans les cellules HEK sauvages (b), expression de RAGE dans les cellules HEK-RAGE-FL (c). Etude par cytométrie en flux après isolement et réensemencement (B) de cellules exprimant faiblement (a), moyennement (b) ou fortement (c) RAGE. Etude préliminaire des cellules exprimant faiblement, moyennement ou fortement RAGE en immunocytochimie (C).

Nous poursuivons actuellement la caractérisation des cellules exprimant plus ou moins le RAGE à la membrane afin d'envisager prochainement l'étude de la fonctionnalité des hits obtenus. Les cellules seront stimulées avec divers ligands de RAGE (AGE-BSA, HMGB1, S100A6, ou CML), impliqués dans les voies inflammatoires médiées par ce récepteur, en présence ou en l'absence de hits. La mesure des espèces réactives de l'oxygène par cytométrie en flux et des études de gène rapporteur NF- κ B/luciférase seront effectuées pour rechercher les meilleurs antagonistes de la réponse oxydative et inflammatoire dépendante de RAGE. Les meilleurs antagonistes feront l'objet d'une évaluation plus poussée de l'inhibition du processus inflammatoire en vérifiant l'activation des protéines Akt et Erk par Western Blot et la détection de la production de l'IL-6 et de TNF α par la technique de PCR quantitative.

V- Conclusion, perspectives et valorisation

Sur la base des ligands et des antagonistes du RAGE (petites molécules) décrits dans la littérature, et particulièrement les structures de l'Azéloragon et du FPS-ZM1, une série de 80 molécules provenant de la chimiothèque d'HEI (contenant 3700 molécules) a été sélectionnée pour réaliser un premier criblage *in vitro* sur le récepteur aux AGEs. Ce criblage a été réalisé à l'aide d'un test ELISA. Des molécules présentant une affinité suffisante (inhibition de l'interaction AGE2-BSA/RAGE à 10 μ M \geq à 50%) pour les considérer comme des « hits », ont été identifiées (HEI 2601 et HEI 2619) et des valeurs de CI_{50} ont pu être mesurées : HEI 2601 : CI_{50} (AGE2-sRAGE) = 1.42 \pm 0.38 μ M et HEI 2619 : CI_{50} (AGE2-sRAGE) = 6.54 \pm 0.52 μ M. A titre de comparaison, le pourcentage d'inhibition de l'Azéloragon déterminé dans le même test varie entre 47 à 53 % pour une concentration testée de 10 μ M. La CI_{50} de l'Azéloragon dans ce test avoisine donc 10 μ M.

Ces hits ont constitué nos molécules « modèle » pour :

1) *isoler des molécules supplémentaires de la chimiothèque HEI présentant une structure chimique similaire à celle des hits HEI 2601 et HEI 2619 ;*

2) *la synthèse de dérivés des hits identifiés avec une affinité anti-RAGE améliorée (drug design).*

Pour ce faire, des synthèses supplémentaires sont nécessaires pour consolider les relations structure-affinité et pour proposer une nouvelle série de molécules ciblant ce récepteur.

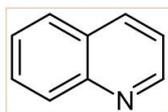
Une nouvelle série de 89 molécules supplémentaires, issue de la chimiothèque d'HEI, a donc été sélectionnée pour une évaluation par la technique ELISA. Ces nouveaux tests nous ont permis d'identifier 12 nouveaux « hits » (molécule présentant une activité inhibitrice de l'interaction AGE2-sRAGE *in vitro*).

Pour résumer, sur un total de 169 molécules HEI testées, 15 hits ont été identifiés à l'aide du test ELISA. Pour certains de ces composés, une constante d'affinité, K_d , a été mesurée en thermophorèse. Il est important de noter que 11 des 15 hits identifiés présentent un potentiel d'inhibition de l'interaction AGE2-sRAGE plus important que celui engendré par la molécule de référence Azéloragon à la même concentration testée, soit à 10 μ M.

Quatre séries chimiques différentes, identifiées comme ligands potentiels de RAGE, ont été découvertes (Figure 30).

Métalloènes

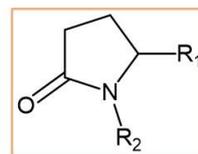
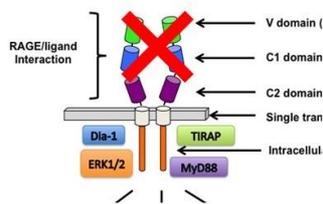
10 hits



Quinoléines

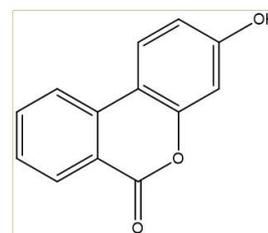
2 hits

Des travaux supplémentaires en cours sur les 4 familles



Dérivés de type pyrrolidin-2-ones

2 hits



Urolithines

1 hit

Figure 30 : Structure des 4 séries chimiques interagissant avec RAGE

Les composés les plus prometteurs à ce jour appartiennent à la série des métalloènes. Dix hits appartiennent à cette famille. Cette famille de composés fait actuellement l'objet d'une déclaration d'invention déposée à la SATT Nord. Deux hits appartiennent à la famille des pyrrolidine-2-ones. Deux dérivés de type quinoléine ont également présenté une affinité prometteuse. Enfin, un dérivé naturel appelé urolithine B a présenté une inhibition modérée de l'interaction AGE2-sRAGE.

La technique de thermophorèse à microéchelle nous a permis aujourd'hui de mesurer une constante d'affinité, Kd, pour 6 des 15 hits identifiés. Les autres sont actuellement en cours d'évaluation. Cette technique nous permet de conforter les hypothèses initiales observées par ELISA.

L'équipe de chimie d'HEI s'est dernièrement focalisée sur la synthèse de nouveaux analogues de certains hits identifiés. Ainsi, une nouvelle série de 53 molécules, non décrites dans la littérature, vient d'être obtenue. Les composés ont été réceptionnés et seront prochainement évalués.

Des études *in silico* seront également conduites en parallèle pour évaluer l'interaction moléculaire potentielle de nouveaux composés identifiés. Ce travail sera réalisé en partenariat avec l'université de Rouen. Le mode de liaison de ces composés sera étudié pour découvrir les principales caractéristiques responsables de leur affinité et de leur activité antagoniste potentielle.

La caractérisation de modèles cellulaires HEK-RAGE-FL est actuellement en cours et nous permettra, dans les semaines à venir, d'étudier, en présence de ligands connus du RAGE (HMGB1, AGE-BSA, S100A6...), la fonctionnalité de ce récepteur dans ces cellules. Le prétraitement de ces cellules avec les hits identifiés nous permettra de déterminer leur propriété antagoniste.

Par la suite, l'étude de l'affinité de ces hits, vis-à-vis de récepteurs à forte homologie de séquence avec le RAGE ou connus pour lier avec une affinité élevée les mêmes ligands, sera effectuée afin d'augmenter la sélectivité des hits identifiés pour le récepteur.

Des données préliminaires ont montré une réduction de l'hypertrophie cardiaque quantifiée par zone myocytaire chez des souris RAGE^{-/-} âgées de 22 mois par rapport aux souris témoins de la portée. Une fois la fonctionnalité des hits confirmée, ceux-ci seront testés sur un modèle de cardiomyocytes afin de déterminer les antagonistes qui bloquent l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par l'activation du RAGE (collaboration avec le Dr Florence Pinet, équipe 2, U1167).

C. elegans est un modèle pertinent pour étudier le vieillissement et pour analyser l'expression hétérologue de molécules humaines actives, y compris les récepteurs et leur intégration dans la machinerie de signalisation des nématodes. Bien que *C. elegans* n'ait pas d'orthologue du RAGE humain, nous avons réussi à exprimer ce récepteur dans le ver (Dr Chantal Fradin). Les données préliminaires montrent que le RAGE humain a contrôlé la longévité de *C. elegans* sur un milieu riche en CML. Nous avons récemment montré que la CML exogène peut induire des gènes de réponse au stress oxydatif dépendant de SKN-1/Nrf1, 2 chez *C. elegans* (données non publiées). Dans ce contexte, nous utiliserons ce modèle pour étudier la modulation *in vivo* de la génération contrôlée et prolongée de ROS par les antagonistes de RAGE et son impact sur la longévité du ver.

Enfin, les « hits » les plus intéressants, appelés « leads », seront évalués sur un modèle murin de vieillissement rénal induit par la CML.

L'exploration de différentes méthodes nous permettant aujourd'hui d'identifier des ligands potentiels de RAGE ainsi que les résultats obtenus m'ont permis ou me permettent aujourd'hui de participer :

- au projet CPER-CTRL (Contrat Plan État Région – Centre Transdisciplinaire de Recherche sur la Longévité) de juin 2018 à juin 2019, intitulé “Antagonistes du RAGE pour contrôler le vieillissement inflammatoire systémique chronique” (RAGE Antagonists fighting inflammaging) et coordonné par le Pr Eric Boulanger (UMR995 / LIRIC) et le Dr Florence Pinet (Inserm U1167).

- au projet ANR ExoAgeing (obtenu en juin 2019) “Effets d'une exposition précoce et chronique aux AGE alimentaires sur l'inflammation chronique à bas bruit et les troubles liés à l'âge”, coordonné par le Pr Philippe Gillery (Reims).

- à une déclaration d'invention déposée à la SATT Nord. Cette déclaration d'invention intitulée « Développement de ligands du récepteur des produits de glycation avancée (RAGE) dans le cadre du contrôle et de la prévention du vieillissement physiologique normal en lien avec «l'inflammaging», et également dans le vieillissement accéléré des maladies chroniques et/ou liées au vieillissement» a été déposée en juin 2019. Suite à ce dépôt, un programme de pré-maturation financé par la SATT Nord a démarré afin de confirmer l'activité de ces hits et d'avancer sur l'évaluation de cette activité *via* un test de fonctionnalité. Un programme de maturation est également envisagé en fonction des résultats.

Ce projet d'étude de l'affinité de ligands potentiels du RAGE m'a permis également d'accueillir en stage et d'encadrer M^{lle} Gaëlle Grolaux, étudiante en Licence Pro “Innovation Thérapeutique et Biotechnologies” (Novembre 2019 – Février 2020) et Mr Zhuo La, étudiant en 4^{ème} année de Pharmacie (Université de Wuhan, Chine, Novembre 2019 – Avril 2020).

Le co-encadrement d'un étudiant en Master 2 (février 2021 – juin 2021), en collaboration avec le Dr Muriel Billamboz (HEI) est envisagé dans le cadre du Projet ReAGIr – “Développement d'antagonistes potentiels du RAGE”.

Enfin, une collaboration internationale a également été initiée avec le Dr Anita Kornicka (Université de Gdansk, Faculté de Pharmacie, Pologne) concernant l'étude de l'affinité de composés de type acrylonitrile, *N*-vinyldole et imidazoline avec le RAGE.

VI- Références

1. Sessa, L. *et al.* The Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE) Is Only Present in Mammals, and Belongs to a Family of Cell Adhesion Molecules (CAMs). *PLoS ONE* **9**, e86903 (2014).
2. Akirav, E. M. *et al.* RAGE Expression in Human T Cells: A Link between Environmental Factors and Adaptive Immune Responses. *PLoS ONE* **7**, e34698 (2012).
3. Manfredi, A. A. *et al.* Maturing Dendritic Cells Depend on RAGE for In Vivo Homing to Lymph Nodes. *J Immunol* **180**, 2270–2275 (2008).
4. Narumi, K. *et al.* Proinflammatory Proteins S100A8/S100A9 Activate NK Cells via Interaction with RAGE. *J.I.* **194**, 5539–5548 (2015).
5. Schmidt, A. M. 2016 *ATVB* Plenary Lecture: Receptor for Advanced Glycation Endproducts and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Cardiometabolic Disorders: Spotlight on the Macrophage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **37**, 613–621 (2017).
6. Demling, N. *et al.* Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell Tissue Res* **323**, 475–488 (2006).
7. Shirasawa, M. *et al.* Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells: RAGE is a marker of ATI cells. *Genes to Cells* **9**, 165–174 (2004).
8. Hudson, B. I. *et al.* Identification, classification, and expression of *RAGE* gene splice variants. *FASEB j.* **22**, 1572–1580 (2008).
9. Kalea, A. Z. *et al.* Alternative splicing of the murine receptor for advanced glycation end-products (RAGE) gene. *FASEB j.* **23**, 1766–1774 (2009).
10. Simm, A. *et al.* Age associated changes of AGE-receptor expression: RAGE upregulation is associated with human heart dysfunction. *Experimental Gerontology* **39**, 407–413 (2004).

11. Kumar, V. *et al.* Homeostatic nuclear RAGE–ATM interaction is essential for efficient DNA repair. *Nucleic Acids Research* **45**, 10595–10613 (2017).
12. Bongarzone, S., Savickas, V., Luzi, F. & Gee, A. D. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *J. Med. Chem.* **60**, 7213–7232 (2017).
13. Yatime, L. & Andersen, G. R. Structural insights into the oligomerization mode of the human receptor for advanced glycation end-products. *FEBS J* **280**, 6556–6568 (2013).
14. Xue, J. *et al.* Advanced Glycation End Product Recognition by the Receptor for AGEs. *Structure* **19**, 722–732 (2011).
15. Koch, M. *et al.* Structural Basis for Ligand Recognition and Activation of RAGE. *Structure* **18**, 1342–1352 (2010).
16. Dattilo, B. M. *et al.* The Extracellular Region of the Receptor for Advanced Glycation End Products Is Composed of Two Independent Structural Units [†]. *Biochemistry* **46**, 6957–6970 (2007).
17. Sturchler, E., Galichet, A., Weibel, M., Leclerc, E. & Heizmann, C. W. Site-Specific Blockade of RAGE-Vd Prevents Amyloid- Oligomer Neurotoxicity. *Journal of Neuroscience* **28**, 5149–5158 (2008).
18. Xue, J. *et al.* The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Specifically Recognizes Methylglyoxal-Derived AGEs. *Biochemistry* **53**, 3327–3335 (2014).
19. Hori, O. *et al.* The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Is a Cellular Binding Site for Amphoterin: MEDIATION OF NEURITE OUTGROWTH AND CO-EXPRESSION OF RAGE AND AMPHOTERIN IN THE DEVELOPING NERVOUS SYSTEM. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 25752–25761 (1995).
20. Park, H. & Boyington, J. C. The 1.5 Å Crystal Structure of Human Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) Ectodomains Reveals Unique Features Determining Ligand Binding. *J. Biol. Chem.* **285**, 40762–40770 (2010).

21. Yatime, L. Un mécanisme d'activation cystéine-dépendant pour les ligands pro-inflammatoires de RAGE ? *Med Sci (Paris)* **33**, 351–354 (2017).
22. Xie, J. *et al.* Structural Basis for Pattern Recognition by the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE). *J. Biol. Chem.* **283**, 27255–27269 (2008).
23. Zong, H. *et al.* Homodimerization Is Essential for the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)-mediated Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **285**, 23137–23146 (2010).
24. Xu, D. *et al.* Stable RAGE-Heparan Sulfate Complexes Are Essential for Signal Transduction. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1611–1620 (2013).
25. Rodriguez Gonzalez-Moro, J. M. *et al.* Impact of COPD severity on physical disability and daily living activities: EDIP-EPOC I and EDIP-EPOC II studies. *International Journal of Clinical Practice* **63**, 742–750 (2009).
26. Sakaguchi, M. *et al.* TIRAP, an Adaptor Protein for TLR2/4, Transduces a Signal from RAGE Phosphorylated upon Ligand Binding. *PLoS ONE* **6**, e23132 (2011).
27. Rai, V. *et al.* Signal Transduction in Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE): SOLUTION STRUCTURE OF C-TERMINAL RAGE (ctRAGE) AND ITS BINDING TO mDia1. *J. Biol. Chem.* **287**, 5133–5144 (2012).
28. Huttunen, H. J., Fages, C. & Rauvala, H. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)-mediated Neurite Outgrowth and Activation of NF- κ B Require the Cytoplasmic Domain of the Receptor but Different Downstream Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* **274**, 19919–19924 (1999).
29. Harja, E. *et al.* Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 183–194 (2008).
30. Fishman, S. L., Sonmez, H., Basman, C., Singh, V. & Poretzky, L. The role of advanced glycation end-products in the development of coronary artery disease in patients with and without diabetes mellitus: a review. *Mol Med* **24**, 59 (2018).

31. Jules, J., Maiguel, D. & Hudson, B. I. Alternative Splicing of the RAGE Cytoplasmic Domain Regulates Cell Signaling and Function. *PLoS ONE* **8**, e78267 (2013).
32. Ding, Q. & Keller, J. N. Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1746**, 18–27 (2005).
33. Braley, A. *et al.* Regulation of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Ectodomain Shedding and Its Role in Cell Function. *J. Biol. Chem.* **291**, 12057–12073 (2016).
34. Raucci, A. *et al.* A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB j.* **22**, 3716–3727 (2008).
35. Galichet, A., Weibel, M. & Heizmann, C. W. Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **370**, 1–5 (2008).
36. Teissier, T. *et al.* Knockout of receptor for advanced glycation end-products attenuates age-related renal lesions. *Aging Cell* **18**, e12850 (2019).
37. Ravichandran, G. *et al.* Food advanced glycation end products as potential endocrine disruptors: An emerging threat to contemporary and future generation. *Environ Int* **123**, 486–500 (2019).
38. Thornalley, P. J. *et al.* Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochemical Journal* **375**, 581–592 (2003).
39. Shuvaev, V. V. *et al.* Increased protein glycation in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease 2 2Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; AGEs, advanced glycation end products; apo, apolipoprotein; BSA, bovine serum albumin; CSF, cerebrospinal fluid;

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; PBS, phosphate buffer saline.

Neurobiology of Aging **22**, 397–402 (2001).

40. Monnier, V. & Cerami, A. Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* **211**, 491–493 (1981).
41. Sell, D. R. *et al.* Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 485–490 (1996).
42. Verzijl, N. *et al.* Effect of Collagen Turnover on the Accumulation of Advanced Glycation End Products. *J. Biol. Chem.* **275**, 39027–39031 (2000).
43. Kislinger, T. *et al.* N^{ϵ} -(Carboxymethyl)Lysine Adducts of Proteins Are Ligands for Receptor for Advanced Glycation End Products That Activate Cell Signaling Pathways and Modulate Gene Expression. *J. Biol. Chem.* **274**, 31740–31749 (1999).
44. Fatchiyah, F., Hardiyanti, F. & Widodo, N. Selective Inhibition on RAGE-binding AGEs Required by Bioactive Peptide Alpha-S2 Case in Protein from Goat Ethawah Breed Milk: Study of Biological Modeling. *Acta Inform Med* **23**, 90 (2015).
45. van Hout, G. P., Arslan, F., Pasterkamp, G. & Hoefler, I. E. Targeting danger-associated molecular patterns after myocardial infarction. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **20**, 223–239 (2016).
46. Bresnick, A. R., Weber, D. J. & Zimmer, D. B. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* **15**, 96–109 (2015).
47. Oliveira, J. B., Soares, A. A. S. M. & Sposito, A. C. Inflammatory Response During Myocardial Infarction. in *Advances in Clinical Chemistry* vol. 84 39–79 (Elsevier, 2018).
48. Leclerc, E., Fritz, G., Vetter, S. W. & Heizmann, C. W. Binding of S100 proteins to RAGE: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1793**, 993–1007 (2009).

49. Ostendorp, T. *et al.* Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B. *EMBO J* **26**, 3868–3878 (2007).
50. Xie, J. *et al.* Hexameric Calgranulin C (S100A12) Binds to the Receptor for Advanced Glycated End Products (RAGE) Using Symmetric Hydrophobic Target-binding Patches. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 4218–4231 (2006).
51. Indurthi, V. S. K. *et al.* The Trp triad within the V-domain of the receptor for advanced glycation end products modulates folding, stability and ligand binding. *Bioscience Reports* **40**, BSR20193360 (2020).
52. Iannuzzi, C., Irace, G. & Sirangelo, I. Differential effects of glycation on protein aggregation and amyloid formation. *Front. Mol. Biosci.* **1**, (2014).
53. Deane, R. *et al.* A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* **122**, 1377–1392 (2012).
54. Yan, S. D. *et al.* RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* **382**, 685–691 (1996).
55. Sousa, M. M., Yan, S. D., Stern, D. & Saraiva, M. J. Interaction of the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) with Transthyretin Triggers Nuclear Transcription Factor κ B (NF- κ B) Activation. *Lab Invest* **80**, 1101–1110 (2000).
56. Zhu, X. *et al.* Cytosolic HMGB1 controls the cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation. *J. Clin. Invest.* **125**, 1098–1110 (2015).
57. Bianchi, M. E. & Agresti, A. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development* **15**, 496–506 (2005).
58. Evankovich, J. *et al.* High Mobility Group Box 1 Release from Hepatocytes during Ischemia and Reperfusion Injury Is Mediated by Decreased Histone Deacetylase Activity. *J. Biol. Chem.* **285**, 39888–39897 (2010).

59. Tsung, A., Tohme, S. & Billiar, T. R. High-mobility group box-1 in sterile inflammation. *J Intern Med* **276**, 425–443 (2014).
60. Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**, 191–195 (2002).
61. Son, M. *et al.* Age dependent accumulation patterns of advanced glycation end product receptor (RAGE) ligands and binding intensities between RAGE and its ligands differ in the liver, kidney, and skeletal muscle. *Immun Ageing* **14**, 12 (2017).
62. Magna, M. & Pisetsky, D. S. The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Mol Med* **20**, 138–146 (2014).
63. Lugo-Huitrón, R. *et al.* Quinolinic Acid: An Endogenous Neurotoxin with Multiple Targets. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2013**, 1–14 (2013).
64. Serratos, I. N. *et al.* Modeling the Interaction between Quinolate and the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE): Relevance for Early Neuropathological Processes. *PLoS ONE* **10**, e0120221 (2015).
65. Cuevas, E. *et al.* On the early toxic effect of quinolinic acid: Involvement of RAGE. *Neuroscience Letters* **474**, 74–78 (2010).
66. Ruan, B. H. *et al.* Complement C3a, CpG Oligos, and DNA/C3a Complex Stimulate IFN- α Production in a Receptor for Advanced Glycation End Product-Dependent Manner. *J.I.* **185**, 4213–4222 (2010).
67. He, M. *et al.* Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. *EMBO Rep* **12**, 358–364 (2011).
68. Fritz, G. RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends in Biochemical Sciences* **36**, 625–632 (2011).
69. Touré, F. *et al.* Formin mDia1 Mediates Vascular Remodeling via Integration of Oxidative and Signal Transduction Pathways. *Circ Res* **110**, 1279–1293 (2012).

70. Reddy, M. A. *et al.* Key Role of Src Kinase in S100B-induced Activation of the Receptor for Advanced Glycation End Products in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 13685–13693 (2006).
71. Li, Y. *et al.* RAGE/NF- κ B signaling mediates lipopolysaccharide induced acute lung injury in neonate rat model. *Int J Clin Exp Med* **8**, 13371–13376 (2015).
72. Huang, J. S. *et al.* Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. *J Cell Biochem* **81**, 102–113 (2001).
73. Liu, Y. *et al.* AGEs increased migration and inflammatory responses of adventitial fibroblasts via RAGE, MAPK and NF-kappaB pathways. *Atherosclerosis* **208**, 34–42 (2010).
74. Yeh, C. H. *et al.* Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes* **50**, 1495–1504 (2001).
75. Kierdorf, K. & Fritz, G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol* **94**, 55–68 (2013).
76. Deng, R. *et al.* Glucose-derived AGEs enhance human gastric cancer metastasis through RAGE/ERK/Sp1/MMP2 cascade. *Oncotarget* **8**, 104216–104226 (2017).
77. Tanaka, N. *et al.* The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **275**, 25781–25790 (2000).
78. Jandial, R. *et al.* Inhibition of GLO1 in Glioblastoma Multiforme Increases DNA-AGEs, Stimulates RAGE Expression, and Inhibits Brain Tumor Growth in Orthotopic Mouse Models. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).

79. Byun, K. *et al.* Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases. *Pharmacol Ther* **177**, 44–55 (2017).
80. Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M. & Creager, M. A. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* **114**, 597–605 (2006).
81. Grossin, N. *et al.* Dietary CML-enriched protein induces functional arterial aging in a RAGE-dependent manner in mice. *Mol Nutr Food Res* **59**, 927–938 (2015).
82. Gu, Q. *et al.* Contribution of receptor for advanced glycation end products to vasculature-protecting effects of exercise training in aged rats. *Eur J Pharmacol* **741**, 186–194 (2014).
83. Tessier, F. J. *et al.* Quantitative assessment of organ distribution of dietary protein-bound ¹³C-labeled N ϵ -carboxymethyllysine after a chronic oral exposure in mice. *Mol Nutr Food Res* **60**, 2446–2456 (2016).
84. Daroux, M. *et al.* Advanced glycation end-products: implications for diabetic and non-diabetic nephropathies. *Diabetes Metab* **36**, 1–10 (2010).
85. Akchurin, O. M. & Kaskel, F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif* **39**, 84–92 (2015).
86. Fang, F. *et al.* RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, A β accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* **24**, 1043–1055 (2010).
87. Chen, J. *et al.* Inhibition of AGEs/RAGE/Rho/ROCK pathway suppresses non-specific neuroinflammation by regulating BV2 microglial M1/M2 polarization through the NF- κ B pathway. *J Neuroimmunol* **305**, 108–114 (2017).
88. Candela, P. *et al.* Apical-to-basolateral transport of amyloid- β peptides through blood-brain barrier cells is mediated by the receptor for advanced glycation end-products and is restricted by P-glycoprotein. *J Alzheimers Dis* **22**, 849–859 (2010).

89. Burstein, A. H. *et al.* Development of Azeliragon, an Oral Small Molecule Antagonist of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts, for the Potential Slowing of Loss of Cognition in Mild Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimers Dis* **5**, 149–154 (2018).
90. Rojas, A., Morales, M., Gonzalez, I. & Araya, P. Inhibition of RAGE Axis Signaling: A Pharmacological Challenge. *Curr Drug Targets* **20**, 340–346 (2019).
91. Cary, B. P. *et al.* Synthesis and Evaluation of [(18F)RAGER: A First Generation Small-Molecule PET Radioligand Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts. *ACS Chem Neurosci* **7**, 391–398 (2016).
92. El-Far, A. H. A. M. *et al.* In vitro anticancer effects of a RAGE inhibitor discovered using a structure-based drug design system. *Oncol Lett* **15**, 4627–4634 (2018).
93. Cui, L. *et al.* A Novel, Multi-Target Natural Drug Candidate, Matrine, Improves Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease Transgenic Mice by Inhibiting A β Aggregation and Blocking the RAGE/A β Axis. *Mol Neurobiol* **54**, 1939–1952 (2017).
94. Lin, L. RAGE on the Toll Road? *Cell Mol Immunol* **3**, 351–358 (2006).
95. Teissier, T. & Boulanger, É. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an important pattern recognition receptor (PRR) for inflammaging. *Biogerontology* **20**, 279–301 (2019).
96. Franceschi, C., Garagnani, P., Vitale, G., Capri, M. & Salvioli, S. Inflammaging and 'Garb-aging'. *Trends Endocrinol Metab* **28**, 199–212 (2017).