



Université de Limoges

ED 652 - Biologie, Chimie, Santé (BCS)

INSERM - U1248 - Pharmacologie & Transplantation (P&T)

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Recherche clinique, Innovation technologique et thérapeutique

Présentée et soutenue par

Roy LAKIS

Le 7 décembre 2023

Modifications de l'albumine comme biomarqueurs précoces des hépatopathies chroniques

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

JURY :

Présidente du jury

Mme. **Véronique LOUSTAUD-RATTI**, PU-PH, Service de médecine interne et polyclinique, CHU de Limoges

Rapporteurs

M. **Jérôme GUITTON**, PU-PH, Laboratoire de pharmacologie-toxicologie, Centre hospitalier Lyon-Sud-HCL

M. **Chadi ABBARA**, PH, Service de pharmacologie-toxicologie, CHU d'Angers

Examineurs

Mme. **Véronique LOUSTAUD-RATTI**, PU-PH, Service de médecine interne et polyclinique, CHU de Limoges

M. **Thomas FALGUIERES**, Chercheur INSERM (CRHC), UMR_S 1193 Physiopathogénèse et traitement des maladies du foie, Université Paris-Saclay

Directeur et co-directeur

M. **Souleiman EL BALKHI**, PH, Service de pharmacologie, toxicologie et pharmacovigilance, CHU de Limoges

M. **Franck SAINT-MARCOUX**, PU-PH, Service de pharmacologie, toxicologie et pharmacovigilance, CHU de Limoges



~A ma famille

“La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés.”
Louis Pasteur

Remerciements

Je tiens à remercier l'Université de Limoges et l'École Doctorale Ω -LIM-Biologie-Chimie-Santé (BCS) pour m'avoir offert la formation et les moyens qui m'ont permis de réaliser cette thèse avec succès.

Au **Pr. Jérôme GUITTON** et **Dr. Chadi ABBARA** en leurs qualités de rapporteurs, **Pr. Véronique LOUSTAUD-RATTI** et **Dr. Thomas FALGUIERES** en leurs qualités d'examineurs, c'est un honneur de vous compter parmi les membres de ce jury. Merci à chacun d'entre vous pour le temps consacré à la lecture critique de mes travaux. Recevez ici le témoignage de mon profond respect.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse. Le parcours académique a été long et exigeant, mais il a été rendu possible grâce au soutien et aux encouragements de nombreuses personnes exceptionnelles. Je tiens à remercier sincèrement :

Le **Dr. Souleiman EL BALKHI**. D'un albuminologue à un autre, je tiens à te remercier pour la confiance que tu m'as accordée en me choisissant pour diriger les travaux de cet ambitieux projet. Je te remercie également pour ton soutien, tes conseils, ta disponibilité, ta bonne humeur, ta gentillesse, et surtout pour ton encadrement que j'ai beaucoup apprécié tout au long de ces années. Je te prie d'accepter mes remerciements les plus sincères. Trouve dans ce travail le témoignage de ma profonde gratitude. Le prix Nobel se rapproche \m/.

Le **Pr. Franck SAINT-MARCOUX**. Je tiens à te remercier pour la confiance que tu m'as accordée en me choisissant pour diriger les travaux de ce projet. Je te remercie également pour ton soutien, ton encouragement, ta bonne humeur et ta gentillesse. Trouve dans ce travail le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

Le **Pr. Pierre MARQUET**. Je vous suis reconnaissant de m'avoir accueilli au sein de votre unité pour effectuer ma thèse. J'ai apprécié votre pertinence habituelle lors de nos échanges. Soyez assuré de ma profonde gratitude et de mon estime.

Les **membres de l'unité INSERM U1248**. Je remercie chacun d'entre vous d'avoir rendu possible ce travail tout au long de ces trois années. J'ai eu la chance de collaborer et d'évoluer au sein de cette unité. J'espère un jour pouvoir contribuer à son développement en la représentant au mieux tout au long de ma carrière.

Merci à **François-Ludovic SAUVAGE** et **Émilie PINAULT** pour votre investissement dans le projet d'albumine et pour les astuces que vous m'avez appris au cours des trois dernières années.

Merci **François** pour ta rigueur, ta culture, les blagues et les expressions que tu m'as apprises, pour tout le travail que tu m'as aidé à faire et pour les précieuses discussions que nous avons eues ensemble. Merci d'avoir été aussi disponible et prêt à m'aider. J'ai le plaisir de partager avec toi un article en tant que co-premier-auteur et un brevet. Malheureusement, l'albumine continuera à te suivre même après la fin de ma thèse. On ne peut pas y échapper, surtout avec les résultats prometteurs que nous avons eus. Finger in the nose.

Merci **Émilie** pour toutes les discussions que nous avons eues ensemble et pour tes conseils. Merci également pour la formation sur les logiciels d'analyse des spectromètres de masse et les analyses des résultats de digestion protéolytique. Je te serai toujours reconnaissant.

Merci **Florent DI MEO** pour ton soutien, tes conseils, ton encouragement, ton implication dans le projet albumine et pour nos discussions très diverses. Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la modélisation moléculaire.

Merci **Antoine HUMEAU** et **Jean-BAPTISTE-WOILLARD** pour votre implication dans ce travail et de m'avoir aidé à comprendre un peu mieux le langage R et le machine learning. Merci d'avoir été disponible à chaque fois que j'avais une question.

Merci **Jean-Sébastien BERNARD**, monsieur hygiène et sécurité, si tu n'étais pas le responsable de la santé et de la sécurité, je t'aurais choisi. Merci pour ton dynamisme et ta volonté de m'offrir ton aide à chaque fois que j'avais besoin. Merci pour ton soutien, ta gentillesse et ta bonne humeur

Merci **Hélène ARNION** pour tes conseils constructifs, pour ton aide à m'initier à la culture cellulaire et d'être disponible pour m'aider et de répondre à mes questions.

Merci **Nicolas VEDRENNE**, pour tes conseils avisés et pour m'avoir formé et aidé dans la tâche de la culture cellulaire, j'ai vraiment apprécié. C'était très enrichissant.

Merci **Anne DRUIHLE** pour ta curiosité scientifique, tes conseils constructifs lors nos discussions, pour ton soutien contre Manon et Clarisse et pour les photos prises au laboratoire.

Merci **Roland LAWSON**, pour ton soutien, ta gentillesse, ton encouragement, ton écoute, tes conseils, nos discussions, et pour l'opportunité de participer à la nuit des chercheurs européens, que j'ai beaucoup appréciée.

Merci **Benjamin CHANTEMARGUE** et **Gabin FABRE**, pour votre soutien et nos échanges nombreux, riches et variés.

Merci **Emmanuelle IZORCHE** et **Karen POOLE**, pour votre soutien, votre aide et votre écoute.

Merci **Yasser BAAJ**, **Chloé BARNY**, **Alexandre GARNIER**, **Véronique LOUSTAUD-RATTI**, **Paul CARRIER**, **Léa LE DU** et le service de biochimie et de génétique moléculaire et du service d'hépatologie et de gastro-entérologie (HGE) du CHU de Limoges pour votre collaboration et votre investissement dans ce projet.

Merci **Hassan AOUD**, je suis heureux de t'avoir rencontré au cours de cette thèse. Je te remercie pour ton aide et ton soutien au quotidien. Je garderai de bons souvenirs de nos discussions intéressantes et de nos moments merveilleux.

Merci **Veronica CRESPI**, ma modélisatrice, je suis très reconnaissant d'avoir eu l'occasion de te rencontrer au cours de ma thèse. Merci d'avoir été à mes côtés et de m'apporter un soutien sans faille. Merci pour les superbes photos d'albumine.

Merci **Manon JARDOU** et **Clarisse BROSSIER**, les expérimentalistes, je suis ravi d'avoir partagé avec vous le fameux bureau 242. Merci d'avoir toléré mon accent français pendant ces 3 années.

Merci **Manon JARDOU**, pour ton soutien, ton encouragement, ton aide, ton humour. Je te souhaite le meilleur dans ta nouvelle aventure. Tu sais que je suis toujours prêt à t'apprendre de nouveaux plats libanais.

Merci **Clarisse BROSSIER**, la présidente, pour tous les moments agréables partagés ensemble depuis votre stage de Master 2. Les photos parlent d'elles-mêmes. Je te remercie pour ton soutien, ton humour et pour toutes les expressions que tu m'as apprises et dont je ne me souviens plus.

Merci **Mohamed-Ali RAHALI**, l'albuminologue, pour ton aide dans les premiers temps de ma thèse, pour la formation au SEB test et pour la trottinette.

Merci **Eliés ZARROUK**, pour ta bonne humeur, les moments partagés ensemble et nos nombreux échanges assez intéressants.

Merci **Rudy MEVIZOU**, pour m'avoir fait découvrir tant de jeux de société, pour ton soutien, pour ta bonne humeur et les moments partagés ensemble.

Merci **Quentin FAUCHER**, pour ton soutien, nos discussions et les moments partagés ensemble.

Merci **Mehdi BENMAMERI**, **Angelika JANASZKIEWICZ**, **Ágota TÓTH** et **Marving MARTING**, pour nos discussions et les moments partagés ensemble.

À ma famille et à mes amis, au terme de ce parcours, je tiens à remercier celles et ceux qui me sont chers. Il n'est pas nécessaire de vous citer, vous vous connaissez vous-même. Je vous exprime mes pensées chaleureuses. Les moments passés avec vous en marge de cette thèse m'ont également permis de ménager quelques pauses récréatives et vivifiantes afin de m'éloigner temporairement de ce travail. Aussi, vos contributions, quelles qu'elles soient, m'ont permis de réaliser cette thèse. Je vous remercie infiniment pour votre soutien.

À mes parents, je voudrais vous exprimer ma gratitude et toute mon affection, sans vous je n'aurais pas pu atteindre mes objectifs et être la personne que je suis aujourd'hui. Je n'oublierai jamais vos conseils, vos larmes, vos sourires, votre motivation et vos prières. Mes frères, ma sœur et sa famille, merci pour votre soutien inconditionnel.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Introduction	13
Chapitre I. Contexte des travaux	16
I.1.1. Épidémiologie	16
I.2. Hépatotoxicité : généralités	17
I.2.1. Différents types d'hépatites toxiques	18
I.2.1.1. Hépatite toxique alcoolique	18
I.2.1.2. Hépatite toxique chimique	18
I.2.2. Physiopathologie : fibrose et cirrhose	19
I.2.3. Diagnostique	21
I.2.3.1. Le score Child-Pugh.....	22
I.2.3.2. Le score MELD (model for end-stage liver disease)	22
I.2.3.3. Le score ALBI (albumine-bilirubine)	24
I.2.3.4. Score de d'Amico ou EASL	24
I.2.4. Biomarqueurs potentiels des atteintes hépatique et de l'hépatotoxicité	25
I.2.4.1. Glutamate Déshydrogénase (GLDH).....	25
I.2.4.2. Kératine (K18).....	25
I.2.4.3. Sorbitol déshydrogénase (SDH).....	26
I.2.4.4. Glutathion S-transférase (GST).....	26
I.2.4.5. Acides biliaires	27
I.2.4.6. Ostéopontine (OPN).....	27
I.2.4.7. High mobility Group Box-1 (HMGB1).....	27
I.2.4.8. Fatty Acid binding protein 1 (FABP1)	28
I.2.4.9. Micro-ARN 122 (miR-122).....	28
I.3. Albumine Sérique Humain (HSA) : généralités.....	30
I.3.1. Synthèse et structure.....	30
I.3.2. Rôles et fonctions	31
I.3.2.1. Activités oncotiques	31
I.3.2.2. Activités de fixation et transport.....	32
I.3.2.3. Activités antioxydantes.....	32
I.3.2.4. Activités circulatoires.....	32
I.3.3. Propriétés de fixation de l'albumine	32
I.3.3.1. Sites de liaison des ions métalliques	33
I.3.3.1.1. Sites de fixation du cuivre (Cu)	33
I.3.3.1.2. Sites de fixation du cadmium (Cd)	33
I.3.3.1.3. Sites de fixation de l'or (Au).....	34
I.3.3.1.4. Sites de fixation de la dansylsarcosine (Ds).....	34
I.3.3.1.5. Sites de fixation de la thyroxine (L-T4).....	34
I.3.3.2. Sites de liaison des acides gras (AG).....	35
I.3.4. Modifications post-traductionnelles de l'albumine (PTM)	36
I.3.4.1. Oxydation.....	36
I.3.4.2. Glycation.....	37
I.3.4.3. Acétylation	38
I.3.4.4. Dimérisation	38
I.3.4.5. Nitration et nitrosylation.....	38
I.3.4.6. Troncation N-terminal et C-terminal	39
I.3.5. Aspects biomédicaux et thérapeutiques de l'albumine sérique humain.....	39

I.3.5.1. L'albumine et ses applications biomédicales	39
I.3.5.2. L'albumine sérique humaine comme biomarqueur de maladies	39
I.4. La protéomique	40
I.4.1. La protéomique basée sur la spectrométrie de masse.....	41
I.4.2. Techniques séparatives des protéines.....	44
I.4.3. Différentes approches protéomique	45
I.4.3.1. Approche Top-Down	45
I.4.3.2. Approche Bottom-Up.....	46
I.4.4. La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS)	47
I.4.5. La protéomique et les modifications post-traductionnelles de l'albumine	48
Chapitre II. Hypothèses et objectifs de la thèse	50
Chapitre III. Développement Analytique	51
III.1. Article 1. Modifications post-traductionnelles de l'albumine sérique humaine analyse par une approche top-down validée par une analyse bottom-up complète.....	52
III.1.1. Introduction à l'article 1	52
III.1.2. Article 1: Posttranslational-modifications of human-serum-albumin analysis by a top-down approach validated by a comprehensive bottom-up analysis	53
III.1.3. Discussion et perspectives	62
III.2. Article 2. Quantification absolue des isoformes de l'albumine sérique humaine par étalonnage interne sur la base d'une approche top-down LC-MS	64
III.2.1. Introduction à l'article 2.....	64
III.2.2. Article 2: Absolute quantification of Human Serum Albumin isoforms by internal calibration based on a top-down LC-MS approach.	65
III.2.3. Discussion et perspectives	89
Chapitre IV. Modifications post-traductionnelles d'albumine entre études in vitro et clinique	91
IV.1. Article 3. Isoformes semi-synthétiques de l'albumine humaine : Production, structure, capacités de liaison et influence sur un test de laboratoire de routine.....	92
IV.1.1. Introduction à l'article 3	92
IV.1.2. Article 3: Semi-synthetic human albumin isoforms: Production, structure, binding capacities and influence on a routine laboratory test	93
IV.1.3. Discussion et perspectives.....	105
IV.2. Article 4. Détection précoce des lésions hépatiques par le Serum Enhanced Binding test sensible aux modifications post-traductionnelles de l'albumine	108
IV.2.1. Introduction à l'article 4	108
IV.2.2. Article 4: Early detection of liver injuries by the Serum Enhanced Binding test sensitive to albumin post- translational modifications.	109
IV.2.3. Discussion et perspectives.....	133
Chapitre V. Application clinique : Quantification des modifications post-traductionnelles chez les patients atteints d'insuffisance hépatique : Implications cliniques et pronostiques.....	135
V.1.1. Application clinique	135
Discussion et perspective générale	150
Conclusion	154
Références bibliographiques	155
Annexes	168

Table des illustrations

Figure 1: Estimation de la mortalité par cancer du foie en France.	17
Figure 2: L'évolution des maladies chroniques du foie.....	19
Figure 3: Organisation modulaire tridimensionnelle des domaines HSA.	31
Figure 4: Structure tridimensionnelle de l'HSA représentant les sites de fixation de la L-thyroxine (L-T4), des acides gras (AG), des ions métalliques ainsi que certains médicaments sur l'HSA.....	35
Figure 5 : Les PTM les plus abondants affectant la structure de l'HSA	36
Figure 6: Le principe de l'ionisation des analytes par électrospray (ESI).....	42
Figure 7: Schéma représentatif d'un spectromètre de masse en tandem quadripôle-temps de vol (Q-TOF).	43
Figure 8: Schéma représentatif de la chromatographie liquide en phase inverse	45
Figure 9: Schéma représentant deux approches protéomiques différentes : Top-down et Bottom-up.....	46
Figure 10: Concentration moyenne d'albumine native (g/L) en fonction du stade de fibrose. (A) Groupe F2 et F3 séparé, (B) Groupe F2/F3 mélangé.	140
Figure 11: Concentration moyenne des isoformes d'albumine quantifiées (g/L) en fonction du stade de fibrose.....	141
Figure 12: Aperçu du comportement discriminatoire des isoformes HSA.....	144
Figure 13: Analyse en composantes principales (ACP).	145
Figure 14: Tableau de contingence pour évaluer le pouvoir discriminatif des isoformes d'albumine.	146
Figure 15: Plan potentiel pour la prise en charge d'un patient atteints de lésions hépatiques	154

Table des tableaux

Tableau 1: Score de Child Pugh Turcotte pour la gravité de la cirrhose.....	22
Tableau 2: Biomarqueurs sériques et histologiques de la DILI (80).	29
Tableau 3: Comparaison générale des analyseurs de masse ESI et de leurs propriétés (183,184).....	43
Tableau 4: Méthode de diagnostic.	138
Tableau 5: Caractéristiques de la population.....	139

Table des abréviations

ACP : Analyse en composante principale	IRN : Rapport international normalisé
AFEF : Association Française pour l'Étude du Foie	IT : Pièges ioniques quadripolaires
AG : Acide gras	K18 : Kératine 18
ALAT : Alanine aminotransférase	LDH : Lactate déshydrogénase
ALBI : Albumine-bilirubine	LIT : Piège à ions linéaire
ALBoM : ALBumin mOdifications as early bioMarkers of chronic liver diseases	LPS : Lipopolysaccharide
ALF : Insuffisance hépatique aiguë	m/z : Masse/charge
APCI: Ionisation chimique à pression atmosphérique	MALDI : Matrix assisted laser désorption ionisation
ASAT : Aspartate aminotransférase	MBS : Site de liaison multimétallique
BILID : Bilirubine directe ou conjuguée	MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1
BILIT : Bilirubine totale	MELD : Modèle d'évaluation des maladies hépatiques en phase terminale.
BU : Bottom-up	miR-122 : Micro-ARN 122
CCl4 : Tétrachlorure de carbone	MS : Spectrométrie de masse
CE : Électrophorèse capillaire	NASH : Stéato-hépatite non alcoolique
CLD : Maladies chroniques du foie	NO : Monoxyde d'azote
CRP : Protéine C réactive	NTS : Site de liaison N-terminal
Cys-34 : Cystéine-34	OPN : Ostéopontine
DC : Courant continu	PAL : Phosphatase alcaline
DDA : Data-dependent-acquisition	PTM : Modification post-traductionnelle
DIA : Data-independent-acquisition	Q : Quadripôle
DILI : Lésions hépatiques induites par les médicaments	RF : Courant alternatif
ESI : Ionisation par électronébulisation	RNS : Espèces réactives de l'azote
FAB : Ionisation par bombardement atomique rapide	ROC : Receiver Operating Characteristic
FABP : Les protéines de liaison aux acides gras	ROS : Espèces réactives de l'oxygène
FT-ICR : Résonance cyclotronique ionique par transformation de Fourier	RPLC: Chromatographie liquide à phase inverse
GLDH : Glutamate Déshydrogénase	SDH : Sorbitol déshydrogénase
GST : Glutathion S-transférase	SEB Test : Serum Enhanced Binding Test
HGE : Hépatogastroentérologie	SEC : Chromatographie d'exclusion de taille
HILIC : Chromatographie d'interaction hydrophile	SO2H : Acide sulfinique
HMA : Mercaptalbumine humaine	SO3H : Acide sulfonique
HMGB1 : High mobility Group Box-1	SOH : Acide sulfénique
HNA1 : Non-mercaptalbumine-1	SWATH : Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment ions
HNA2 : Non-mercaptalbumine-2	TD: Top-down
HSA : Albumine sérique humaine	TGFβ : Transforming growth factor
ICP-MS : Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif	TIPS : Shunts porto-systémique intrahépatique transjugulaire
IDA : Mode d'acquisition dépendante de l'information	TLR4 : Récepteur Toll-like 4
IMA : Albumine modifiée par l'ischémie	TOF : Temps de vol
InVs : Institut national de veille sanitaire	TP : Temps de prothrombine
	TRP : Tryptophane
	TYR : Tyrosine
	Tyr-3-NO2 : 3-nitrotyrosine
	γGT : Gamma-glutamyl-transférases

Introduction

L'évolution de la maladie hépatique chronique (CLD), quelle qu'en soit l'étiologie, est généralement exempte de symptômes jusqu'à ce qu'elle atteigne le stade de la fibrose ou de la cirrhose avec une décompensation clinique et, dans certains cas, un carcinome hépatocellulaire (1,2). La prévention et l'utilisation de stratégies de diagnostic précoce sont cruciales pour empêcher les lésions hépatiques d'évoluer vers une maladie hépatique terminale et donc de réduire ainsi la mortalité due à ces maladies prévalentes. Il est désormais essentiel d'identifier et de stratifier le plus tôt possible les patients pour que nous puissions améliorer de manière significative les soins qui leur sont prodigués ainsi que leur qualité de vie en général, surtout pour les receveurs d'une greffe de foie.

Pour prédire et anticiper le risque d'évolution d'une lésion hépatique, notamment le degré de sévérité de la fibrose et/ou de la cirrhose, l'histologie reste à ce jour le gold standard. Cependant, ce type de test est sujet à des complications liées à l'échantillonnage. Il existe d'autres types de tests, appelés parfois « tests non-invasifs », tels que les marqueurs sérologiques directs. Toutefois, ceux-ci manquent également de sensibilité et de spécificité. Afin d'améliorer le diagnostic et de pouvoir attribuer un stade à l'affection hépatique, ils sont désormais combinés dans des "panels de tests" et parfois assistés par des algorithmes tels que le fibromètre®, le fibrotest®, le fibrospect®. Cependant, il a récemment été avancé que ces scores *"présentent une précision limitée au niveau individuel, ne prédisent pas la progression de la maladie, ne reflètent pas la réponse au traitement et ne donnent pas d'indications sur les mécanismes des lésions"* (3). D'autres biomarqueurs protéiques, tels que les microARN et les collagènes impliqués dans le processus de fibrose, ont également été étudiés. Bien que certains soient prometteurs, aucun n'a fait ses preuves sur le plan clinique à ce jour, qu'il s'agisse du suivi à moyen ou au long terme de la maladie hépatique chronique (CLD). Par conséquent, la nécessité de disposer de biomarqueurs non invasifs, sensibles et spécifiques pour la détection précoce des dysfonctionnements hépatiques conduisant à des maladies hépatiques chroniques demeure cruciale et toujours attendue.

Dans ce travail nous essayons de démontrer à travers plusieurs approches expérimentales et empiriques que l'exploitation des modifications post-traductionnelles de l'albumine peut répondre à ce besoin et apporter une solution viable et implantable en clinique pour le diagnostic et le pronostic des atteintes hépatiques. L'albumine sérique humaine (HSA), une macromolécule monomérique à domaines multiples synthétisée exclusivement dans le foie, est un biomarqueur bien connu de l'insuffisance hépatique (4). C'est la protéine la plus abondante dans le sérum sanguin, représentant plus de la moitié de la teneur totale en protéines. Autre que sa propriété oncotique, l'HSA exerce plusieurs fonctions physiologiques telles que la fixation, le transport et la détoxification de molécules endogènes et exogènes. L'HSA est également le principal antioxydant circulant et elle module les réponses immunitaires et inflammatoires. Malgré ses caractéristiques hautement conservées chez l'homme, l'HSA est soumise à de nombreuses modifications structurales et chimiques, connues sous le nom de modifications post-traductionnelles (PTM). Ces PTM conduisent à des isoformes, dont celles basées sur l'état redox de la Cys-34 ont été les plus étudiées (5).

Récemment, une étude a exploité et démontré le potentiel de l'utilisation des modifications structurales de l'HSA comme indicateur fiable et précoce de l'ischémie cardiaque. Le test est basé sur l'idée que la structure de l'HSA change sous l'effet du stress



ischémique, ce qui entraîne une troncation à l'extrémité N-terminale (Asp1-Ala2), considérée comme un site de liaison pour le cobalt (Co). Le test diagnostique consiste à ajouter une quantité connue de Co au plasma du patient, puis à estimer le niveau de Co restant libre, non lié à l'albumine. Un taux élevé de Co libre indique que le HSA a été modifié et qu'il est incapable de le fixer (6). D'autre part, il a été démontré que les PTM de HSA pouvaient être utilisées comme biomarqueurs pour les maladies hépatiques avancées (1,2,7–13). Des études récentes ont démontré que dans les stades terminaux des lésions hépatiques, on observe des réductions notables des taux de mercaptalbumine humaine (HMA) ainsi que des augmentations simultanées des formes oxydés HNA1 et HNA2 (8,12). En outre, il a été montré que la détermination de l'abondance de l'albumine native pourrait mieux prédire la survie des patients cirrhotiques que la mesure de la concentration totale d'albumine sérique (14) et que sa détermination offre une valeur ajoutée pronostique considérable, en particulier chez les patients à risque.

Sur ses bases, l'hypothèse principale sur laquelle se basent les projets portant sur les PTM de l'albumine est que toutes les modifications majeures de l'HSA se produisent dans les premiers stades des lésions cellulaires du foie, ce qui permettrait de diagnostiquer précocement les atteintes hépatiques dans un premier temps et de prédire les futures maladies du foie dans un second temps. Ces modifications peuvent être révélées par la caractérisation des isoformes de l'HSA dans le sérum du patient ou, plus simplement encore, par les capacités de liaison de l'HSA à différents ligands possédant des sites de liaison spécifiques.

Toutefois, les résultats préliminaires obtenus dans le cadre des travaux de l'équipe suggèrent que les informations apportées par les PTM de l'HSA sont bien plus riches et peuvent apporter des réponses à plusieurs niveaux. Le premier type d'information, ayant fait l'objet d'une demande de brevet par notre équipe en 2019 pour le SEB test (Serum Enhanced Binding), est apparu après l'exploitation de la baisse des capacités de fixation de ligands spécifiques par l'HSA suite à des modifications. Par ailleurs, le fait qu'il puisse exister un profil typique d'isoformes pouvant constituer une "signature" en fonction de la nature de l'atteinte hépatocytaire fait partie de ces informations et est en cours d'investigation. Enfin, les résultats obtenus par des travaux antérieurs dans notre unité sur des modèles animaux soutiennent fortement notre hypothèse principale.

Pour une compréhension plus approfondie des résultats obtenus précédemment et pour s'interroger sur la pertinence de notre hypothèse principale, nous avons divisé nos travaux en 3 axes :

Le premier axe "développement analytique" consistait à développer des approches protéomiques pour évaluer de manière critique la spécificité de la caractérisation des isoformes d'HSA et la fiabilité de leur détermination.

Le deuxième axe "in vitro" a été conçu pour avoir accès à des isoformes d'HSA purifiées afin de les caractériser de manière exhaustive et d'étudier leur impact séparément sur la structure et l'activité de l'HSA.

Le troisième axe "étude clinique" visait à démontrer qu'un dysfonctionnement hépatique avancé, incluant la fibrose et la cirrhose, pouvait être révélé à un stade précoce par la quantification des isoformes de l'HSA. Il s'agissait également de valider l'utilisation des isoformes comme outils de discrimination entre sujets sains et sujets atteints, à l'aide d'un système expert basé sur des algorithmes capables d'identifier, de classer et de prédire un dysfonctionnement hépatique chez un patient.

Dans cette thèse, nous explorons en profondeur les modifications de l'albumine en tant que biomarqueurs précoces de la maladie hépatique chronique. Notre objectif est de démontrer que les lésions hépatiques avancées pourraient être révélées à un état précoce par la caractérisation des modifications chimiques et structurelles de HSA.

Dans ce manuscrit, le chapitre 1 sert de base à notre travail de recherche. Nous commencerons par détailler le contexte général de notre sujet et établirons le cadre théorique qui guidera notre analyse. La prévalence des maladies chroniques du foie, leurs différentes catégories, leurs facteurs sous-jacents, leurs mécanismes pathophysiologiques, ainsi que leurs approches diagnostiques associées seront abordés en premier. Les nouveaux biomarqueurs prometteurs des atteintes hépatiques et de l'hépatotoxicité seront revus avant de présenter de notre molécule d'intérêt, l'albumine. Dans cette introduction, elle fera l'objet d'études approfondies portant sur ses modifications post-traductionnelles et ses activités non oncologiques, notamment son effet antioxydant et sa capacité de liaison. Enfin, dans la section 4, nous décrirons les différentes approches employées, y compris la protéomique, ainsi que les résultats des études obtenus qui soutiennent notre hypothèse principale.

Le chapitre 2 présente les objectifs principaux de cette thèse ainsi que les différents axes abordés pour rassembler les informations nécessaires à notre étude.

Dans le chapitre 3, l'axe de développement analytique sera abordé suivi par une première section consacrée à l'élaboration de deux approches protéomiques complémentaires pour une caractérisation exhaustive des isoformes de HSA résultant de PTM dans un contexte de recherche. Ensuite, dans la deuxième section de ce chapitre, nous nous penchons sur le développement d'une méthode de quantification des isoformes de HSA adaptée à une application clinique. Après le développement de nos approches protéomique, le chapitre 4 vise à caractériser de manière exhaustive les PTM et à tester leur impact sur l'activité fonctionnelle de l'albumine.

La première section du chapitre 4 aborde la production des isoformes semi-synthétiques d'albumine afin de mieux comprendre leurs origines, leur pathogénicité potentielle et leur évaluation ultérieure en tant que biomarqueurs. Pour approfondir l'étude de l'impact fonctionnel des PTM sur l'albumine, nous présentons dans la deuxième section de ce chapitre une étude combinant des investigations cliniques, des expériences sur des modèles animaux et une étude de modélisation moléculaire.

Enfin, pour évaluer nos outils de diagnostic précoce des lésions hépatiques, notamment les profils des isoformes d'albumine, nous présentons dans le chapitre 5 une étude clinique dans laquelle les isoformes d'albumine ont été quantifiées par la méthode de quantification absolue développée dans la section 2 du chapitre 3.

Nous concluons ce manuscrit par une discussion générale citant certaines limites de nos études pour chaque chapitre, suivie de perspectives générales pour chaque axe de développement.

Il est essentiel de bien comprendre les différentes notions associées aux lésions hépatiques, étant donné que le foie est un organe vital qui remplit de multiples fonctions cruciales dans l'organisme. Les lésions hépatiques résultent de divers facteurs, et les symptômes et approches thérapeutiques varient en fonction du type et de la gravité de la maladie. Cette compréhension est d'une importance vitale pour le maintien de la santé globale d'un individu.

I.1.1. Épidémiologie

Tout en tenant compte des différences d'approches méthodologiques, les différents résultats épidémiologiques vont tous dans le sens d'une augmentation préoccupante de la prévalence et de l'incidence des atteintes hépatiques, tant dans la période récente que dans les projections pour les décennies à venir.

Selon le bilan de l'agence de la biomédecine en France, une augmentation de 4 % de l'activité de greffage en générale a été enregistrée en 2022 par rapport à 2021. Une augmentation inquiétante alors que le monde est confronté à une pénurie croissante d'organes, notamment ceux qualifiés d'organes de haute qualité. Actuellement, le défi est d'éviter la transplantation hépatique chez la majorité de patients possible et de réduire l'incidence de rejet du greffon chez les receveurs de greffe.

En ce qui concerne les maladies chroniques du foie (CLD), la France compte entre 1500 et 2500 cas de cirrhose par million d'habitants selon l'Association Française pour l'Étude du Foie (AFEF), avec 150 à 200 cas par million d'habitants détecté chaque année. Une étude récente sur la toxicité hépatique a révélé sur une période de trois ans chez une population française (15) une incidence de 14 cas par an pour 100 000 habitants, avec un taux d'hospitalisation de 12 % et un taux de mortalité de 6 %. La cirrhose, accompagnée de ses complications, est la cinquième cause de mortalité en France (Figure 1), avec 10 000 à 15 000 décès par an. Selon l'InVs (Institut national de veille sanitaire), en 2017, environ 200 000 personnes ont été diagnostiquées avec une cirrhose, et parmi elles, 30% étaient à un stade avancé. Plus récemment, des données épidémiologiques issues de tests non invasifs ont permis d'éclaircir un peu plus la situation. Elles indiquent qu'environ 5 % des individus de la population générale présentent une fibrose avancée lorsqu'ils sont évalués par élastographie hépatique au moyen du FibroScan (16–18). Ce chiffre tombe à 2,8 % lorsque le FibroTest est utilisé pour le dépistage (19). Ces statistiques sont importantes car elles permettent de prédire les événements de santé liée aux maladies du foie et, à plus grande échelle, la mortalité globale (20). La prise en charge de cette pathologie nécessite environ 55 000 hospitalisations par an, représentant jusqu'à 15 % de la charge de travail des services médicaux spécialisés (21).

Cancer du foie Epidémiologie (France - 2019)

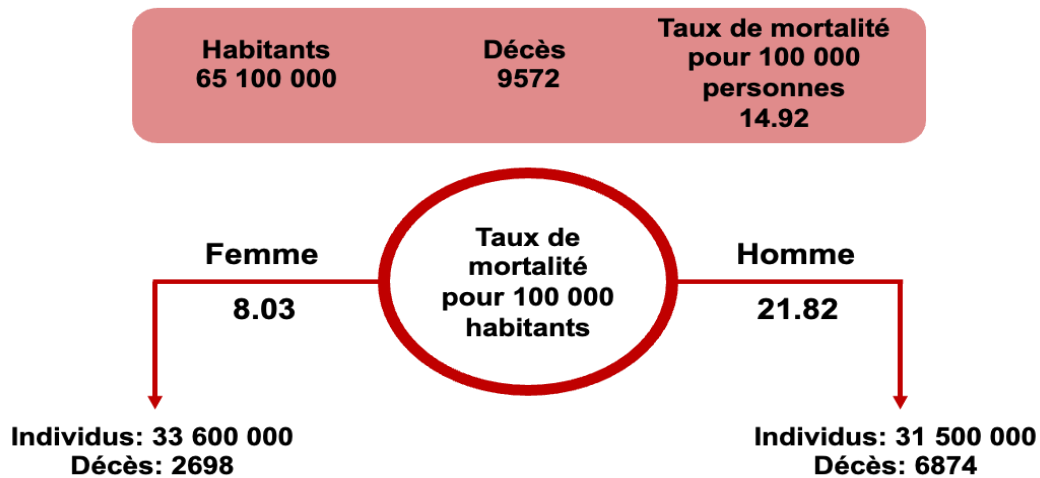


Figure 1: Estimation de la mortalité par cancer du foie en France.

Estimations de la santé mondiale 2020 : Décès par cause, âge, sexe, par pays et par région, 2000-2019. Genève, Organisation mondiale de la santé ; 2020.

I.2. Hépatotoxicité : généralités

L'hépatotoxicité fait référence à la capacité de certaines substances ou agents exogènes, médicamenteuse ou non à causer des dommages au foie, entraînant une altération de la fonction hépatique. La fréquence des hépatites toxiques est probablement élevée due aux effets indésirables médicamenteux qui peut toucher le foie.

L'hépatite toxique aiguë constitue la principale cause de transplantation hépatique aux Etats-Unis (22). Les seules informations disponibles concernent principalement les cas symptomatiques, généralement sévères. La gravité de l'hépatite toxique aiguë dépend principalement du degré d'insuffisance hépatique, culminant avec l'hépatite fulminante.

Les principales substances responsables de cette toxicité sont des médicaments (comme le paracétamol, les antibiotiques et les antiépileptiques) et des substances non médicamenteuses comme les champignons (notamment l'amanite phalloïde). Plus rarement, des produits de phytothérapie, des substances illicites et des produits chimiques industriels peuvent également être impliqués. Les mécanismes des lésions hépatiques varient considérablement en fonction de la substance toxique et l'hépatotoxicité peut être prévisible (dose-dépendante) ou imprévisible (dose-indépendante).

Le diagnostic d'hépatite toxique aiguë repose principalement sur un processus d'élimination. Aucun test biologique, y compris la biopsie du foie, n'est suffisamment spécifique pour confirmer une atteinte hépatique d'origine toxique. Avant de conclure que la cause de l'intoxication est toxique, il est essentiel d'exclure d'autres causes plus courantes.

Par conséquent, lorsqu'une hépatite aiguë est suspectée, une approche méthodique doit être suivie. Tout d'abord, il est important d'évaluer la sévérité de l'insuffisance hépatique, de prévenir son aggravation en instaurant un traitement approprié si nécessaire, d'examiner son impact sur les principaux organes, de déterminer la cause sous-jacente et d'évaluer la

nécessité de transférer éventuellement le patient vers un centre spécialisé pour une éventuelle prise en charge du remplacement hépatique ou une transplantation (23).

I.2.1. Différents types d'hépatites toxiques

I.2.1.1. Hépatite toxique alcoolique

L'hépatotoxicité alcoolique désigne les effets néfastes d'une consommation excessive d'alcool sur le foie. Cette affection progresse par étapes, en commençant par l'accumulation de graisse dans les cellules du foie, ce qui entraîne une stéatose hépatique, suivie du développement potentiel d'une hépatite alcoolique aiguë caractérisée par une inflammation et des lésions des cellules du foie et, à long terme, du risque de cirrhose où le tissu hépatique sain est remplacé par du tissu cicatriciel (Figure 2). L'hépatotoxicité alcoolique se présente typiquement comme un état fébrile subaigu accompagné d'un ictère et d'une hypertrophie du foie. Dans ce cas, les transaminases dépassent rarement 300 UI/L, avec un rapport AST/ALT supérieur à deux, mais l'hyperbilirubinémie peut être notablement prononcée, atteignant des taux de 300 à 500 μ M. Il s'y ajoute souvent une hyperleucocytose (jusqu'à 50 g/L), un allongement du temps de prothrombine (TP) et une hypoalbuminémie (24).

Le mécanisme implique que le métabolisme de l'alcool génère des sous-produits nocifs, une inflammation et un stress oxydatif. Les lésions hépatiques résultent des effets toxiques de l'acétaldéhyde, ainsi que de la libération locale de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6 et IL-8) et de la génération de radicaux libres, entraînant une perturbation de la fonction mitochondriale (25). Le diagnostic définitif implique généralement une biopsie du foie, révélant une nécrose acidophile et ballonante des hépatocytes dans la région centrale du foie. Les hépatocytes présentent des mitochondries géantes et des corps hyalins de Mallory. En général, l'hépatite alcoolique a tendance à s'aggraver au cours des premières semaines d'hospitalisation. Le taux de mortalité peut atteindre 40 %. Le processus de guérison est lent et peut durer jusqu'à six mois, même en cas d'arrêt complet de la consommation d'alcool.

I.2.1.2. Hépatite toxique chimique

L'hépatite toxique chimique fait référence à une inflammation du foie causée par l'exposition à des substances chimiques toxiques. Ces substances, souvent des produits chimiques industriels, des médicaments (paracétamol ou antibiotique), ou des solvants comme les hydrocarbures halogénés (chloroforme, le trichloréthylène et le perchloréthylène) contribuent à endommager le foie. Le tétrachlorure de carbone (CCl_4) en est un exemple frappant. Dans le passé, les industries utilisaient le CCl_4 comme agent de dégraissage, et l'agriculture l'employait comme insecticide pour traiter les grains par fumigation. Cette molécule se transforme en métabolites hautement nocifs qui génèrent des radicaux libres et d'adduits. Ces sous-produits toxiques qui provoquent des lésions des cellules du foie, entraînant la mort cellulaire, ainsi que d'autres conséquences comme l'initiation des réactions qui affectent l'intégrité des membranes cellulaires.

Le CCl_4 , par son mécanisme de toxicité indirecte, déclenche une nécrose hépatocytaire accompagnée d'un ictère et d'une nécrose tubulaire rénale. Ce phénomène est généralement précédé de symptômes neurologiques transitoires tels que vertiges, troubles visuels et confusion, ainsi que de problèmes digestifs tels que douleurs abdominales, vomissements et diarrhée. Les expositions chroniques aux solvants sont responsables du développement de cirrhoses. Après une première phase de troubles digestifs, elle conduit à

une hépatite stéatosique accompagnée d'une nécrose tubulaire rénale et d'une psychose toxique. Une exposition prolongée à ces agents peuvent conduire à l'évolution vers la cirrhose (24).

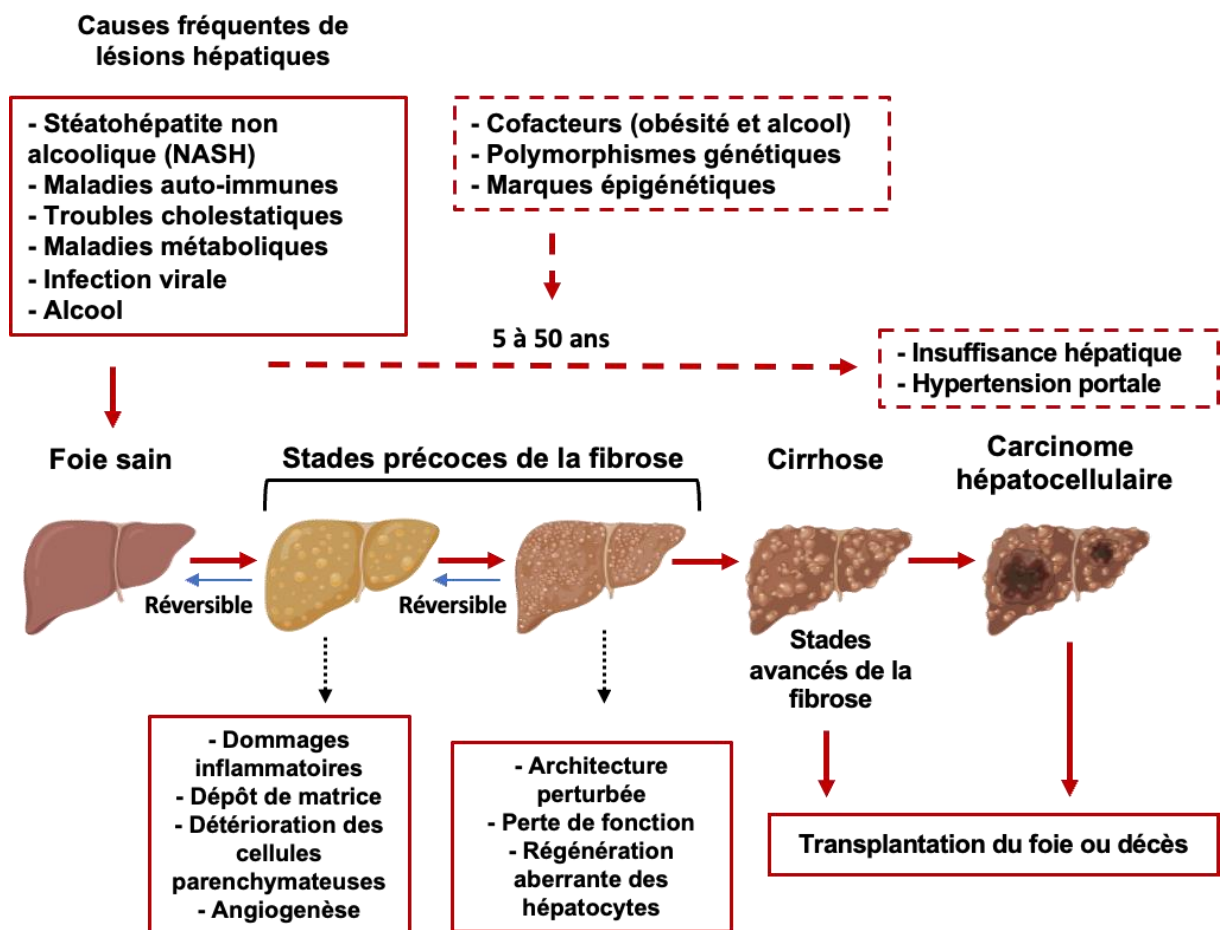


Figure 2: L'évolution des maladies chroniques du foie.

La fibrose hépatique, en réponse à diverses causes telles que l'infection virale, l'alcool et la NASH, se forme lors de lésions chroniques du foie. Indépendamment de la cause initiale, des lésions répétées entraînent des dommages et d'inflammation, conduisant à une fibrose progressive. Une fois que la cirrhose s'installe, la réversibilité des lésions devient difficile, et des complications surviennent. Si l'on élimine la cause de la fibrose, une guérison partiellement complète est possible aux premiers stades. La transplantation hépatique reste le seul traitement en cas d'insuffisance ou de cancer du foie.

1.2.2. Physiopathologie : fibrose et cirrhose

En raison de ses fonctions essentielles, le foie occupe une place cruciale dans l'organisme. Il accomplit des tâches telles que le métabolisme des glucides par le biais de processus tels que la gluconéogenèse et la glycogénolyse. En outre, il est responsable de la synthèse de diverses protéines telles que l'albumine, les lipoprotéines, les facteurs de coagulation et les globines. En outre, il joue un rôle dans la production de lipides tels que les apolipoprotéines A, B, C, E, le cholestérol et les acides biliaires. Le foie est également impliqué dans le traitement des xénobiotiques, qui sont des substances étrangères qui pénètrent dans l'organisme.

Dans un foie sain, la matrice extracellulaire est limitée à certaines zones, comme la capsule et les espaces portaux entourant les gros vaisseaux sanguins. La matrice extracellulaire est constituée de différents types de cellules, dont les hépatocytes (cellules épithéliales), les cellules endothéliales, les cellules immunitaires (comme les cellules dendritiques, les mastocytes et les lymphocytes NK), les cellules de Kupffer (qui sont des macrophages spécialisés) et les cellules stellaires du foie (26).

La base de la physiopathologie de la fibrose est l'accumulation excessive de substances de la matrice extracellulaire menant à des lésions ou inflammations du foie et des voies biliaires. De multiples facteurs contribuent aux lésions des cellules hépatiques : une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (O_2^{--} , OH_2^- , H_2O_2), associée à une carence en antioxydants (glutathion) et/ou à un dysfonctionnement des enzymes protectrices (glutathion peroxydase, superoxyde dismutase). Les ROS réagissent, entre autres, avec les acides gras insaturés des phospholipides (peroxydation lipidique), ce qui entraîne des lésions des membranes et des organites (lysosomes, réticulum endoplasmique). Cela déclenche une élévation de la concentration de calcium intracellulaire, activant les protéases et d'autres enzymes, ce qui finit par provoquer des dommages cellulaires irréversibles (27).

La fibrose hépatique résulte d'un déséquilibre entre la fibrogenèse et la fibrolyse (28), en faveur de la fibrogenèse, et se déroule en plusieurs étapes (Figure 2). Lors de la mort des hépatocytes lésés, les enzymes lysosomales libérées déversent des cytokines de la matrice extracellulaire. Ces cytokines et les débris cellulaires des cellules décédées stimulent les cellules de Kupffer dans les sinusoides hépatiques et attirent les cellules inflammatoires. Les cellules de Kupffer et les cellules inflammatoires recrutées sécrètent des cytokines (TGF β , MCP-1) qui transforment les cellules stellaires hépatiques en myofibroblastes (29), convertissent les monocytes circulants en macrophages activés et déclenchent la prolifération des fibroblastes. Il en résulte une augmentation de la synthèse de la matrice extracellulaire par les myofibroblastes et les fibroblastes, ce qui entraîne un dépôt accru de collagènes (type I, III, IV), de protéoglycanes et de glycoprotéines dans l'espace de Disse déclenchant une inflammation. Comme compensation des hépatocytes détruites, une régénération des hépatocytes restants aura lieu. En raison de la fibrose, cette régénération ne conduit plus à la reconstitution de lobules normaux mais à la formation d'amas d'hépatocytes ayant perdu leurs connexions vasculaires et biliaires, appelés nodules de régénération (30).

La cirrhose est une distorsion de l'architecture typique du foie due à la présence de tissu cicatriciel et de nodules irréguliers de cellules hépatiques (Figure 2). Ces anomalies structurelles sont liées à des zones d'inflammation, à des blocages dans la circulation du sang et de la bile, et constituent des points focaux pour le développement d'une cirrhose. L'évolution de la cirrhose peut se faire silencieusement sur de nombreuses années à travers des stades intermédiaires, en fonction de l'étendue de l'inflammation chronique du foie et de la fibrose. Ces irrégularités de forme et de structure tendent à progresser, provoquant finalement la perte de tissu hépatique et des perturbations des fonctions hépatiques cruciales qui l'accompagnent. Les phases finales englobent l'insuffisance hépatique et l'émergence de tumeurs primaires, le carcinome hépatocellulaire étant le plus répandu (3). Des facteurs tels que l'obésité, le diabète et la stéatohépatite sont reconnus comme contribuant au CHC (31).

I.2.3. Diagnostique

La cirrhose marque la phase avancée des affections chroniques du foie, qui peuvent avoir diverses origines, notamment des causes virales (le plus souvent les infections par les hépatites A, B et C), des facteurs liés à l'alcool, des médicaments, des déséquilibres métaboliques ou l'exposition à des toxines. La maladie se développe généralement lentement et reste souvent sans symptôme pendant une longue période. Le taux de progression de la maladie et l'apparition de complications sont donc difficiles à prévoir. Le diagnostic de cirrhose est souvent posé lorsque des complications telles que le carcinome hépatocellulaire (CHC) ou des hémorragies gastro-intestinales deviennent évidentes.

Cliniquement, la détection précoce s'avère difficile et repose sur des indicateurs cliniques suggestifs tels qu'une texture ferme du foie, des angiomes arachnéens, une splénomégalie, la présence d'ascite ou d'ictère, ainsi que des anomalies visibles à l'imagerie (forme irrégulière du foie, dysmorphie hépatique et signes d'hypertension portale).

Les marqueurs biologiques utilisés pour le dépistage et le suivi de la cirrhose sont centrés sur l'évaluation des fonctions vitales principalement assurées par le foie. Ces fonctions comprennent la synthèse des facteurs de coagulation (Temps de prothrombine (TP) et rapport international normalisé (IRN) et de l'albumine. Parfois, les fonctions métaboliques du foie, telles que la dégradation et l'élimination de substances comme l'immunoglobuline polyclonale A, la bilirubine et l'ammoniaque, sont évaluées indirectement par des tests sanguins et des évaluations cliniques. Les lésions des cellules hépatocytaires sont indiquées par des taux élevés de LDH déduit d'un test au lactate déshydrogénase (LDH). La mort des hépatocytes est évaluée par la libération de transaminases (ASAT, ALAT) dans la circulation sanguine, tandis que la cholestase est indiquée par des niveaux élevés de phosphatases alcalines (PAL) et de gamma-glutamyl-transférases (γ -GT). Pour évaluer l'inflammation, les cliniciens s'appuient sur les valeurs élevées de la protéine C-réactive (CRP) que l'on trouve normalement pendant une inflammation et lésion de foie.

Dans les situations où un diagnostic définitif est incertain, une biopsie du foie reste une méthode clé pour confirmer la cirrhose et évaluer la gravité de la fibrose et de l'inflammation. Cependant, cette procédure comporte des risques de complications, les hémorragies étant les plus graves. C'est pourquoi, depuis peu, le dépistage repose principalement sur des tests de fibrose non invasifs. Ces tests comprennent la mesure de la rigidité du foie par ultrason (FibroScan®) et l'utilisation de tests biochimiques tels que le FibroTest, le FibroMeter et le HepaScore, qui analysent plusieurs marqueurs sanguins et fournissent des résultats sous forme de scores. Si ces tests non invasifs ont été initialement développés pour évaluer la fibrose dans l'infection chronique par le VHC, ils ont également été validés pour d'autres situations telles que l'infection par le VHB, la maladie alcoolique du foie ou la NASH.

En raison de la limite individuelle des tests non invasifs qui empêchent une amélioration dans la prise en charge thérapeutique des patients, une approche commune consiste à utiliser une combinaison des tests pour générer un score.

L'évaluation de la gravité et l'estimation de l'avenir de la cirrhose nécessite l'existence de systèmes de score fiables, qui jouent un rôle important dans la prise en charge globale de cette maladie. Ainsi, plusieurs scores sont utilisés régulièrement pour le diagnostic et le suivi des patients hépatiques.

I.2.3.1. Le score Child-Pugh

L'objectif des scores de gravité de la cirrhose est d'aider les cliniciens dans la gestion quotidienne des patients et d'orienter les soins de manière optimale. Ces scores permettent d'estimer le pronostic et sont précieux pour le suivi. Ils ont joué un rôle crucial dans la prise de décision thérapeutique, notamment dans l'allocation des organes dans un premier temps avant de devenir des outils diagnostiques et de classement largement utilisés. En 1974, le premier score a été développé par CHILD et TURCOTTE, puis adapté par PUGH, dans le but initial de prédire la mortalité des patients cirrhotiques en postopératoire d'une dérivation chirurgicale ou d'une intervention chirurgicale majeure (32,33). Actuellement, seuls les scores CHILD et PUGH sont cités dans le cadre de la surveillance de la fonction hépatique (34). Le score est basé sur 5 critères clinico-biologiques : Bilirubine totale, albumine, ascite, encéphalopathie hépatique et le statut nutritionnel. Le dernier critère est ensuite remplacé par le temps de prothrombine (TP) pour créer le score actuellement utilisé.

Les patients sont classés en 3 catégories selon le Tableau.1 :

- Les scores $5 < \text{Child-Pugh A} < 6$, indique une fonction hépatique préservée
- Les scores $7 < \text{Child-Pugh A} < 9$, indique une fonction hépatique modérément altérée
- Les scores $10 < \text{Child-Pugh A} < 15$, indique un dysfonctionnement hépatique avancé.

L'avantage de ce score réside dans sa simplicité et son rapport coût-efficacité. Il présente une sensibilité et une spécificité de l'ordre de 80 %. Il permet de prédire efficacement la mortalité des patients cirrhotiques à un an (34).

Tableau 1: Score de Child Pugh Turcotte pour la gravité de la cirrhose.

Le score de CTP utilise 2 paramètres cliniques (encéphalopathie et ascite) et 3 paramètres biologiques (bilirubine, albumine et temps de prothrombine). Les patients sont classés en classe A, B et C en fonction de leurs points totaux

	TP	Albumine (g/L)	Bilirubine ($\mu\text{mol/l}$)	Ascite	Encéphalopathie hépatique
1 point	> 50%	> 35	< 35	Absente	Absente
2 points	40-50%	28-35	35-50	Légère à modérée	Modérée
3 points	< 40%	< 28	>50	Sévère	Tendue ou réfractaire aux diurétiques

Cependant, le score a des limites dans son application. Lors de l'évaluation du pronostic du patient, les comorbidités, l'âge et les facteurs de risque ne sont pas pris en compte. Les critères d'évaluation de l'ascite et de l'encéphalopathie hépatique sont subjectifs, ce qui entraîne des biais de classification chez les praticiens. Ils peuvent être influencés par certains traitements, comme les diurétiques pour l'ascite ou la lactulose pour l'encéphalopathie hépatique. Seules quelques complications de la cirrhose sont prises en compte. De plus, les variations continues des valeurs biologiques ne sont pas prises en compte : par exemple, une bilirubine totale de $57 \mu\text{mol/L}$ a le même poids que $530 \mu\text{mol/L}$.

I.2.3.2. Le score MELD (model for end-stage liver disease)

Le système de notation Model for End-Stage Liver Disease (MELD) a été formulé par MALINCHOC et al. à la Mayo Clinic au début des années 2000, principalement pour prédire

la survie à 3 mois après la pose d'un shunts porto-systémiques intrahépatiques transjugulaires (TIPS) (35). Validé par la suite pour une application pronostique plus large, il démontre une association solide avec la mortalité à 3 mois (36). Le score MELD repose sur des paramètres biologiques de routine objectivement mesurables, à savoir la bilirubine, le rapport international normalisé (IRN) et la créatinine. Malgré la simplicité des variables d'entrée, son calcul quantitatif implique une formule complexe (équation.1). Pour les patients dépendants de la dialyse, une valeur standardisée de créatinine de 352 µmol/l est prise en compte. Le score MELD s'étend de 6 à 40, les scores les plus élevés indiquant un risque accru de mortalité à court terme (36).

Équation 1: Score MELD (model for end-stage liver disease)

$$\left[\begin{array}{l} \text{Meld} = 3,78 \times \ln(\text{bilirubine}[\text{mg/dl}]) + \\ \quad 11,2 \times \ln(\text{INR}) + \\ \quad 9,57 \times \ln(\text{créatinine}[\text{mg/dl}]) + \\ \quad \quad \quad 6,43 \end{array} \right]$$

De manière analogue au score de Child-Pugh, certaines variables du score MELD sont sujettes à l'influence des interventions médicales : le IRN est perturbé par les anticoagulants et la créatinine est affectée par les diurétiques. Le score MELD est utilisé comme référence pour l'attribution des greffes de foie. Il a récemment été remplacé par le score MELD-Na, qui intègre la concentration plasmatique en sodium, également un facteur pronostique. Les nouvelles versions, comme le MELD 3.0, visent à améliorer la distribution équitable des ressources en organes (37). En France, sous le guide de l'agence de Biomédecine, les décisions d'allocation d'organes - à l'exception des cas "super urgents" - sont basées sur le score de foie depuis mars 2007, avec le score MELD comme paramètre principal. Il est à noter que pour l'indication hépatocarcinome, on prend également des paramètres carcinologiques regroupés dans le score AFP.

Ce score a remplacé l'ancien critère « le temps d'attente sur liste » et a permis de réduire la mortalité sur la liste d'attente en donnant la priorité aux candidats dont le pronostic à court terme est le plus compromis (38). Cependant, des divergences associées au sexe dans le score MELD ont été identifiées en raison de disparités dans la masse maigre, qui se manifestent par des taux de créatinine sérique plus faibles chez les femmes. Cela se traduit par une probabilité de transplantation inférieure de 30 % et une augmentation de 20 % de la mortalité sur liste d'attente chez les femmes par rapport aux hommes (39). De nouveaux systèmes d'évaluation sont en cours de développement pour améliorer la prise en charge des patients souffrant de cirrhose et de décompensation hépatique. Ces systèmes intègrent de nouvelles idées et les dernières technologies, en utilisant des algorithmes basés sur des réseaux neuronaux profonds. Ils intègrent également des données cliniques antérieures, le score MELD 3.0 existant, des indicateurs de fragilité et des mesures du volume de la masse musculaire obtenues par tomodensitométrie (40).

Néanmoins, il convient de reconnaître que toutes les complications, indépendamment de leur impact négatif substantiel, ne sont pas incluses dans le champ d'application du score MELD - les exemples incluent les ascites réfractaires, les hémorragies gastro-intestinales récurrentes, la maladie d'Osler, le prurit récalcitrant, la cholangite sclérosante primitive, etc. La prise en compte de ces complications peut être intégrée par le biais d'une évaluation d'experts afin de faciliter un accès équitable à la transplantation.

I.2.3.3. Le score ALBI (albumine-bilirubine)

Le score ALBI (albumine-bilirubine), une mesure fondée sur l'analyse de l'albumine et de la bilirubine sériques, résulte de l'application d'une expression mathématique :

Équation 2: Score ALBI (albumine-bilirubine).

$$\text{Score ALBI} = \log 10 \text{ bilirubine } (\mu\text{mol/L}) \times 0,66 + (\text{albumine}(g/L) \times -0,085)$$

En fonction de son calcul, les patients sont classés en 3 grades (41) :

Grade 1 : scores $\leq -2,6$

Grade 2 : scores compris entre -2,6 et -1,39

Grade 3 : scores $\geq -1,39$

Il est proposé pour évaluer objectivement la fonction hépatique (42). Sa supériorité prédictive sur le score de Child Pugh semble être substantielle dans le contexte du pronostic de survie à long terme dans des scénarios spécifiques. Dans une étude rétrospective menée en Chine auprès de 221 patients atteints de carcinome hépatocellulaire et soumis à une chimio-embolisation, les patients classés ALBI-1 dans la catégorie Child-Pugh A5 ont présenté des taux de survie globale supérieurs à 1, 3 et 5 ans par rapport à leurs homologues classés ALBI-2 dans la catégorie Child-Pugh A5 (92,4 %, 55,7 % et 27,5 % contre 63,3 %, 17,3 % et 5,5 % respectivement ; Log-rank $P < 0,001$). Néanmoins, aucune variation statistiquement significative de la survie globale n'est apparue entre les cas de désignation ALBI-2 dans le milieu de Child-Pugh A5 ou Child-Pugh A6 (43). La baisse des performances peut s'expliquer par différents facteurs, notamment la limitation à deux variables seulement (albumine et bilirubine) pour évaluer la fonction hépatique, et l'omission d'autres éléments tels que la positivité de l'Ag HBs, ainsi que les niveaux d'AST et d'ALT.

I.2.3.4. Score de d'Amico ou EASL

D'Amico et al. ont formulé un système de score pronostique qui correspond aux différents stades progressifs de la cirrhose. Ce score est fondé sur la présence d'ascites, de varices (hémorragiques et non hémorragiques) et sur le risque évolutif respectif des cinq stades (44). Ce score est un outil simple pour prédire le risque de complications et de mortalité chez les patients cirrhotiques.

Le score de l'EASL établi par l'Association européenne pour l'étude du foie (EASL), fonctionne sur le même principe fondamental, mais affine les critères et inclut des facteurs supplémentaires (45). Le rôle de ce score se limite au pronostic de la maladie ; Il fournit une évaluation plus complète de la progression de la maladie en prenant en compte des éléments tels que les taux de bilirubine, les taux d'albumine et l'IRN (International Normalized Ratio), en plus de la présence d'ascites et de varices.

Les deux systèmes aident les professionnels de la santé à adapter leurs stratégies de prise en charge en fonction de la gravité de la maladie et des risques potentiels encourus.

Dans la recherche permanente d'un meilleur outil de diagnostic, la recherche sur les biomarqueurs s'est concentrée sur les molécules impliquées dans le processus des lésions hépatiques, notamment les biomarqueurs à base de protéines (BM), les microARN et les collagènes comme présenté ci-dessous.

I.2.4. Biomarqueurs potentiels des atteintes hépatique et de l'hépatotoxicité

Malgré leur utilisation croissante dans le contexte clinique, les biomarqueurs cliniquement utilisés et qui sont mentionnée précédemment : alanine aminotransférase (ALT), aspartate aminotransférase (AST), phosphatase alcaline (ALP), bilirubine totale, gamma-glutamyl transférase (GGT), Albumine totale, temps de prothrombine (TP) et rapport international normalisé (IRN), ammoniacque, la lactate déshydrogénase (LDH) et la protéine C-réactive (CRP) ainsi que la combinaison des scores effectué manquent de spécificité et de la sensibilité requises pour prédire efficacement l'évolution clinique de la maladie.

Cependant, il existe plusieurs biomarqueurs prometteurs qui ont le potentiel d'améliorer la prévention des lésions hépatiques (7,46). Il s'agit notamment de la glutamate déshydrogénase (GLDH), de la kératine 18 (K18), de la sorbitol déshydrogénase (SDH), de la glutathion S-transférase (GST), des acides biliaires, de l'ostéopontine (OPN), Fatty Acid binding protein 1 (FABP1), High mobility Group Box-1(HMGB1) et du micro-ARN 122 (miR-122) (Tableau 2).

I.2.4.1. Glutamate Déshydrogénase (GLDH)

La GLDH est une enzyme présente dans les mitochondries des cellules du foie. Elle est impliquée dans le métabolisme des acides aminés et joue un rôle dans le cycle de l'urée, qui est responsable de l'élimination de l'azote en excès dans l'organisme. Sa localisation lui confère le caractère d'un biomarqueur d'hépatotoxicité en reflétant l'altération structurelle des mitochondries des cellules hépatiques (47). Contrairement aux transaminases (ALT), les GLDH n'augmente pas durant une lésion musculaire due à un exercice physique (48), d'où sa considération comme un marqueur plus spécifique des lésions ou blessures de cellules hépatiques.

La GLDH peut être utile pour détecter des lésions hépatocellulaires légères non avancé, qui peuvent ne pas être mise en évidence par d'autres marqueurs tels que l'ALT et l'AST (49). La GLDH peut être particulièrement utile pour évaluer les lésions hépatiques induites par les médicaments, les expositions toxiques et les stades précoces des lésions hépatiques (47,50).

Cependant, la GLDH présente des inconvénients tels que l'insensibilité à certains agents hépatotoxiques. Par exemple des niveaux élevés de GLDH ont été mesurés chez des patients traités à l'héparine, une molécule sans hépatotoxicité apparente (51). Dans une autre étude, l'administration d'une forte dose de furosémide à des souris a induit une nécrose des hépatocytes, entraînant une augmentation des taux d'ALT, mais aucune augmentation des taux sériques de GLDH ou d'ADN mitochondrial (49).

I.2.4.2. Kératine (K18)

La K18 est une protéine qui fait partie du cytosquelette des cellules épithéliales, y compris celles du foie. Elle assure la stabilité structurelle et le soutien des cellules. La protéine K18 est particulièrement abondante dans les hépatocytes (52).

Les lésions hépatiques induites par des médicaments ou des infections virales peuvent entraîner la mort des hépatocytes par divers mécanismes, notamment l'apoptose et la nécrose. Au cours de l'apoptose, la protéine K18 est présente sous deux formes : la forme complète (K18) et la forme clivée (M30) par la caspase (53). Par conséquent, la mesure des

taux circulants de K18 et de ses fragments, en particulier M30, peut fournir des indications sur la progression de la mort des cellules hépatocytaires (54).

Bien que la mesure de K18 et de M30 ne soit pas invasive et puisse fournir des informations sur les signes précoces de lésions hépatiques, la spécificité de K18 et de M30 comme biomarqueurs est discutable car la protéine est exprimée par toutes les cellules épithéliales simples. En outre, des niveaux élevés de K18 et de M30 sont associés à de nombreuses maladies telles que le cancer du poumon, le cancer des voies biliaires, les infections par le VHB et le VHC et la stéatose hépatique non alcoolique (55–58).

L'une des limites de ce biomarqueur individuel réside dans le chevauchement important de ses niveaux entre les patients atteints ou non de NASH, ce qui a un impact sur sa sensibilité et sa spécificité. Cela suggère que la CK18 seule n'est pas suffisamment précise pour une utilisation clinique et souligne la nécessité de combiner d'autres marqueurs sériques, tels que le médiateur de surface de l'apoptose FAS (sFAS). Le sFAS est impliqué dans l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose dans les hépatocytes et peut améliorer la précision du diagnostic (55).

I.2.4.3. Sorbitol déshydrogénase (SDH)

La SDH est une enzyme cytoplasmique qui métabolise le sorbitol, un sucre-alcool. Elle se trouve principalement dans le foie et les testicules. La SDH a été étudiée comme biomarqueur pour des maladies hépatiques et testiculaires (59).

Des taux élevés de SDH dans le sang suggèrent que les hépatocytes sont endommagés et que leur contenu cellulaire, y compris des enzymes telles que la SDH, s'échappe dans la circulation. C'est un indicateur plus sensible des lésions hépatocellulaires que les transaminases, car ses augmentations sont plus prononcées aux premiers stades des lésions hépatocytaires (60). Il convient de noter que certains médicaments inhibent l'expression de l'ALT, ce qui pourrait masquer des lésions hépatiques normalement détectées par la SDH. La sensibilité variable et le manque de capacité à différencier les causes sous-jacentes des lésions limitent son utilisation dans la pratique clinique.

I.2.4.4. Glutathion S-transférase (GST)

La GST est une enzyme cytosolique présente dans divers tissus, dont le foie. Elle joue un rôle crucial dans les processus de détoxification cellulaire des composés endogènes et exogènes, y compris les médicaments, les toxines et les espèces réactives de l'oxygène. Les lésions hépatiques entraînent sa libération dans le plasma à partir du cytosol hépatique (61,62). L'avantage par rapport aux transaminases est qu'elle est sécrétée en plus grande quantité (63). D'autre part, il a été démontré que les niveaux de GST dans le plasma peuvent être associés à des dépôts de lipides dans le foie, ce qui suggère l'utilisation de la GST pour diagnostiquer la NASH.

Des études ont montré que la GST (glutathion-S-transférase) est un marqueur fiable des lésions hépatiques, plus sensible que l'ALT et l'AST. Cependant, il a été constaté que la GST ne fournit pas d'informations supplémentaires pour déterminer précisément le moment où les lésions hépatiques se produisent ou se résorbent, ni pour évaluer la gravité de chaque type de lésion hépatique induite. Cette observation est faite par rapport au panel de marqueurs déjà établi à ces fins (63).

I.2.4.5. Acides biliaires

Les acides biliaires sont synthétisés dans le foie et sécrétés dans les voies biliaires. Ils servent de biomarqueurs pour les lésions hépatiques induites par les médicaments, en raison de leurs propriétés détergentes, amphiphiles et émulsifiantes, qui altèrent l'intégrité de la membrane cellulaire et entraînent des effets cytotoxiques.

L'accumulation d'acides biliaires dans les hépatocytes peut déclencher des mécanismes de régulation adaptatifs. Les effets toxiques des acides biliaires peuvent survenir lorsque certains médicaments perturbent la régulation des acides biliaires (64). Les acides biliaires présentent une spécificité limitée dans les lésions hépatiques induites par les médicaments puisqu'ils peuvent être détectés en grande quantité dans diverses maladies hépatobiliaires.

I.2.4.6. Ostéopontine (OPN)

L'ostéopontine est une protéine sécrétée dans divers tissus et cellules tels les macrophages, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et épithéliales, dont le foie. C'est une protéine multifonctionnelle dont l'expression est modulée par l'interleukine-1b et d'autres agents impliqués dans les réponses inflammatoires aiguës (65,66).

Des études démontrent que l'OPN jouant le rôle d'une cytokine inflammatoire est impliquée dans la modulation de la réponse immunitaires, en attirant les neutrophiles, les lymphocytes et les macrophages vers les sites de lésions hépatiques (67,68). La mesure des niveaux d'ostéopontine pourrait potentiellement aider à prédire des lésions hépatiques en cours de développement.

L'application de ce biomarqueur individuel est compliquée par son implication dans différents mécanismes au cours d'une toxicité induite par un médicament, comme dans le cas de la toxicité de l'acétaminophène (APAP). De plus, l'ostéopontine (OPN) produite par les hépatocytes peut se comporter différemment de celle produite par les cellules inflammatoires, ce qui rend la compréhension de son mécanisme d'action plus complexe.

I.2.4.7. High mobility Group Box-1 (HMGB1)

HMGB1 est une protéine nucléaire présente dans divers tissus et qui joue un rôle crucial dans les processus liés à l'ADN tels que la réplication, la recombinaison, la réparation et la régulation transcriptionnelle. Elle est libérée des cellules dans l'espace extracellulaire en réponse aux dommages cellulaires et à l'inflammation (69,70). L'HMGB1 existe sous différentes formes, y compris les formes non acétylées, « thiolé » et acétylées, chacune ayant des fonctions distinctes dans les processus cellulaires et les réponses immunitaires.

Dans des conditions normales, les formes non acétylées et « thiolé » de HMGB1 restent localisées dans le noyau mais peuvent être libérées suite à des lésions cellulaires. Lors de son passage dans l'espace extracellulaire, le HMGB1 peut se lier aux récepteurs des produits finaux de glycation avancée, ce qui induit une réponse inflammatoire avec un apport cellulaire sur le site de la lésion (71,72). Lors d'une hépatotoxicité sévère, le niveau de HMGB1 augmentent de manière significative. Les taux d'HMGB1 ont tendance à revenir relativement vite à leur niveau de base lorsque la fonction hépatique commence à se rétablir (73). Le suivi

des taux de changement de HMGB1 au fil du temps pourrait fournir des indications sur la progression de la cicatrisation et de la régénération du foie.

Trois limitations principales doivent être surmontés avant que des applications cliniques puissent être envisagées. Premièrement, il est essentiel de déterminer avec précision la durée de vie de HMGB1 et de ses isoformes chez les patients. La deuxième limite réside dans le manque d'informations sur la façon dont l'HMGB1 se propage du site de la lésion tissulaire à la circulation sanguine. Enfin, la troisième contrainte est d'ordre technique, car la seule méthode actuellement disponible pour caractériser les modifications post-traductionnelles de l'HMGB1 est la spectrométrie de masse, une technique longue et coûteuse qui n'est pas accessible dans un contexte de soins de routine (74).

I.2.4.8. Fatty Acid binding protein 1 (FABP1)

FABP1 est une protéine que l'on trouve principalement dans le foie et les reins, avec une expression moindre dans d'autres tissus tels que le cœur et les muscles squelettiques (75). Elle joue un rôle essentiel dans le transport intracellulaire et la régulation des acides gras. FABP1 contribue au contrôle du métabolisme des lipides, à l'utilisation de l'énergie et à divers processus cellulaires liés à l'homéostasie des lipides (76). De plus, FABP1 est impliqué dans divers processus de maladies métaboliques, notamment les maladies du foie, le cancer, le diabète, l'obésité et l'athérosclérose.

Il a été démontré que les niveaux de FABP1 réagissent plus rapidement aux lésions hépatocellulaires que les marqueurs traditionnels tels que l'ALAT (75). Des niveaux élevés de FABP1 dans le sang pourraient constituer une indication précoce des effets toxiques sur le foie. Une augmentation des niveaux de FABP1 a été observée dans diverses affections hépatiques, notamment l'hépatite virale B et les maladies hépatiques non alcooliques. Inversement, une expression réduite de FABP1 pourrait indiquer une réponse protectrice contre les lésions hépatiques. Ces variations dans le taux de FABP1 pourraient fournir une stratégie de gestion des affections hépatiques (76,77).

FABP1 a été identifié comme un biomarqueur des lésions hépatiques induites par les médicaments (DILI). Il a montré des propriétés supérieures en termes de distribution tissulaire et de cinétique par rapport à l'ALT, mais a des limites en termes de prédiction du développement de lésions hépatiques induites par les médicaments. Par conséquent, son utilisation isolée n'est pas recommandée et elle devrait plutôt être considérée comme un complément à l'ALT en tant que marqueur.

I.2.4.9. Micro-ARN 122 (miR-122)

Le microARN-122 (miR-122) est une petite molécule d'ARN qui joue un rôle important dans la régulation des gènes. Il est fortement exprimé dans le tissu hépatique (70 % des miARN hépatiques) et est impliqué dans le contrôle de divers processus spécifiques au foie, y compris le métabolisme des lipides, l'homéostasie du cholestérol et la réplication virale. MiR-122 est considéré comme l'un des microARN les plus abondants et les plus spécifiques au foie dans l'organisme. Des études récentes ont démontrées qu'une augmentation substantielle des niveaux de miR-122 est observée en présence de substances hépatotoxiques (79). A noter que, contrairement à l'alanine aminotransférase (ALAT), le miR-122 n'augmente pas en réponse à une lésion musculaire, ce qui en fait un indicateur potentiellement sensible des lésions hépatiques précoces.

Même si le miR-122 s'est avéré utile pour prédire la présence de NASH, il a montré des résultats similaires à ceux d'autres biomarqueurs circulants, y compris la CK18. De même, sa combinaison avec d'autres scores n'a pas augmenté la performance du score (46).

Tableau 2: Biomarqueurs sériques et histologiques de la DILI (80).

Serum biomarker	Advantage	Disadvantage	Comments	Reference
GLDH	- Specific expression in liver. - Early recognition of DILI and not impacted by age, gender, or muscle injury. - Indicative of DILI prognosis.	- Elevated levels without hepatotoxicity. - Controversy in predicting hepatocyte necrosis.	- GLDH is related to DILI diagnosis and prognosis. - Possibly a specific biomarker for mitochondrial dysfunction.	Antoine et al., 2013; Schomaker et al., 2013; Flanagan et al., 2014; McGill et al., 2014; Singhal et al., 2014; Thulin et al., 2017
K18	- K18 and ccK18 ratio could predict necrosis and apoptosis. - Early recognition of DILI. - Not affected by muscle exercise. - Indicative of DILI prognosis.	- Not liver specific. - Also increased in other diseases.	In various liver diseases, elevations in K18 and ccK18 may represent liver inflammation, and their ratio could assess the extent of hepatocyte necrosis and apoptosis.	Thulin et al., 2014; Ku et al., 2016; Chu et al., 2017; Wei et al., 2017; Sugimoto et al., 2018
SDH	- Early recognition of DILI could detect liver injury caused by special types of drugs. - Abundant in liver. - Short elimination half-life.	No indicative of DILI prognosis.	Previous studies have shown that SDH concentration was elevated in acute and mild liver injuries, which suggested that it may be a sensitive biomarker in liver inflammation.	Harrill et al., 2012; Metushi et al., 2012; Williams et al., 2012; Metushi et al., 2014b
GST	- GSTM1, GSTT1, and GSTP1 associated with ATDILI. - Increased GSTα in early DILI.	- Expensive and time-consuming genetic testing. - No reported in the prognosis of DILI. - Lacking specificity in DILI.	The genetic polymorphism of GST is closely related to ATDILI and GSTα presents its sensitivity in DILI.	Singla et al., 2014; Cai et al., 2015; Wu et al., 2016a; Sun et al., 2017; Tsai et al., 2017
BAs	Informative about the mechanism of cholestasis caused by drugs.	Lacking specificity in DILI.	Elevated BA levels can be detected in various hepatobiliary diseases, which indicates its limited specificity in DILI.	Yamazaki et al., 2013; Qiu et al., 2016; Cepa et al., 2018
CYP450	- Participation in multiple drug metabolic reactions by CYP450 and its isoforms. - Poor outcome with anti-drug/anti-CYP P450 antibodies in antituberculosis drug-induced liver injury.	- Genetic testing is expensive and time-consuming. - The mechanism between drugs and CYP is complex and remained unknown.	Treatment with some immune-related drugs may be effective once the role of immunity mechanism is determined.	Tang et al., 2013; Li et al., 2014; Metushi et al., 2014a; He et al., 2015; Metushi et al., 2016
OPN	- Prognosis of bad outcome in DILI. - Associated with the degree of liver necrosis.	Not liver specific.	OPN acts as a pro-inflammatory cytokine in inflammatory liver disease and attracts neutrophils, lymphocytes, and macrophages to hepatic injury sites.	Fan et al., 2015; Srungaram et al., 2015; Arriazu et al., 2017; Sampayo-Escobar et al., 2018

GLDH, glutamate dehydrogenase; K18, keratin 18; ccK18, caspase cleaves K18; SDH, sorbitol dehydrogenase; GST, glutathione S-transferase; GSTα, glutathione-S-transferase alpha; BAs, bile acids; CYP450, cytochrome P450; OPN, osteopontin.

Histological biomarker	Advantage	Disadvantage	Comments	Reference
HMGB1	- Early recognition of DILI. - Involved in DILI prognosis.	Not liver specific.	HMGB1 acts as a mediator playing a key role both in the early and late stages of systemic inflammation and its acetylated form may be a better biomarker for prognosis prediction in DILI.	Wang et al., 2013; Nakamura et al., 2014; Huebener et al., 2015; Lundback et al., 2016
FABP1	- Abundant in liver and weak expression in heart and skeletal muscles. - Elevations in FABP1 levels was associated with bad DILI outcome.	Elevated in various liver diseases.	FABP1 has superior characteristics regarding tissue distribution and kinetics compared to ALT.	Wu et al., 2016b; Karvellas et al., 2017; Mikus et al., 2017; Wu et al., 2017
CDH5	Elevated in DILI and sinusoidal dilatation.	Not liver specific.	At present, there are a few reports about the role of CDH5 in DILI, so it needs further study and confirmation.	Mikus et al., 2017; Jarzabek et al., 2018

HMGB1, high mobility group box-1 protein; FABP1, fatty acid binding protein 1; CDH5, cadherin 5.

Bien que certains soient prometteurs, ces biomarqueurs n'ont pas encore démontré la performance diagnostique ou prédictive requise pour le suivi à moyen ou long terme de la CLD. En outre, il est important de noter que ces biomarqueurs ne sont pas couramment mesurés dans la pratique clinique de routine, en raison de leur complexité technique et de la disponibilité d'autres marqueurs tels que l'ALT et l'AST. Leur utilisation peut être plus courante dans des environnements spécialisés ou dans des études de recherche axées sur l'évaluation

de l'hépatotoxicité. De ce fait, des biomarqueurs non invasifs, sensibles et spécifiques pour la détection précoce des dysfonctionnements hépatiques sont donc toujours attendus.

I.3. Albumine Sérique Humain (HSA) : généralités

I.3.1. Synthèse et structure

Les hépatocytes localisés dans le foie sont responsables de la production de l'albumine sérique humaine (HSA). Le processus commence par la sécrétion de pré-pro-albumine, qui se transforme ensuite en pro-albumine dans le réticulum endoplasmique (4). Ensuite, le peptide N-terminal est excisé dans le réticulum endoplasmique, tandis que l'oligopeptide de 6 acides aminés à l'extrémité N-terminale est clivé dans l'appareil de Golgi, ce qui conduit à la maturation de la protéine. Dans sa forme native, cette protéine mature consiste en une chaîne solitaire contenant 585 résidus d'acides aminés et a un poids moléculaire de 66 438 Da grâce à une isoforme prédominante (5). L'HSA est sécrétée dans le système vasculaire à raison de 10 à 15 g/jour (4). Elle possède une demi-vie d'environ 20 jours et peut subir diverses altérations dans les muscles, la peau, le foie et les reins (81), influençant potentiellement des aspects tels que la liaison aux ligands et les propriétés antioxydantes.

La séquence primaire de la protéine comprend aussi un résidu tryptophane (Trp214) et plusieurs résidus d'acides aminés chargés (lysines, arginines, acides glutamiques et acides aspartiques), qui contribuent à sa grande solubilité dans l'eau (5). En outre, l'HSA contient 35 résidus cystéine, dont 34 sont impliqués dans la formation de 17 liaisons disulfure, ce qui contribue à sa stabilité et sa flexibilité (82,83). A signaler, que le résidu cystéine 34 (Cys34) n'est pas lié et peut interagir avec d'autres molécules en circulation.

La structure secondaire prédominante de l'HSA est constituée d'hélices α (68 %), sans présence d'éléments de feuillets β . HSA adapte une conformation globulaire en forme de cœur (82) et comprend trois domaines homologues : le domaine I (résidus 1 à 195), le domaine II (résidus 196 à 383) et le domaine III (résidus 284 à 585) (84–86). La structures 3D de l'HSA (Figure 3) reste largement cohérente même lorsqu'elle est exposée à une gamme variée de ligands. Des interactions hydrophobes et liaisons hydrogènes sont responsables de la cohésion entre le sous-domaine IIA et l'interface des deux sous-domaines IA et IB. Le domaine III interagit uniquement avec le sous-domaine IIB, alors que les domaines I et III sont séparés par un canal substantiel formé par les sous-domaines IB, IIIA et IIIB. C'est pourquoi, les interactions entre les domaines est distincte malgré la similitude des structures des domaines (82,84,87).

Grace a la présence considérable de résidus acides et basiques, la conformation de HSA peut varier à différents niveaux de pH. À des pH inférieurs à 2,7, l'HSA est sous une conformation étendue (E). Entre pH 2,7 et 4,3, l'HSA adopte la forme à migration rapide (F), caractérisée par une viscosité accrue, une solubilité réduite et une perte d'hélices α par rapport aux conditions physiologiques (forme neutre (N)). Pour un pH entre 4,3 et 8,0, le HSA adopte la forme N, caractérisée par une structure en forme de cœur (Figure 3). À des pH supérieurs à 8,0, l'HSA prendre la forme basique (B), marquée par une affinité accrue pour certains ligands par rapport à la forme N (84,88).

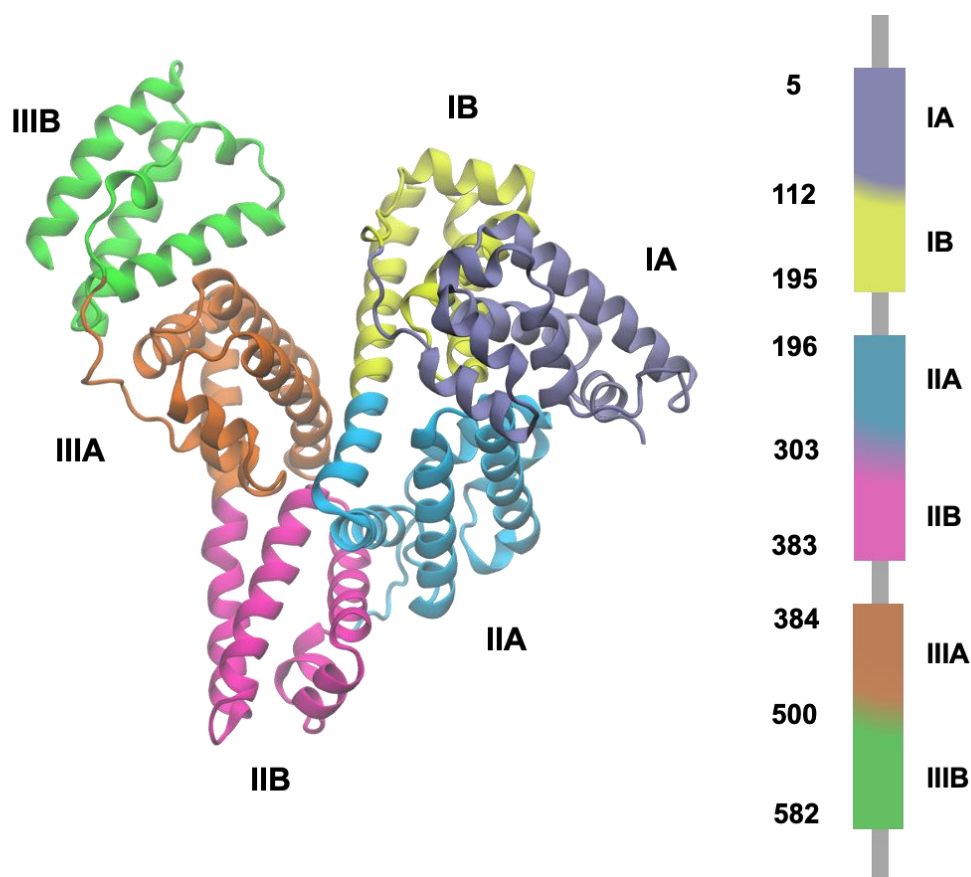


Figure 3: Organisation modulaire tridimensionnelle des domaines HSA.

Le panneau de droite montre l'architecture de la séquence HSA, avec trois domaines conservés répétés. Le panneau de gauche montre la structure tridimensionnelle de l'HSA avec les sous-domaines représentés par des couleurs différentes.

En outre, des variations dans la conformation de l'HSA sont observées lorsqu'on compare la structure de HSA sans ligands à celles qui sont liées à des acides gras (AG). Les domaines I et III semblent pivoter autour de leur interface avec le domaine II, ainsi que la rotation du domaine I autour du domaine III (84).

I.3.2. Rôles et fonctions

La concentration de HSA circulant dans le sang est l'un des indicateurs les plus utilisés pour évaluer l'état de santé d'un individu dans des nombreuses maladies. En outre, l'HSA à plusieurs fonctions physiologiques importantes subdivisées en propriété oncotique et non oncotique, notamment la régulation de la pression osmotique des colloïdes et de la perméabilité des membranes capillaires, la liaison et le transport des ligands, la neutralisation des radicaux libres, ainsi que les propriétés antioxydantes et de protection circulatoire (89).

I.3.2.1. Activités oncotiques

Le HSA contribue à 80 % de la pression oncotique du plasma (25-33 mm Hg). La pression oncotique joue un rôle essentiel dans la stimulation de la synthèse de l'HSA. Cette pression est attribuée soit au bas point isoélectrique de l'HSA, soit à la différence de masse moléculaire entre le HSA (67 kDa) et les globulines plasmatiques (170 kDa) (90). Due au point isoélectrique bas, la charge globale de l'HSA est négative à un pH physiologique (91).

I.3.2.2. Activités de fixation et transport

La structure tertiaire du HSA lui permet de lier et de transporter un large éventail de molécules endogènes et exogènes, notamment des métabolites, des gaz (NO), des médicaments et composés alimentaires (89,92,93). De plus, l'HSA peut se lier à la bilirubine et favoriser sa clairance. L'HSA sert également de réservoir pour le NO, en se liant à la cystéine libre (Cys34). La libération de NO par le HSA est due soit suite à une exposition à un pH sanguin faible, soit suite à une hypoxie tissulaire modifiant la structure de l'HSA, contribuant au maintien du tonus vasculaire (94). L'HSA contribue notamment à la pharmacocinétique de différents médicaments (90,95) et participe dans la gestion des déchets toxiques. Par ailleurs, des études ont identifié différents sites de liaisons, les sites I et II de Sudlow étant les plus importants et les mieux caractérisés. Ces sites sont situés dans les sous-domaines IIA et IIIA.

I.3.2.3. Activités antioxydantes

Le HSA est réputé pour ses activités antioxydantes dans le plasma. En particulier, l'HSA est la principale source extracellulaire de groupes sulfhydriles réduits, qui piègent les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de l'azote (RNS). Une autre façon de supprimer la production de ces espèces réactives dans l'environnement plasmatique est de se lier au Cu (II) libre, un métal qui joue un rôle central dans l'accélération de la production de radicaux libres. En outre, l'administration de HSA semble viser à fournir des groupes thiols libres et à agir comme un échangeur d'électrons, conduisant à la régénération d'autres protéines intravasculaires (92). D'autres sites de liaison semblent encore contribuer aux propriétés antioxydantes de l'HSA. Par exemple, les résidus Met sensibles à l'oxydation peuvent agir comme des pièges pour les ROS (96–98). Un autre site de liaison est la région N-terminale (NTS), qui est responsable de la liaison des métaux (99), empêchant leur implication dans la formation de radicaux libres (100).

L'état d'oxydoréduction de l'HSA est défini sur la base de l'état redox de la cystéine 34 (Cys34). Des études récentes indiquent que le potentiel redox de l'HSA change au cours de l'oxydation par différents oxydants, servant de biomarqueur indicatif de ce processus et rendant l'HSA plus sensible à la dégradation et à la digestion par la trypsine (101).

I.3.2.4. Activités circulatoires

Mal comprises mais tout aussi importante, la HSA possède des fonctions anticoagulantes et antithrombotiques. L'HSA est capable à se lier aux S-nitrosothiols formant le NO, empêchant l'inactivation rapide du NO et permettant de prolonger ses effets antiagrégants sur les plaquettes (89). Une caractéristique remarquable de l'HSA réside dans sa capacité à se lier à des substances pro-inflammatoires et à des médiateurs de l'inflammation. Le lipopolysaccharide (LPS), l'acide lipotéichoïque et les peptidoglycanes sont des composants de surface des bactéries gram-négatives et gram-positives qui activent le système immunitaire inné via le récepteur Toll-like 4 (TLR4) et induisent l'inflammation. L'HSA se lie à ces molécules par des forces électrostatiques et hydrophobes. (102).

I.3.3. Propriétés de fixation de l'albumine

La remarquable capacité du HSA à se lier à diverses molécules et ions métalliques découle de sa structure complexe composée de multiples domaines. Ces interactions entre l'HSA et les différentes molécules à des implications pour les études en protéomique et la découverte de biomarqueurs.

I.3.3.1. Sites de liaison des ions métalliques

L'HSA présente un large éventail de sites de liaison qui peut lier divers ions métalliques, notamment Mg(II), Al(III), Ca(II), Mn(II), Co(II/III), Ni(II), Cu(I/II), Zn(II), Cd(II), Pt(II), Au(I/II), Hg(II) et Tb(III) (5,103–105). À ce jour, trois sites de liaison primaires d'ions métalliques ont été identifiés (Figure 4). Le premier site, appelé site de liaison N-terminal (NTS), est situé à l'extrémité N-terminale de la protéine. Ici, Cu(II), Co(II) et Ni(II) se coordonnent avec les atomes d'azote apportés par certains acides aminés spécifiques et se fixent sur le HSA (106).

Le deuxième site de liaison implique le groupe thiol libre de Cys34, qui a le pouvoir de lier des ions comme Au(I), Hg(II) et Pt(II) (104,107,108). La Cys34 est le seul groupe thiol qui ne participe pas à un pont disulfure. La chaîne latérale de la Cys34 est positionnée dans une crevasse, ce qui limite son accessibilité et renforce la spécificité des interactions avec les métaux (109).

Le troisième site de liaison aux métaux est connu sous le nom de site de liaison multi-métallique primaire ou site de cadmium A (MBS-A). Ce site peut lier divers ions métalliques de manière stable. La MBS-A est principalement associée au Zn(II) et au Cd(II), tout en servant également de site de liaison secondaire pour le Cu(II) et le Ni(II) (110). La MBS-A est située à l'interface entre les domaines I et II, entourée de sites responsables de la liaison des acides gras, ce qui implique une influence possible des acides gras sur le transport et la distribution des ions métalliques (110,111).

Bien qu'il n'y ait pas encore de preuves expérimentales, l'hypothèse d'un site de liaison secondaire pour le Cd(II) a été émise (Figure 4), sous le nom de site de liaison multi-métallique secondaire ou site B du cadmium (MBS-B) (112). D'autres sites non spécifiques ou non définies pourraient également être impliqués dans la liaison des métaux, mais des études complémentaires sont nécessaires (5,113,114).

I.3.3.1.1. Sites de fixation du cuivre (Cu)

Les toutes premières études sur l'interaction entre le HSA et le Cu ont montré que le HSA pouvait lier moins de deux atomes de Cu (115). Par la suite, il a été démontré que le site de liaison spécifique, le NTS, était capable de fixer le Cu (116).

Des études ont également montré l'existence d'un second site de liaison du Cu(II), le site de liaison multimétallique (MBS-A) (117). Ce site peut lier d'autres cations métalliques divalents avec des affinités similaires (118). Il est à noter que ce site a une très faible affinité pour le Cu(II) par rapport au site NTS. Cela signifie que seul le NTS est peuplé par le Cu(II) dans des conditions physiologiques (119).

I.3.3.1.2. Sites de fixation du cadmium (Cd)

La liaison du Cd(II) à l'HSA s'est avérée similaire à celle du Zn(II). Des études ont montré que le HSA est capable de fixer jusqu'à deux ions Cd (II) provenant des sites MBS-A et MBS-B. Ceci a été démontré par des études RMN où, après l'ajout d'un équivalent $^{111}/^{113}\text{Cd}$ (II), deux pics RMN ont été détectés : le premier pic pour $^{111}/^{113}\text{Cd}$ (II), à environ 130 ppm (site A) et le second pic à environ 20 ppm (site B) (120).

Des expériences de compétition avec Cu(II) ont indiqué que la liaison du Cd(II) au site MBS-A est trois fois plus faible que celle du Zn(II), et neuf fois plus faible pour le site MBS-B (118).

I.3.3.1.3. Sites de fixation de l'or (Au)

En raison de l'intérêt porté aux médicaments à base d'or, les chercheurs ont entamé des études sur les interactions entre l'or et les sites de liaisons de HSA. Ces études impliquent principalement l'échange de ligands dans des complexes ternaires, en raison de l'hydrolyse immédiate de l'Au(II) et de l'Au(III) (121,122).

En effet, une étude avait révélé que le complexe phosphine, analogue aux médicaments à base d'or, ne présentait aucune affinité pour les sites de liaisons NTS et MBS-A (118). Le résidu Cys34 a été identifiée comme le seul site de liaison pour Au(I) dans l'albumine. Les complexes Au(III) subissent une réduction rapide en présence d'albumine, ce qui conduit à la liaison de l'Au(I) à l'HSA (123).

I.3.3.1.4. Sites de fixation de la dansylsarcosine (Ds)

La dansylsarcosine se lie préférentiellement au site 2 de la drogue (site 2 de Sudlow). Ce site permet la fixation d'autres composés tels que les benzodiazépines (124). En outre, les chercheurs ont noté une réduction de la liaison de la dansylsarcosine chez les patients souffrant d'une maladie hépatique avancée (125).

I.3.3.1.5. Sites de fixation de la thyroxine (L-T4)

La Thyroxine se lie à l'HSA exempté d'acide gras (AG) sur quatre sites distincts (Figure 4), désignés par Tr-1 à Tr-4 ; Tr-1 réside dans le sous-domaine IIA, Tr-2 dans le sous-domaine IIIA, et Tr-3 et Tr-4 dans le sous-domaine IIIB (126).

Sur la base de considérations structurales, Tr-1 est supposé être le site de liaison de la L-thyroxine (L-T4) avec la plus grande affinité. La liaison de la L-T4 à Tr-2 est entravée par l'encombrement stérique, qui fait que l'hormone s'oriente vers le solvant, ce qui implique une faible affinité de Tr-2 pour la L-T4. Les molécules de L-T4 se lient à Tr-3 et Tr-4 d'une manière qui chevauche partiellement la liaison des acide gras au site de fixation d'acide gras FA5 (87). Cependant, Tr-4 est considéré comme un site à faible affinité pour la L-T4 face à une liaison hydrogène (126).

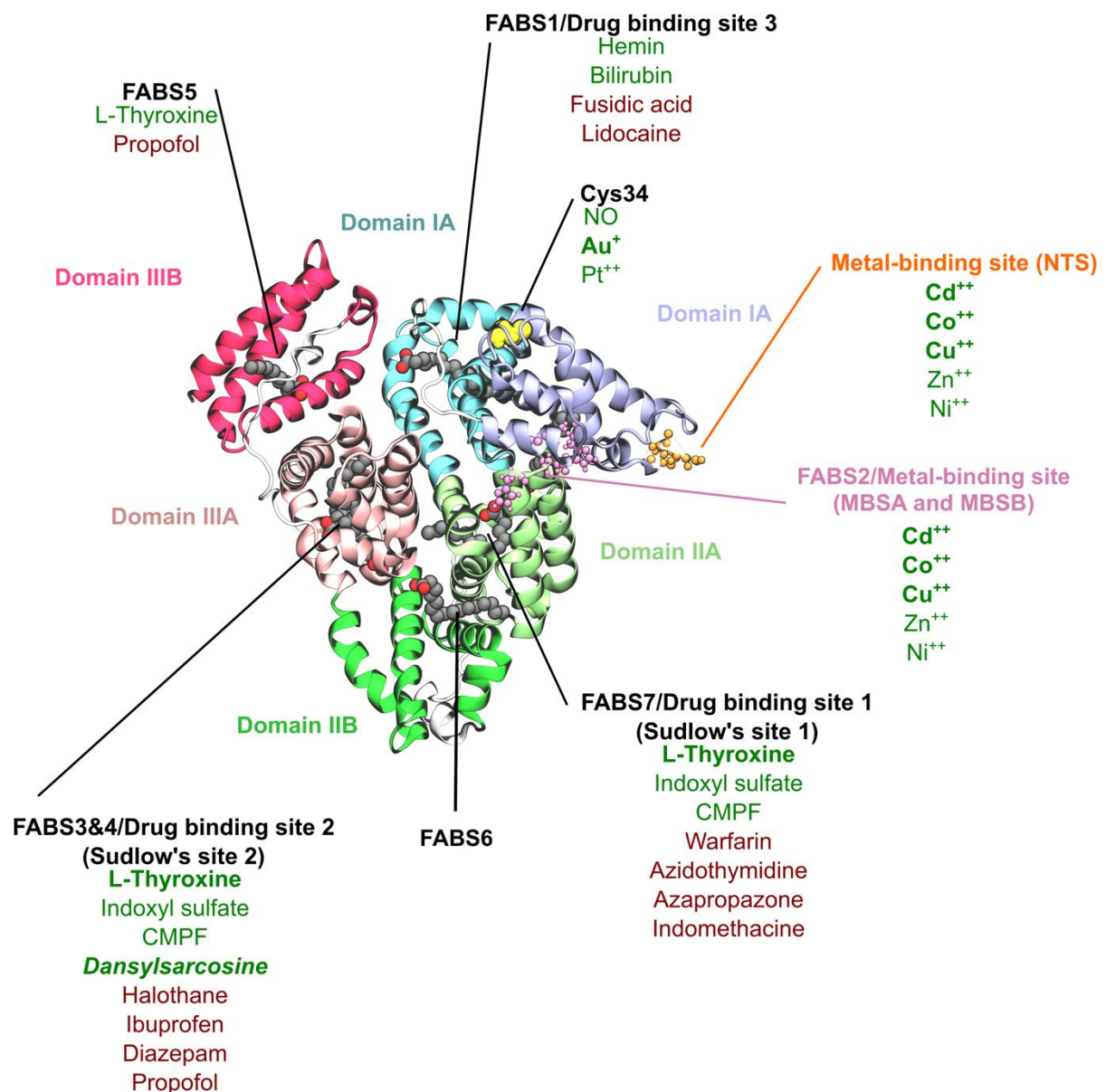


Figure 4: Structure tridimensionnelle de l'HSA représentant les sites de fixation de la L-thyroxine (L-T4), des acides gras (AG), des ions métalliques ainsi que certains médicaments sur l'HSA.

I.3.3.2. Sites de liaison des acides gras (AG)

Dans le liquide extracellulaire, l'albumine humaine (HSA) joue un rôle essentiel dans le transport des acides gras non estérifiés. L'albumine possède sept sites de liaison à haute affinité pour les acides gras (Figure 4), ainsi que plus de 20 sites de liaison à faible affinité. Les sites de liaison 7, 3 et 4 de l'albumine, situés respectivement dans le sous-domaine IIA et la région sous-structurale IIIA, sont connus comme étant les principaux sites de liaison I et II pour divers médicaments. En outre, le site de liaison 1 de l'albumine joue également un rôle majeur dans la liaison à certains ligands, notamment des composés endogènes tels que l'hème. En revanche, les sites de liaison 2, 5 et 6 sont moins impliqués dans la liaison aux ligands (127).

Il est important de noter que la liaison de l'albumine aux AG peut poser des problèmes lors des études de liaisons ligand-albumine. Certains médicaments qui ne sont pas sélectifs *in vivo* peuvent être transportés par l'albumine après avoir été modifiés par des AG. En outre, des modifications post-traductionnelles spécifiques de l'HSA dans des environnements particuliers peuvent conduire à une augmentation du nombre de résidus, ce qui peut influencer la capacité de liaison de ces formes post-traductionnelles de l'albumine avec les AG. Par exemple, les AG entrent en compétition avec la L-T4 (Figure 4) pour la fixation sur les quatre sites Tr, et des ratios élevés d'AG empêchent la fixation de la L-T4. Dans le même temps, les AG induisent des changements de conformation qui entraînent un réarrangement de la structure tridimensionnelle de l'HSA (85,87), ce qui aboutit à la formation d'un cinquième site (Tr-5) de liaison de la T4, situé dans la fente entre les domaines I et III (5).

I.3.4. Modifications post-traductionnelles de l'albumine (PTM)

Malgré ses caractéristiques très conservées chez l'humain, l'HSA subit diverses modifications structurelles et chimiques affectant ses activités oncotiques et non oncotiques. Les modifications post-traductionnelles (PTM), entraînent l'émergence d'isoformes, également connues sous le nom de protéoformes (128). Les PTM les plus courants pour l'HSA sont présentés ci-dessous (Figure 5).

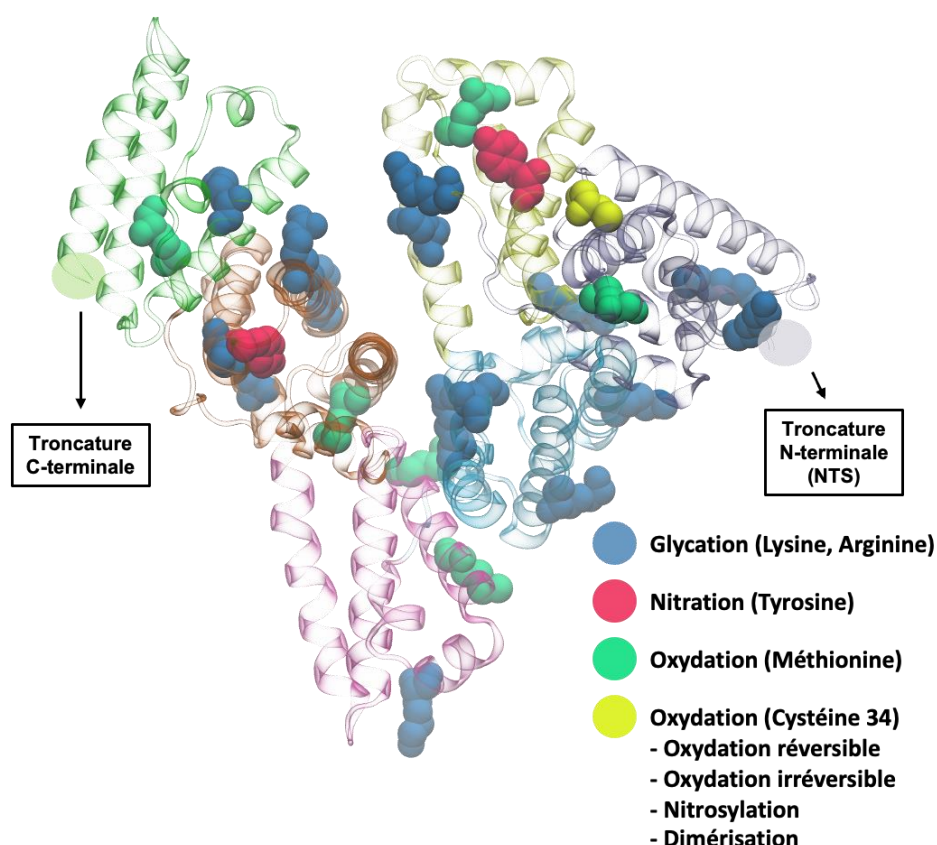


Figure 5 : Les PTM les plus abondants affectant la structure de l'HSA

I.3.4.1. Oxydation

Le stress oxydatif peut entraîner de graves altérations réversibles ou irréversibles aux différentes protéines, notamment à l'albumine. Le processus d'oxydation affectant plusieurs

acides aminés, en particulier la Cys34, est souvent déclenchée par des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des produits de peroxydation des lipides, des molécules telles que l'acide ascorbique, ou des radicaux hydroxyle libres générés par des ions divalents tels que le fer ou le cuivre (129).

L'oxydation de la Cys34, qui contient le seul groupement thiol libre, est la modification post-traductionnelle (PTM) la plus étudiée de HSA. La Cys34 est située à la surface de l'HSA, à proximité de Asp38, His39 et Tyr84 qui sont capables de modifier l'état d'ionisation de la Cys34, influençant ainsi sa réactivité (84). Dans des conditions physiologiques, l'albumine subit des réactions d'oxydo-réduction basées sur l'état redox de la Cys34 selon les modalités suivantes : (i) la mercaptalbumine humaine (HMA) est la forme réduite et la plus abondante présentant un groupement sulfhydryle disponible, constituant 70 à 80% de l'albumine totale chez les individus sains, (ii) la non-mercaptalbumine humaine 1 (HNA1) est la forme oxydée réversible (20 à 30%) qui forme un pont disulfure mixte avec une autre cystéine, une homocystéine ou un groupe glutathion, et (iii) la non-mercaptalbumine humaine 2 (HNA2) est la forme oxydée irréversible de l'albumine (<5%) (5).

En cas de stress oxydatif important, HNA1, qui est déjà oxydé de manière réversible, conduit à la formation d'acide sulfénique (SOH), qui évolue ensuite en acide sulfinique (SO₂H) ou en acide sulfonique (SO₃H) ce qui entraîne la perte permanente de la fonction antioxydante de HSA (130). À noter que suite à une réduction des ponts disulfures, le groupe Cys34-SOH peut être reconverti en Cys34-SH (4). D'autre part, les altérations de la Cys34 régulent de manière allostérique et inhibent de manière compétitive la réactivité de l'HSA. De plus, les PTM oxydatives peuvent également impliquer d'autres résidus d'acides aminés, tels que la méthionine, la lysine, l'arginine et la proline (131,132). Par exemple, l'oxydation de la Cys34 par la cystéine déclenche de manière allostérique une N-homocystéinylation rapide de la Lys525. En outre, la formation d'un pont disulfure peut empêcher la S-nitrosylation de la Cys34 (133).

I.3.4.2. Glycation

La glycation est l'une des modifications post-traductionnelles (PTM) les plus fréquemment observées (134). Elle désigne une interaction spontanée et non enzymatique entre un monosaccharide et une protéine (135).

Chez les individus normaux, environ 10 % de l'HSA est glyqué, mais cette proportion atteint 20 à 30 % chez les patients hyperglycémiques (98). D'autre part, chez des patients diabétiques, la glycation de l'HSA causée par l'interaction du glucose avec l'albumine, à travers une réaction de base de Schiff, peut entraîner une détérioration de la capacité de l'HSA à lier des ligands et d'agir comme un antioxydant. Ce phénomène est dû à des modifications au niveau des lysines, des arginines et de l'extrémité N-terminale (136), avec Arg410 et Lys525 étant les principaux sites de glycation de l'albumine (137). Par exemple, la capacité de liaison du Cu(II) (138,139) et de Fe(III) (140) à l'albumine glyquée est plus faible que celle de l'albumine saine. De plus, la présence de formes glyquées a été liée à l'oxydation de la méthionine, ce qui suggère leur utilisation potentielle comme biomarqueurs pour les conditions diabétiques sévères (5,141).

D'autres conséquences de la glycation de l'HSA peuvent inclure une exposition accrue des régions hydrophobes, un impact sur la liaison et le transport du Trp par l'HSA (142), et une augmentation accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (97,143,144).

I.3.4.3. Acétylation

Au sein des protéines plasmatiques, l'absence de chaîne hydrocarbonée dans la structure de l'HSA la rend plus sensible à l'acétylation (5). Par exemple, lorsque l'aspirine (acide acétylsalicylique) est présente à une concentration comparable aux taux sanguins thérapeutiques, elle réagit avec l'HSA, ce qui entraîne une liaison covalente entre le groupe acétyle de l'acide acétylsalicylique et la lysine des groupes N-amino de l'HSA.

Ces résidus de lysine acétylés restent stables pendant au moins 21 jours, comme l'a démontré cette étude (145,146) et peuvent contribuer à l'effet anti-inflammatoire de l'aspirine. En outre, l'acétylation modifie la capacité du HSA à se lier à d'autres molécules. Par exemple, l'affinité de l'HSA acétylé pour la phénylbutazone est augmentée, tandis que son affinité pour la bilirubine est diminuée (145).

I.3.4.4. Dimérisation

Liée à un stress oxydatif accru, l'albumine peut subir une liaison disulfure intermoléculaire par le biais du résidu Cys34, conduisant à la création d'un dimère d'albumine (1,11). Cette dimérisation entraîne une diminution des résidus Cys34 disponibles, ce qui affecte négativement les capacités antioxydantes et de liaison de l'HSA, tout en ayant un impact positif sur la capacité d'expansion du plasma et le transport des médicaments en raison de la masse moléculaire doublée et de la demi-vie plasmatique prolongée (147,148).

I.3.4.5. Nitration et nitrosylation

Le HSA agit à la fois comme un réservoir et un transducteur de NO (monoxyde d'azote) (149–151). Notamment, environ 82 % du NO dans le sang est transporté sous forme de S-nitrosothiol lié au résidu Cys34 de l'HSA (90). En outre, l'HSA a la capacité de lier le NO aux résidus Trp et/ou Tyr (152,153).

Il a été démontré que l'HSA nitrosylée atténue les lésions d'ischémie/reperfusion dans des modèles animaux, en maintenant une libération soutenue de NO (Semsroth et al., 2005 ; Hallström et al., 2008). De plus, la S-nitrosylation de la Cys34 réduit de manière allostérique l'affinité des ions Cu(II) et de l'acide palmitique pour l'HSA (154).

D'autre part, la formation de 3-nitrotyrosine (Tyr-3-NO₂) par la réaction entre le RNS et les résidus Tyr dans les protéines a été largement étudiée et est largement utilisée comme biomarqueur des conditions physiologiques et pathologiques médiées par le RNS (155,156).

Enfin, les modifications du résidu Trp par les RNS sont importantes dans des conditions physiologiques et pathologiques (152,155). Le Trp libre peut être modifié en plusieurs produits nitrés et oxydés par réaction avec différents RNS. Comme les résidus Trp sont plus profondément ancrés dans les protéines, cela signifie que les résidus Trp sont exposés à la surface et que leur modification peut entraîner une modulation de la reconnaissance (macro)moléculaire (152,157).

I.3.4.6. Troncation N-terminal et C-terminal

L'HSA peut subir des troncations aux sites N-terminal et C-terminal (39), par élimination des résidus [Asp1-Ala2] (158,159) et [- Leu585] (158) respectivement. Étant donné que le site N-terminal est impliqué dans la chélation des ions métalliques libres, l'exclusion de ces résidus ont un impact sur la capacité antioxydante de l'HSA (160). Quant à la forme tronquée au niveau C-terminal, l'exclusion de la leucine entraîne une réduction de la demi-vie (158).

I.3.5. Aspects biomédicaux et thérapeutiques de l'albumine sérique humain

Peu après sa découverte, l'utilisation médicale de l'albumine s'est limitée à une administration par voie intraveineuse comme substitut sanguin pour le traitement des brûlures graves et des pertes de sang. D'autres études ont exploré son utilisation en tant que médicament ciblé pour les tissus inflammatoires ou malins, ou pour prolonger la demi-vie d'un médicament. En raison de ses propriétés inhérentes, telles que la biocompatibilité et la biodégradabilité, la sérum-albumine est largement utilisée dans les études cliniques et biomédicales (127).

I.3.5.1. L'albumine et ses applications biomédicales

L'albumine a un certain nombre d'applications biomédicales, notamment dans le contexte de cicatrisation de la peau, d'ingénierie tissulaire du cartilage, d'ingénierie tissulaire des os et d'ingénierie tissulaire du cœur. En tant que biomolécules endogènes, les hydrogels à base d'albumine peuvent être utilisés comme vecteurs pour une variété de médicaments, en les protégeant d'une dégradation potentielle lors d'une application médicamenteuse. D'autre part, Les échafaudages poreux à base d'albumine sont couramment utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage, car l'albumine imitent la structure et les propriétés du cartilage naturel et contribue à maintenir la stabilité de l'échafaudage, tout en empêchant le risque de transmission de maladies et les traumatismes secondaires. Une autre application de l'albumine se situe dans le domaine de l'ingénierie des tissus osseux, où les matériaux à base d'albumine, tels que les matériaux d'échafaudage et les allogreffes, ont le potentiel d'améliorer la régénération osseuse. De plus, les échafaudages et les hydrogels à base d'albumine sont prometteurs pour soutenir l'ingénierie et la réparation des tissus cardiaques en imitant l'environnement naturel du cœur et en offrant des avantages uniques pour les thérapies régénératives cardiaques (127).

I.3.5.2. L'albumine sérique humaine comme biomarqueur de maladies

L'HSA sert d'indicateur précieux dans diverses conditions médicales, notamment le cancer, l'ischémie, l'obésité post-ménopausique et le diabète. Des isoformes modifiées de l'HSA ont été observées et associées à différentes pathologies. Cela souligne l'importance des isoformes HSA dans la quête d'exploration des biomarqueurs (161).

Pour la détection d'ischémie, le rôle de l'HSA modifiée par ischémie en tant qu'un biomarqueur est attribuable au fait que l'exposition aux tissus ischémiques entraîne des altérations au site N-terminus de l'HSA, ce qui modifie la capacité de HSA à chélater les métaux et plus spécifiquement le cobalt. Cependant, l'HSA modifiée par l'ischémie ne semble pas être exclusive aux tissus spécifiques ou aux conditions cliniques liées à l'ischémie. Une étude à démontrer une augmentation de l'insuffisance rénale terminale et de la cirrhose du foie (162).

Il a été démontré que la glycation protéique est augmentée chez les patients diabétiques par rapport aux sujets non diabétiques (5). En effet, le HSA glyqué augmente avant l'Hb glyqué (HbA1C), un biomarqueur du contrôle glycémique (163,164), lorsque le statut de contrôle glycémique s'aggrave à court terme, permettant ainsi une détection plus précoce. L'intervalle de référence de l'HSA glyqué chez les humains normaux est de 6 à 10 % de l'HSA glyquée alors que chez les patients souffrant d'hyperglycémie le taux augmente jusqu'à 20-30 % (139). Par conséquent, l'HSA glyqué a été proposé comme un outil de contrôle à court terme de l'état diabétique chez les patients (90,141). Comme l'une des fonctions du foie est la régulation des niveaux plasmatiques de glucose, toute dysfonction, en particulier en cas de maladies chroniques du foie, entraînera des anomalies métaboliques du glucose. A titre d'exemple, des études, ont démontrés que les valeurs de l'HSA glyqué était plus élevées que le taux plasmatiques de glucose chez les patients atteints d'une stéatose hépatique alcoolique (165) et de cirrhose du foie (166,167).

Sur la base de ce qui a été présenté et pour pouvoir évaluer l'albumine en tant que biomarqueur viable des maladies hépatiques chroniques, plusieurs approches analytiques doivent être appliquées pour rassembler les informations nécessaires pour nos études.

I.4. La protéomique

La protéomique est un domaine multidisciplinaire qui englobe l'étude systématique et complète de toutes les protéines présentes dans un système biologique, y compris leur structure, leur fonction, leur expression, leurs interactions, leurs modifications et leur dynamique. Il vise à fournir une vue globale du protéome, qui est l'ensemble des protéines exprimées par un organisme, une cellule, un tissu ou un échantillon biologique dans un contexte spécifique. Pour déchiffrer un protéome, dans notre cas la molécule d'albumine, une série d'étapes complexes est nécessaire, y compris la préparation, la séparation et l'analyse des échantillons, et enfin le traitement de la base de données (168).

La spectrométrie de masse est la méthode de base pour le domaine de la protéomique. Cette méthode mesure la masse sur charge (m/z) d'un ion ainsi que l'intensité du signal après ionisation. En se concentrant sur les protéines et les peptides, la majeure partie des analyses est basé sur une approche protéomique centrée sur les peptides. Les protéines sont identifiées et quantifiées après digestion enzymatique en peptides plus petits et facilement accessibles. Cette approche dite "Bottom-Up" est utilisée pour mesurer l'abondance des protéines, cartographier les interactions protéine-protéine et diverses modifications post-traductionnelles (PTM) (169). En outre, l'utilisation de la spectrométrie de masse a été étendue au domaine de la biologie structurale avec l'intégration des approches de marquage de surface et de cross-linking chimique, ce qui permet d'obtenir des informations complémentaires sur les nouvelles interactions protéine-protéine et même protéine-ADN (170,171).

Contrairement aux approches décrites ci-dessus, la spectrométrie de masse native (Top-Down), analyse les protéines intactes et natives. Malgré les progrès réalisés dans le domaine de la spectrométrie de masse avec l'introduction de sources d'ionisation telles que l'ionisation par électrospray (ESI) (172) et la disponibilité d'analyseurs à haute résolution, l'analyse des protéines intactes et des complexes protéiques n'est pas encore aussi aboutie que leurs homologues axés sur les peptides. Ceci est principalement dû aux défis posés par l'ionisation efficace de grandes protéines intactes.

I.4.1. La protéomique basée sur la spectrométrie de masse

Le principe fondamental d'un spectromètre de masse est de transformer des molécules dans leur état naturel en ion à l'état gazeux à partir d'une source d'ionisation et d'obtenir leur rapport mass/charge noté m/z . Cette technique permet d'obtenir d'information sur la masse moléculaire et la formule brute d'une molécule, ainsi que certaines caractéristiques structurales à partir de la fragmentation des ions (173). Typiquement, un spectromètre de masse se compose de trois éléments principaux : une source d'ionisation (pour ioniser les substances à analyser), un analyseur de masse (pour sélectionner les ions en fonction de leur m/z) et un détecteur d'ions.

Pour pouvoir analyser diverses substances organiques et inorganiques par spectrométrie de masse, la première étape consiste à créer des ions à l'état gazeux. Plusieurs sources d'ionisation ont été développées, basées sur différents principes pour assurer une ionisation optimale. La première technique d'ionisation développée était basée sur l'impact électronique (EI), qui consiste à bombarder la molécule cible avec des électrons de haute énergie dans le vide, ce qui entraîne une perte d'électrons et donc l'ionisation de la molécule (174). Une autre approche développée par Munson et al (175) est basée sur l'ionisation chimique (IC) grâce à une réaction entre un ion réactif (CH_3^+ ou NH_4^+) et la molécule cible. La limite avec ces 2 approches (EI et IC) est la nature des molécules qui doit être préalablement volatilisé sous vide, sans dégradation thermique, ni transformation au niveau de la source d'ionisation.

Pour résoudre les problèmes de fragmentation au niveau de la source, d'autres méthodes d'ionisation ont été mises au point pour l'étude des molécules non volatiles de poids moléculaire élevé. Ces méthodes d'ionisation se répartissent en deux catégories principales : la désorption-ionisation, y compris l'ionisation par bombardement atomique rapide (FAB) (176) et la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) (177,178); et la nébulisation-ionisation y compris l'ionisation par électrospray (ESI) (179), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) (180) ainsi que d'autres méthodes.

L'ESI (Figure 6) est particulièrement populaire en protéomique, non seulement en raison de sa capacité à ioniser d'une façon douce des substances de poids moléculaire élevé telles que les peptides et les protéines sans fragmentation significative à la source (172), mais aussi en raison de son potentiel de couplage avec la chromatographie en phase liquide. Cette technique consiste à ioniser des molécules en phase liquide sous une haute tension et à une pression atmosphérique dans un dispositif formé d'un capillaire et contre-électrode. Sous l'effet d'un champ électrique, des gouttelettes chargées contenant des analytes se forment, suivies d'une désolvatation par un gaz de séchage, conduisant à une explosion due aux repulsions coulombienne. Cette explosion coulombienne entraîne la formation de microgouttelettes, qui à leur tour entraînent la formation d'ions gazeux (172).

Ionisation par électronébulisation (ESI)

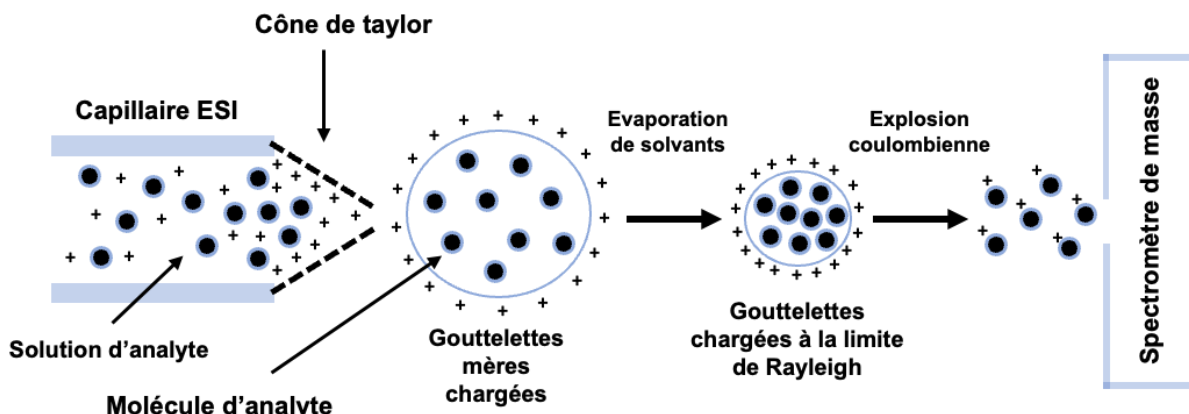


Figure 6: Le principe de l'ionisation des analytes par électronébulisation (ESI).

Après que les ions aient été formés dans la source, un ou plusieurs analyseurs va réaliser le tri des ions en fonction du rapport masse /charge (m/z). Il existe différents types d'analyseurs de masse (Tableau 3), tels que les analyseurs quadripolaires (Q), les orbitrap, les pièges ioniques quadripolaires (IT), les analyseurs à résonance cyclotronique ionique par transformée de Fourier (FT-ICR) ainsi que des analyseurs à temps de vol (TOF). Le quadripôle (Q) est constitué de quatre électrodes métalliques qui trient les ions et les transmettent au détecteur en faisant varier un potentiel électrique formé par la combinaison d'une tension continue et sinusoïdale. Ce courant électrique est appliqué aux pôles opposés des 4 électrodes, induisant l'oscillation et le mouvement des ions à l'intérieur du quadripôle. Un ion traverse l'analyseur quadripolaire si sa trajectoire est stable, c'est-à-dire si l'amplitude de son oscillation ne dépasse pas celle de l'espace délimité par les 4 électrodes du quadripôle. Alors que pour les analyseurs TOF, les ions formés par une source d'ions pulsée (ESI), sont accélérés due à une différence de potentiel de 10-30 kV. Ensuite ces ions sont lâchés dans le Spectromètre de masse à temps de vol dans lequel ne règne aucun champ électrique. Ayant la même énergie cinétique au départ, les ions vont voyager avec des vitesses inversement proportionnelles à leur rapport m/z . Les ions lourds mettront davantage de temps à atteindre le détecteur final que des ions plus légers. Le TOF va mesurer le temps de vol nécessaire aux ions pour le traverser et atteindre le détecteur final (181,182). Ces analyseurs sont couramment utilisés en mode tandem MS/MS, tels que Q-Q, Q-IT, Q-TOF et Q-Orbitrap, pour mettre en place d'un système de spectrométrie de masse plus sélectif et plus sensible. Le principe de la MS/MS est de sélectionner un ion moléculaire ou un ion fragment en utilisant d'abord un analyseur MS^1 , qui sélectionne le m/z de l'ion cible, puis le fragmente dans une cellule de collision, et enfin sélectionne le m/z des fragments de l'ion cible, appelés ions fils, à l'aide d'un MS^2 . Dans la cellule de collision, les ions peuvent se fragmenter soit spontanément, soit après l'application d'un voltage et l'injection d'un gaz réacteur (182). En utilisant des modes de balayages adaptés (MS^1 , MS^2 ou MS^1 et MS^2 combinés), différents types d'informations peuvent être obtenus : (1) une identification des ions fils d'un ion parent sélectionné, (2) une identification des ions parents d'un ion fils sélectionné et (3) identification des ions parents susceptibles de perdre des fragments neutres de même masse. La fragmentation est conçue pour améliorer la caractérisation structurale des molécules.

Tableau 3: Comparaison générale des analyseurs de masse ESI et de leurs propriétés (183,184)

	Quadripôle (Q)	Piège à ions linéaire (LIT)	Rélectron à temps de vol (TOF)	Secteur magnétique	Transformée de Fourier résonance cyclotronique ionique (FT-ICR)	Quadripôle-temps de vol (Q-TOF)
Précision (ppm)	100	100	< 5	< 3	< 1	< 5
Résolution	10^2 - 10^4	10^3 - 10^4	10^3 - 10^4	10^2 - 10^4	10^4 - 10^6	10^4 - 10^5
MS/MS	MS ²	MS ⁿ	MS	MS ²	MS ⁿ	MS ²

C'est pourquoi le mode MS/MS est de plus en plus utilisé en protéomique comme le triple quadripôle, MALDI-TOF et le Q-TOF (Figure 7). Ces analyseurs de masse produisent des spectres à haute résolution. Ces spectres montrent les fragments produits par le clivage des liaisons peptidiques. La différence de masse observée entre deux fragments consécutifs correspond idéalement à la masse d'un résidu d'acide aminé. Le séquençage peptidique est basé sur l'attribution de ces différences de masse à des acides aminés, ce qui permet de reconstruire la séquence peptidique. Cette méthode a cependant des limites, notamment parce que certains fragments résultant de processus de collision sont parfois absents du spectre MS². Face à cette limitation, l'identification est réalisée en comparant les spectres observés avec les spectres théoriques d'une séquence de référence. Ceci permet une identification complète de la séquence même en l'absence de certains fragments. Ces méthodes d'identification sont appliquées aux peptides plutôt qu'aux protéines, car leurs spectres de fragmentation sont plus simples (185).

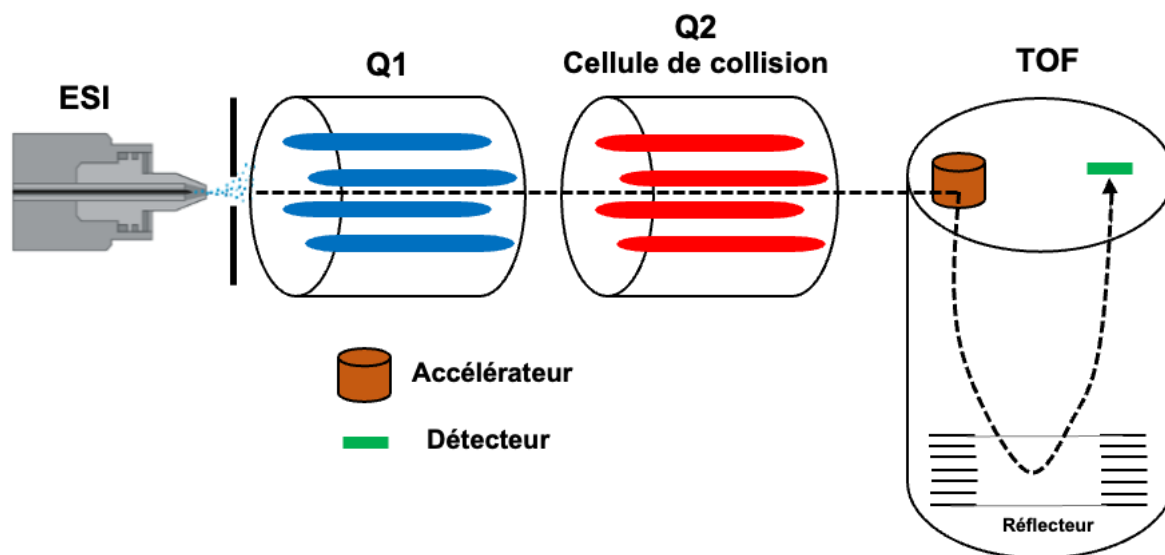


Figure 7: Schéma représentatif d'un spectromètre de masse en tandem quadripôle-temps de vol (Q-TOF).

En ce qui concerne l'acquisition des données, il existe de nombreuses méthodes, notamment l'acquisition dépendante des données (DDA), également connue sous le nom de mode d'acquisition dépendante de l'information (IDA), ou l'acquisition indépendante des

données (DIA) pour l'analyse non ciblée. En mode DDA, tous les peptides situés dans une certaine gamme de masse sont fragmentés, puis les ions les plus intenses détectés dans une fenêtre temporelle spécifique sont analysés (186). Quant à l'acquisition DIA, l'instrument se concentre de manière séquentielle sur une fenêtre de masse étroite de précurseurs pendant une durée déterminée et acquiert les données MS/MS de tous les précurseurs détectés dans cette fenêtre. Ce processus est répété de manière incrémentale sur des fenêtres plus petites afin de couvrir toute la gamme de masse. La technique la plus courante pour générer des données DIA est SWATH-MS (Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment ions). Cette méthode implique que le spectromètre de masse choisisse et fragmente systématiquement tous les ions dans des fenêtres de masse définies pendant chaque cycle et tout au long de la période d'analyse. Cette approche permet d'obtenir un journal résolu dans le temps des ions fragments provenant de tous les précurseurs peptidiques. Par conséquent, les données SWATH MS comprennent des cartes d'ions fragments multiplexés capturés de manière cohérente dans la gamme spécifiée de masses des précurseurs. La probabilité de rencontrer des composés perturbateurs est particulièrement faible. SWATH-MS ne sert pas seulement à l'identification, mais facilite également la quantification. Sa capacité à reconnaître et à quantifier des substances dans des mélanges complexes sur une large plage dynamique et avec une précision constante en fait un outil bien adapté aux efforts de recherche comparative. Cependant, de nombreux défis subsistent. Par exemple, les nouveaux outils logiciels conçus pour l'analyse DIA doivent résoudre des problèmes spécifiques, tels que la discrimination efficace des faux-positifs et des faux-négatifs erronés, ainsi que la déconvolution des spectres complexes (187).

I.4.2. Techniques séparatives des protéines

Néanmoins, la protéomique est confrontée à plusieurs défis, notamment en ce qui concerne la séparation des mélanges protéiques complexes, ce qui limite leur analyse et identification. Diverses techniques de séparation sont employées avant l'injection et l'ionisation d'une solution protéiques dans un spectromètre de masse. Ces techniques reposent sur plusieurs principes et peuvent être utilisées individuellement ou en combinaison.

La chromatographie liquide est l'une des techniques les plus utilisées pour séparer, identifier et quantifier les composants d'un mélange. Elle consiste à utiliser une phase mobile liquide pour transporter un échantillon à travers une phase stationnaire placée dans une colonne. Le processus de séparation repose sur les affinités et les interactions des composants de l'échantillon vis à vis les phases stationnaire et mobile. La détection des composants séparés est généralement réalisée par divers moyens, tels que la spectroscopie UV-visible, la fluorescence ou la spectrométrie de masse, ce qui permet une analyse qualitative et quantitative des constituants de l'échantillon. Pour améliorer les performances de séparation et d'analyse dans certains contextes, la chromatographie bidimensionnelle et tridimensionnelle a été développée, dans laquelle différents types de chromatographie liquide sont couplés et utilisés en série. Par exemple, la chromatographie d'échange cationique, la chromatographie d'échange anionique, la chromatographie d'exclusion de taille ou la chromatographie d'interaction hydrophile peuvent être combinées à la chromatographie en phase inverse (188).

La chromatographie liquide (LC) utilisant des phases mobiles volatiles est la méthode préférée pour séparer des mélanges complexes. En présence d'une source d'ionisation appropriée, notamment une source ESI, la séparation en ligne directement liée à un

spectromètre de masse (MS) peut être automatisée. Cette approche élimine la nécessité d'étapes laborieuses de collecte des fractions et permet une analyse à haut débit (189). Cependant, l'éventail des méthodes chromatographiques compatibles avec cette configuration est limité. La chromatographie liquide en phase inverse (RPLC) (Figure 8) est la technique la plus utilisée en protéomique (190–192). Lors de la séparation, les peptides et les protéines sont élués de la colonne chromatographique à l'aide d'un gradient de phase non polaire (193). D'autres méthodes, notamment la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) (194), la chromatographie d'exclusion de taille (SEC) (195), la chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC) (196) et la chromatographie d'échange d'ions (IEC) (197) sont encore compatibles pour un couplage direct avec la MS.

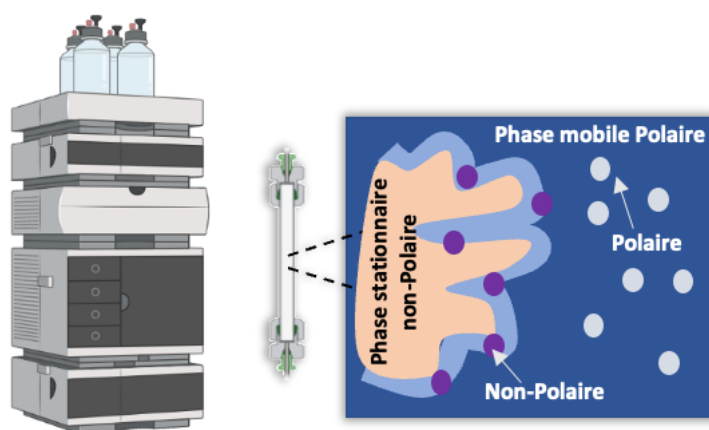


Figure 8: Schéma représentatif de la chromatographie liquide en phase inverse

I.4.3. Différentes approches protéomique

I.4.3.1. Approche Top-Down

La spectrométrie de masse native, également connue sous le nom d'analyse Top-Down, est une technique utilisée pour étudier les protéines intactes, les complexes non covalents et d'autres biomolécules. Son objectif est d'analyser ces biomolécules en préservant autant que possible leur structure et leurs interactions d'origine (198–202). Cependant, la préservation complète de l'état natif est un défi en raison du processus d'ionisation, qui élimine les molécules de solvant de l'analyte (Figure 9).

Le développement de sources d'ionisation douces telles que l'ESI (199) a permis de conserver les caractéristiques natives des protéines en phase gazeuse (203,204). La spectrométrie de masse native a évolué et est désormais appliquée à l'étude de diverses protéines solubles et membranaires, de leurs assemblages, des interactions protéine-protéine et des interactions avec des ligands, notamment des petites molécules, des cofacteurs, des lipides, des nucléotides, de l'ADN et de l'ARN (205,206). Des défis analytiques subsistent, tels que la préparation des échantillons pour l'ionisation native par électrospray. En outre, la présence de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation, la glycosylation et la lipidation s'ajoute à la complexité existante, nécessitant des analyseurs de masse avec des gammes m/z étendues pour les complexes protéiques. Un autre défi consiste à obtenir une résolution de masse élevée, qui améliore la précision de l'analyse de masse. La résolution de masse en spectrométrie de masse native dépend des limites de l'instrument et de la capacité à désolvater complètement la protéine ou le complexe protéique pendant

l'ionisation. Il peut être difficile d'obtenir une désolvatation complète, en particulier pour les petits adduits ioniques tels que Na^+ ou K^+ qui peuvent rester attachés (207).

Pour résoudre ces problèmes, des spectromètres de masse à haute résolution ont été introduits, améliorant la transmission des ions et la résolution de masse. Des techniques impliquant l'activation des ions, telles que le chauffage de la source d'ions ou la collision des ions avec des molécules de gaz inerte, ont également été développées pour optimiser la résolution de masse et la désolvatation. Les systèmes de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) fournissent, par rapport aux systèmes MS, plus d'informations structurales sur les complexes protéiques analysés, une meilleure désolvatation et un meilleur traitement des données pour l'analyse quantitative et qualitative des protéoformes (208).

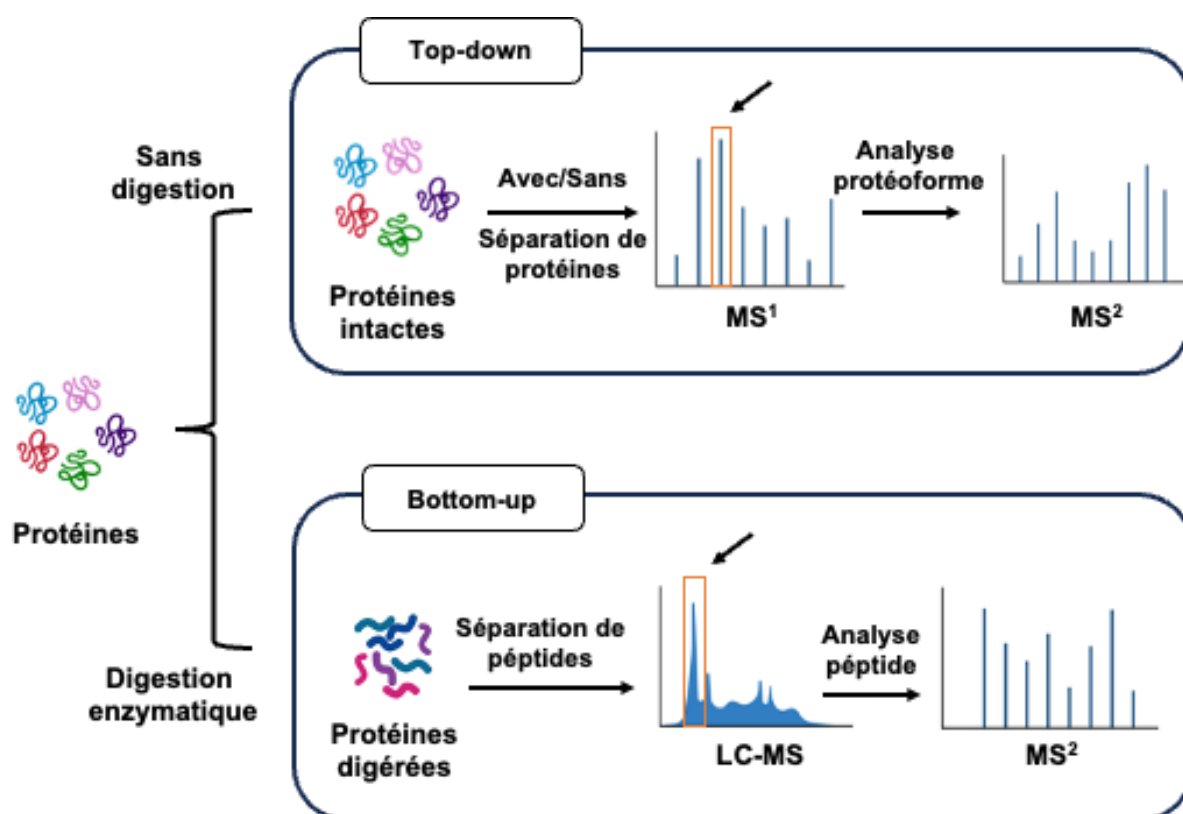


Figure 9: Schéma représentant deux approches protéomiques différentes : Top-down et Bottom-up

I.4.3.2. Approche Bottom-Up

Connue sous le nom de protéomique "shotgun", il s'agit de l'approche protéomique la plus couramment utilisée. Contrairement à l'approche Top-down, l'approche Bottom-UP implique la digestion des protéines à l'aide d'enzymes protéolytiques spécifiques, suivie d'une séparation chromatographique et d'une analyse spectrométrique des peptides générés (209) (Figure 9). L'avantage de cette méthode est que, à la fin de la préparation de l'échantillon, la majorité des peptides sont solubles dans l'eau. De plus, les peptides digérés ont un poids moléculaire plus faible, ce qui facilite leur ionisation et leur fragmentation. Malgré ces avantages, cette approche présente quelques inconvénients. Le temps de préparation des échantillons est généralement plus long en raison de l'étape de digestion et de purification, et la couverture de la séquence protéique est incomplète. Ceci peut être attribué à la formation de peptides non détectés lors de l'analyse, ainsi qu'au fait que les peptides peuvent être

communs à plusieurs protéines (210). Ceci peut également être lié au mode d'acquisition, DIA et DDA, qui peut ne pas les détecter lors de l'analyse, ou simplement parce que la quantité de ces peptides est inférieure à la limite de détection. Cette approche est principalement utilisée dans les analyses quantitatives. Malgré la couverture incomplète de la séquence protéique, qui entraîne une perte d'information, cette approche peut être utilisée comme analyse complémentaire aux analyses Top-Down pour caractériser les sites de modifications post-traductionnelles, en particulier dans les mélanges non complexes. La trypsine est l'enzyme la plus couramment utilisée, mais d'autres enzymes telles que la chymotrypsine, la lysyl endopeptidase (Lys-C), la peptidyl-lys métalloendopeptidase (lys-N), la glutamyl peptidase I (Glu-C), la métallopeptidase Peptidyl-Asp (Asp-N), la lysarginase, la clostripaïne (Arg-C), la pepsine, la Candidapepsine-9 (Sap9) et l'omptine (Ompt) (211) sont également utilisées. Cette gamme d'enzymes permet de couper sélectivement la séquence protéique, ce qui est très utile pour étudier les sites de modifications post-traductionnelles.

I.4.4. La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS)

Dans le cadre de nos travaux, il est important d'introduire l'ICP-MS puisque cette technologie a joué un rôle important dans les analyses des ligands du SEB test. La spectrométrie de masse à plasma inductif (ICP-MS) est une technique analytique puissante basée sur la génération des ions gazeux à partir de molécules à l'état naturel à l'aide d'une torche à plasma. Les ions gazeux sont ensuite triés en fonction de leur rapport m/z et analysés par un spectromètre de masse quadripolaire. Cette technologie présente un certain nombre d'avantages notamment l'analyse multi-élémentaire et la capacité à identifier différents isotopes d'un métal (212).

L'analyse des échantillons par ICP-MS peut être divisée en quatre étapes : introduction-nébulisation, ionisation, séparation de masse et détection. Tout d'abord, l'échantillon est dissous dans une solution et introduit automatiquement dans une chambre de nébulisation où l'échantillon est transformé en un aérosol liquide. Cet aérosol est transféré vers la source de plasma avec une température entre 6000 et 10000°C capable de vaporiser, dissocier, atomiser et ioniser complètement la plupart des éléments. Cependant, la température élevée de la flamme ICP incinère toute la matière organique et les complexes, ce qui rend impossible la déduction d'informations structurales sans l'utilisation de temps de rétention des étalons (213,214). Un autre inconvénient de l'ICP-MS était que certains éléments non métalliques (tels que le carbone, le phosphore, le soufre et les halogénures) ont des potentiels d'ionisation plus élevés, de sorte que leurs atomes ne s'ionisent pas aussi facilement. Ensuite, une partie de ce plasma est sujet à une accélération d'ions à l'aide d'un système de vide équipé des lentilles électrostatiques qui extraient les ions chargés positivement et les transportent vers un filtre de masse quadripolaire. Ce filtre de masse, composé de quatre barres cylindriques, ne transmet au détecteur que les ions présentant un rapport masse/charge spécifique après application d'un courant continu (DC) et d'un courant alternatif (RF). Après avoir traversé le quadripôle, les ions sont détectés par un multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes. Dans le cas des ions positifs, tels que les ions métalliques, le détecteur utilise une série de dynodes soumise à une tension négative pour amplifier le signal ionique. Chaque ion qui frappe une dynode libère plusieurs électrons qui frappent une autre dynode et ainsi de suite provoquant un effet boule de neige, ce qui amplifie le signal. Ce signal est traité par un logiciel informatique qui le convertit en données quantitatives, telles que les concentrations d'éléments. Des courbes d'étalonnage et des étalons sont utilisés pour relier le nombre d'ions aux concentrations d'analytes.

Étant donné qu'un nombre important de protéines sont des métalloprotéines, un nouveau domaine appelé "métallomique" a été introduit par Haraguchi. Ce domaine donne lieu à une variété d'approches analytiques axées sur les biomolécules contenant des métaux. La caractérisation et la quantification de ces molécules sont essentielles pour comprendre leur rôle complexe dans les systèmes biologiques. Diverses méthodes mixtes combinant une méthode de séparation suivie d'une analyse par spectrométrie de masse ont été développées, telles que CE-ICP-MS, FT-ICRMS, LC-ICP-MS (215,216), la majorité d'entre elles étant basées sur SEC-ICP-MS (217–219).

L'ICP-MS est largement utilisé en raison de ses limites de détection extrêmement basses, de sa large gamme dynamique, sa polyvalence pour plusieurs éléments, son analyse continue des signaux spectraux et sa capacité à traiter rapidement les échantillons (220). La capacité de l'ICP-MS à détecter les ions métalliques d'intérêt et les éléments hétéronucléaires présents dans les protéines, tels que S et P, en une seule étape, offre de grandes possibilités.

1.4.5. La protéomique et les modifications post-traductionnelles de l'albumine

Des études récentes ont révélé à l'aide de la protéomique diverses modifications post-traductionnelles de l'albumine dans le contexte de la cirrhose :

En utilisant la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à haute résolution (HPLC/ESI-TOF-MS), Domenicali et al (8) ont pu identifier différentes altérations structurales de l'HSA dans une cohorte de patients cirrhotiques dans des états stabilisés et aigus. Ils ont établi une relation entre ces altérations et les complications cliniques spécifiques, ainsi que la survie des patients. Notamment, l'HSA native et cystéinylée s'est avérée être un prédicteur significatif de la survie à un an.

La méthode de détection de l'albumine altérée par l'ischémie (IMA) mise au point par Bar-Or et al. en 2000 (6) évalue la capacité de l'albumine sérique humaine (HSA) à se lier au cobalt. Chez les patients atteints d'insuffisance hépatique chronique aiguë, on observe une altération de la capacité fonctionnelle de l'HSA, ce qui entraîne une fixation moins efficace du cobalt. En conséquence, le rapport entre l'IMA et l'albumine, appelé IMAR, est plus élevé chez ces patients par rapport aux individus en bonne santé ou aux patients cirrhotiques. De plus, une analyse de Kaplan-Meier a confirmé que les patients présentant un IMAR supérieur à 0,02 présentaient un taux de mortalité plus élevé. Par conséquent, l'IMAR est étroitement lié à la sévérité de la maladie et pourrait servir de paramètre pronostique crucial pour les patients souffrant d'insuffisance hépatique chronique aiguë.

Des études ont révélé une augmentation du rapport entre les dimères et les monomères de l'albumine sérique humaine (HSA) dans le plasma des patients atteints de cirrhose par rapport à celui des individus sains. Cette observation suggère que le rapport entre les dimères et les monomères de HSA pourrait être un indicateur utile de la maladie du foie, comme l'ont rapporté Naldi et al. en 2015 (11). La forme dimérique de l'HSA a été caractérisée à l'aide des techniques ESI-TOF et MALDI-TOF-MS. Il a été déterminé que la dimérisation se produit au niveau de la Cys-34, impliquant la formation d'un pont disulfure entre deux molécules de HSA.

D'autre part, Nagumo et al (221) ont pu démontrer une corrélation entre le stress oxydatif reflété par des niveaux élevés de cystéinylation et la sévérité des lésions hépatiques (augmentation de l'indice de Child-Pugh). La fraction cysteinylée a été caractérisée par ESI-TOF-MS chez les patients atteints d'une cirrhose.

De même, Alcaraz-Quiles et al. en 2018 (222) ont démontré en utilisant un système LC-ESI-QTOF que les niveaux de HNA1 et HNA2 étaient significativement plus élevés chez les patients atteints de cirrhose que chez les personnes en bonne santé et qu'ils augmentaient au fur et à mesure que la maladie hépatique évoluait. Le niveau élevé de HNA1 a été associé à des marqueurs d'inflammation tels que l'interleukine-6 (IL-6), l'IL-1 β , le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et l'IL-8 chez les patients atteints de cirrhose. Les résultats de l'étude suggèrent que le HNA1 joue un rôle dans le déclenchement de l'inflammation dans les PBMC, et cette découverte pourrait potentiellement conduire à des stratégies de réduction de l'inflammation systémique chez les patients atteints d'une maladie hépatique avancée en éliminant le HNA1 et en le remplaçant par de l'albumine réduite.

En outre, Baldassarre et al. en 2021 (14) a introduit le concept de concentration effective d'albumine (eAlb), qui représente la portion d'albumine dont la structure et la fonction sont intactes. Leur étude a montré que chez les patients atteints de cirrhose décompensée, l'albumine présente dans la circulation s'altère sur le plan structural, avec des modifications courantes telles que l'oxydation réversible et la glycation caractérisé par LC-ESI-QTOF. En outre, la concentration effective d'albumine (eAlb) diminue progressivement à mesure que la cirrhose s'aggrave, et elle se révèle plus précise que la concentration totale d'albumine (tAlb) pour différencier les différents stades de la cirrhose. Cela suggère que l'eAlb pourrait être un biomarqueur utile pour évaluer le pronostic et les réponses au traitement chez les patients atteints de cirrhose.

Très récemment, une étude, parue début septembre 2023, menée par Sharma et al. (223) basée sur une signature multi-omique a examiné l'insuffisance hépatique aiguë (ALF) en impliquant 225 participants, comprenant des patients atteints d'ALF et des individus en bonne santé. Les résultats de cette étude ont montré que, dans l'ALF, l'albumine subit des modifications importantes, devenant hautement dysfonctionnelle et subissant des changements significatifs, notamment une augmentation de l'oxydation et de la glycosylation. Ces altérations sont particulièrement marquées chez les patients qui ne survivent pas. Cette signature "albuminome" peut être utilisée pour repérer les patients exposés à un risque accru de décès précoce ou nécessitant une transplantation hépatique en urgence.

Il est donc clair que l'albumine sérique humaine (HSA) apparaît comme un outil crucial dans la recherche de biomarqueurs des maladies du foie. En effet, les études mentionnées ci-dessus ont montré une corrélation entre les altérations post-traductionnelles de l'albumine et les lésions hépatiques, suggérant qu'elles pourraient servir de biomarqueurs potentiels. Cependant, les techniques utilisées jusqu'à présent sont complexes à mettre en œuvre et ne conviennent pas à une utilisation clinique de routine, car elles manquent de spécificité et de reproductibilité.

Chapitre II. Hypothèses et objectifs de la thèse

L'étude approfondie de la variété des modifications post traductionnelles de l'albumine sérique humaine (HSA), et par conséquent leurs influence sur l'activité oncotique et non-oncotique de l'HSA, permettait d'améliorer le suivi et l'anticipation de la progression des lésions hépatiques. Notre revue de la littérature ayant confirmé que les modifications chimique et structurelles de HSA pourraient servir comme un biomarqueur tardif de dysfonctionnements hépatiques, nous présumons que les isoformes principales de HSA peuvent être produite aux premiers stades des dommages cellulaires et pourrait prédire des lésions hépatiques à venir. Les objectifs de nos recherches ont été de :

- (i) Développer des approches protéomiques pour évaluer d'une manière critique et fiable les isoformes d'HSA.
- (ii) Étudier d'une manière exhaustive l'impact des isoformes de HSA purifiées sur la structure et l'activité de l'HSA et de disposer d'une solution de production permettant d'obtenir des isoformes purifiées afin de les utiliser sur des cellules hépatiques pour comprendre leurs potentiels effets.
- (iii) Comprendre le lien entre les différentes PTMs et les différents stades des lésions hépatiques et de valider l'utilisation des isoformes comme outils de discrimination entre les sujets sains et les sujets atteints.

Dans ce but, un premier axe de recherche expérimentale "développement analytique" consistait à développer et valider des approches protéomiques pour caractériser, d'une manière robuste et sans équivoque, les isoformes de l'HSA. Il s'est agi plus spécifiquement : (1) d'évaluer des approches Top-Down et Bottom-Up conçue pour la quantification relative et absolue des isoformes de l'HSA et (2) pour avoir une idée de la nature des isoformes d'albumine présentes selon le profil analysé. Un second axe de recherche expérimentale "in vitro" consistait à produire des solutions enrichis d'isoformes spécifiques à partir d'une solution d'albumine commerciale. Cet axe avait pour but d'étudier l'origine de certaines modifications post traductionnelles de l'HSA vis-à-vis des modifications chimiques spécifiques, afin d'objectiver le lien éventuel entre la perturbation structurelle de l'HSA et son activité fonctionnelle. Un troisième axe de recherche clinique sous le titre du projet "ALBOM" ("ALBumin mOdifications as early bioMarkers of chronic liver diseases") consistait à analyser une cohorte de patients atteints des maladies hépatiques et d'étudier si les isoformes survenant au cours de ces pathologies pourraient être utiliser comme un biomarqueur précoce des atteintes hépatiques et comme un outil de discrimination entre sujet sains et atteints.

Ce travail translationnel est donc basé sur des études expérimentales et cliniques. Il a pour but ultime de démontrer que les lésions hépatiques avancés pourraient être révélés à un état précoce par la caractérisation des modifications chimiques et structurelles de HSA.

Chapitre III. Développement Analytique

Les travaux personnels présentés dans ce chapitre se focalisent sur le développement et la validation analytique de divers approches protéomiques. Ces approches sont conçues pour la caractérisation et la quantification relative et absolue des différentes isoformes de l'albumine sérique humaine (HSA). Ces isoformes sont générées par des modifications post-traductionnelles (PTM) et certains d'entre eux ont été identifiées comme des biomarqueurs potentiels pour les maladies hépatiques avancées. Les résultats de ces travaux sont présentés dans deux articles :

- Premier article :

Deux approches protéomiques top-down et bottom-up ont été développées pour caractériser de manière exhaustive les isoformes de HSA résultant de PTM, en particulier dans le contexte des maladies du foie. Cette étude vise à évaluer de manière approfondie les deux approches utilisées pour élucider le paysage complexe des modifications des HSA et à décider de la stratégie potentielle à appliquer dans le contexte de la recherche clinique.

- Deuxième article :

Compte tenu de l'utilisation potentielle des isoformes HSA en tant que biomarqueurs des maladies hépatiques, plusieurs approches protéomiques sont disponibles pour les quantifier. Ces approches majoritairement basées sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-MS) possèdent des limites. Dans cette étude, nous présentons le développement d'une approche top-down LC-MS rapide et simple pour quantifier d'une façon absolue (et non pas relative) les isoformes d'HSA dans un contexte clinique.

III.1. Article 1. Modifications post-traductionnelles de l'albumine sérique humaine analyse par une approche top-down validée par une analyse bottom-up complète

III.1.1. Introduction à l'article 1

Cette étude a été motivée par l'utilisation des modifications post-traductionnelles de l'albumine sérique humaine comme biomarqueurs des maladies hépatiques avancées dans plusieurs études en utilisant de simples méthodes Top-Down (1,2,8,14,131,224). Il était donc essentiel pour nous d'évaluer de manière critique la spécificité de la caractérisation des isoformes HSA ainsi que la fiabilité de leur détermination. À notre connaissance, la confrontation des approches Top-Down (TD) et Bottom-up (BU) effectuées sur les mêmes échantillons n'avait pas encore été rapportée, en particulier pour les PTM de l'HSA.

Pour atteindre ces objectifs, une approche à multiples facettes combinant des méthodologies TD et BU a été employée. L'approche TD offre l'avantage de caractériser des isoformes de protéines intactes, ce qui permet l'observation directe des PTM sans digestion des protéines. Cependant, sa précision et sa fiabilité dans la caractérisation des isoformes et des PTM de l'HSA ont nécessité une évaluation rigoureuse. En revanche, l'approche BU implique la digestion de la protéine en peptides pour l'analyse, offrant des informations complémentaires sur les PTM mais manquant potentiellement de détails spécifiques sur certaines modifications.

L'étude visait à combler le fossé entre ces deux approches, en fournissant une vue d'ensemble des isoformes de l'HSA. En comparant l'efficacité de la TD et de la BU dans la caractérisation des isoformes de l'HSA, la recherche visait à déterminer la stratégie la plus efficace pour élucider le paysage complexe des PTM de l'HSA.

III.1.2. Article 1: Posttranslational-modifications of human-serum-albumin analysis by a top-down approach validated by a comprehensive bottom-up analysis

Les données supplémentaires de l'article 1 sont disponibles en Annexe 1.

Journal of Chromatography B 1224 (2023) 123740



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

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



Posttranslational-modifications of human-serum-albumin analysis by a top-down approach validated by a comprehensive bottom-up analysis

Mohamad-Ali Rahali^{a,1}, Roy Lakis^{a,1}, François-Ludovic Sauvage^a, Emilie Pinault^a, Pierre Marquet^{a,b}, Franck Saint-Marcoux^{a,b}, Souleiman El Balkhi^{a,b,*}

^a P&T, UMR1248, University of Limoges, National Institute for Health and Medical Research (INSERM), Limoges, France

^b Department of pharmacology, toxicology and pharmacovigilance, CHU Limoges, Limoges, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Posttranslational modifications
Human serum albumin
Top-down
Bottom-up
Biomarkers
Liver diseases

ABSTRACT

The posttranslational modifications (PTM) of human serum albumin (HSA) can result in the development of isoforms that have been identified as potential biomarkers for advanced hepatic diseases. However, previous approaches using top-down (TD) analysis to identify isoforms based on molecular weight may have resulted in misidentifications. The nature of the identified isoforms has never been confirmed in previous works. Here, we aimed to critically evaluate TD for the characterization and determination of HSA isoforms in patients and make an inventory of HSA-PTM.

Serum samples from control subjects and patients with liver dysfunctions were analyzed using both top-down (TD) and bottom-up (BU) approaches. TD analysis involved using a LC-TOF-MS system to obtain a multicharged spectrum of HSA, which was deconvoluted to identify isoforms. Spectra were then used for relative quantitation analysis of albumin isoform abundances based on trapezoidal integration. For BU analysis, serums were reduced +/- alkylated, digested with trypsin and analyzed in the Q-TOF, data-dependent acquisition (DDA) mode to generate a SWATH-MS high-resolution mass spectral library of all HSA peptides. Tryptic digests of another set of serum samples were then analyzed using data-independent acquisition (DIA) mode to confirm the presence of HSA isoforms and their modification sites.

TD detected 15 isoforms corresponding to various modifications, including glycation, cysteinylolation, nitrosylation, and oxidation (di- and tri-). In BU, the spectral library containing 127 peptides allowed for the characterization of the important isoforms with their modified sites, including some modifications that were only characterized in BU (carbamylation, deamidation, and amino-acid substitution). The method used for determining isoforms offered acceptable reproducibility (intra-/inter-assay CVs < 15%) for all isoforms present at relative abundances higher than 2%.

Overall, the study found that several isoforms could be missed or misidentified by TD. However, all HSA isoforms identified by TD and reported to be relevant in liver dysfunctions were confirmed by BU. This critical evaluation of TD approach helped design an adequate and reliable method for the characterization of HSA isoforms in patients and offers the possibility to estimate isoform abundances within 3 min. These findings have significant implications for the diagnosis and treatment of liver dysfunctions.

1. Introduction

Human serum albumin (HSA) is the most abundant protein in blood serum representing more than half of the total protein content. In addition to its oncotic property, HSA exerts several physiological functions such as binding, transport and detoxification of endogenous and

exogenous molecules. HSA is also the main circulating antioxidant and it modulates immune and inflammatory responses[1]. Despite its highly conserved characteristics/features in humans, HSA undergoes several structural and chemical modifications including truncation [2,3], acetylation [4], cysteinylolation [5,6], homocysteinylolation [7], glycation [8], nitrosylation [9], oxidation [10] and dimerization [11,12]. These

* Corresponding author at: Pharmacology-Toxicology and Pharmacovigilance Department, Centre de Biologie et de Recherche en Santé (CBRS), 2, av. Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France.

E-mail address: souleiman.elbalkhi@chu-limoges.fr (S. El Balkhi).

¹ Mohamad-Ali RAHALI & Roy LAKIS have contributed equally in this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123740>

Received 25 March 2023; Received in revised form 3 May 2023; Accepted 5 May 2023

Available online 9 May 2023

1570-0232/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

modifications, often called micro-heterogeneity or post-translational modifications (PTM), lead to the apparition of isoforms, also called proteoforms [13]. Among these, the most studied are those characterized based on the redox state of cysteine 34 (Cys34) where: (i) Human mercaptalbumin (HMA) is the reduced and most abundant form, representing 70–80% of total albumin in healthy subjects, (ii) Non-mercaptalbumin 1 (HNA1) is the reversibly oxidized form (20–30%) and (iii) Nonmercaptalbumin 2 (HNA2) is the irreversible oxidized form of albumin (<5%) [2].

The structural modifications of HSA have been proposed very recently as promising biomarker candidates for the diagnosis and the monitoring of advanced hepatic diseases [11,14–18]. Some studies have demonstrated that the determination of certain isoforms is of interest in diabetes and in chronic kidney disease [19–21], but there is now a bundle of proofs showing the growing interest of the identification and quantification of HSA isoforms for liver diseases. For example, a progressive increase in HNA1 and HNA2 was observed in patients with severe cirrhosis and was well correlated to short-term mortality [10,16]. Structural alterations involving other sites have also been reported in liver diseases. The N- or C-terminal truncated isoforms, as well as the glycosylated isoforms have been found to be increased in patients with acute decompensated cirrhosis or diagnosed with severe alcoholic hepatitis [16]. Very recently, in a large observational study, Baldassarre M. et al. provided evidence that “effective HSA” (the non-modified HSA) is more associated with disease severity and liver dysfunction and has greater prognostic power in patients with decompensated cirrhosis than “total albumin” measured with conventional methods [14]. Interestingly, the presence of certain isoforms seems to exert a pejorative role in the evolution of liver diseases. It is the case for HNA1 in patients with decompensated cirrhosis [22], while native HSA has probably a protective role by reducing the pro-inflammatory environment present in acute decompensated cirrhosis [10]. At present, it is not fully established whether other albumin isoforms are, either mostly inactive, or have biological properties not characterized yet.

In the above-mentioned works, HSA isoforms were identified through the determination of their molecular weight after “deconvolution” of their high-resolution MS spectra, acquired mostly using LC-quadrupole time-of-flight (QTOF) instruments. This analytical strategy, which can be seen as a simplified top-down analysis, consists in a direct injection of diluted serum into the LC-MS system [23]. It has the advantage of preserving the structural and chemical modifications of interest of the native protein form.

The identification of these modifications is based on characteristic mass shift(s) observed in the deconvoluted MS spectrum, between the modified and unmodified forms, corresponding to the mass of the specific modification (e.g., a 162-Da mass difference in case of glycation). However, this strategy is not perfectly specific to the nature of the modification, nor informative about its site on the protein. Moreover, deviations of 1–5 Da are often observed between the theoretical and the experimental mass of native HSA [24]. To better characterize the structural modifications and confirm the presence of isoforms of interest, it is crucial to perform a bottom-up analysis of HSA modifications. Although it requires a long and tedious enzymatic digestion and long optimization of the sample preparation steps, it allows a more efficient determination of the nature and the site of the structural modifications [25]. Yet, the top-down approach has been favored to study HSA modifications without precisely confirming the presence of these PTMs. Surprisingly, only very few studies have used both analytical approaches but focused exclusively on oxidative modifications or glycation [6,16,18].

Thus, the aim of this work was to critically evaluate the specificity of HSA isoforms characterization and the reliability of their determination by a top-down approach. Therefore, an inclusive bottom-up approach was used to validate the characterization of all albumin PTM in liver disease patients and intra/inter assays were performed for the determination of the detected isoforms. The study was performed using

electrospray ionization (ESI) high resolution quadrupole - time-of-flight mass spectrometry (QTOF). In parallel, to identify and localize putative PTM, different bottom-up analyses were applied to digested serum samples with untargeted data acquisition mode. These combined approaches aimed to comprehensively inventory the PTM of HSA that can be obtained by each analytical approach and to validate the top-down strategy.

2. Material and methods

2.1. Patients

Serum samples from two control subjects (without hepatic impairment) and four patients with different degrees of liver dysfunctions (Supplemental Table I), who did not object to the use of leftovers of their biological materials, were obtained from blood samples collected in dry tube and sent to the laboratory for routine care, after routine analyses had been carried out.

2.2. Proteomic analysis of the serum Samples

2.2.1. Top-down approach

For the top-down approach (Fig. 1A), 50-times diluted serum samples were analyzed by flow-injection into a Nexera LC40 system (Shimadzu, Noisiel, France) and acquisition in the positive TOF-MS mode, using a Sciex TripleTOF® 5600 + system.

The high-resolution spectra were then deconvoluted using PeakView® 2.2 software and its Bio Tool Kit 2.2.0 feature (Sciex) with the following parameters: input m/z range from 1,350 to 1,650 Da with a resolution of 5,000; output mass range from 1,000 to 200,000.

To clarify in details the deconvolution process, it is important to specify that mass spectrometry generates a complex multiple charge spectrum when a sample is ionized and the resulting ions are separated by their mass-to-charge ratio (m/z). This produces a signal with overlapping peaks that represent different ions with similar masses and different charges. The process of deconvolution involves applying a mathematical algorithm to the complex multi-charge spectrum, which separates the overlapping peaks and identifies the individual components. By converting the complex mass spectrum of all multiple charge states of the same protein form into a single mass value of the neutral molecule, deconvolution greatly simplifies the mass spectrum of larger proteins. In our study, we applied deconvolution to the complex multi-charged spectrum of albumin, which resulted in a zero charge mass spectrum representing the various isoforms present in albumin between 66,000 and 67,500 Da. The mass difference between each peak corresponds to a distinct isoform.

2.2.2. Bottom-up approach

Serum extracts were obtained after reduction alone, alkylation alone or reduction and alkylation, followed by tryptic digestion and solid-phase extraction of the digest of 100 µg of serum sample.

Each sample was subjected to data-dependent acquisition (DDA) then compared by ProteinPilot 5.0.1 (Sciex) software using the Paragon algorithm to an in-house database containing HSA sequence without peptide signal and its known truncated variants with the following parameters: search effort, thorough; Cys alkylation: none or iodoacetamide; ID focus, biological modifications. The result of this search led to the building of a reference spectral library containing all the validated peptides, carrying or not PTM.

Then, the samples were subjected to Sequential Window Acquisition of all theoretical fragment ion spectra (SWATH)-MS, a label-free quantification approach based on a data-independent acquisition (DIA) strategy, using different SWATH windows over a range of 300 to 1,250 m/z . Spectral alignment and targeted data extraction from DIA samples was performed using MultiQuant 3.0.1 (Sciex) with a resolution of 40,000 (Fig. 1B).

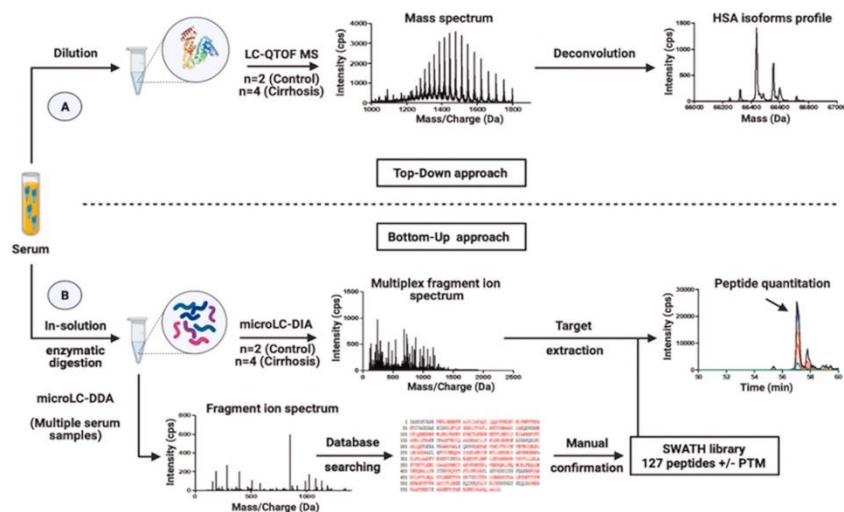


Fig. 1. Experimental workflow of proteomics strategies for the characterization of albumin isoforms (A) Diluted serum is injected directly to obtain the multicharged spectrum of HSA which is deconvoluted to identify the profile of the different HSA isoforms by LC-QTOF-MS. (B) Tryptic digests of multiple serum samples were analyzed by DDA, followed by database searching and manual confirmation, to generate a SWATH-MS HSA spectral library. Tryptic digests of 6 serum samples (2 controls and 4 patients) were analyzed by DIA to confirm the presence of HSA isoforms and their modification sites.

Detailed sample preparation, chromatographic separation and MS acquisition conditions for both top-down and bottom-up methods are described in the [supplementary materials](#).

2.2.3. Isoforms determination, reproducibility and replicability

After deconvolution of HR spectra, relative quantitation analysis of albumin isoform proportions by using a code developed on R software based on trapezoidal integration; the integrated peak area of each

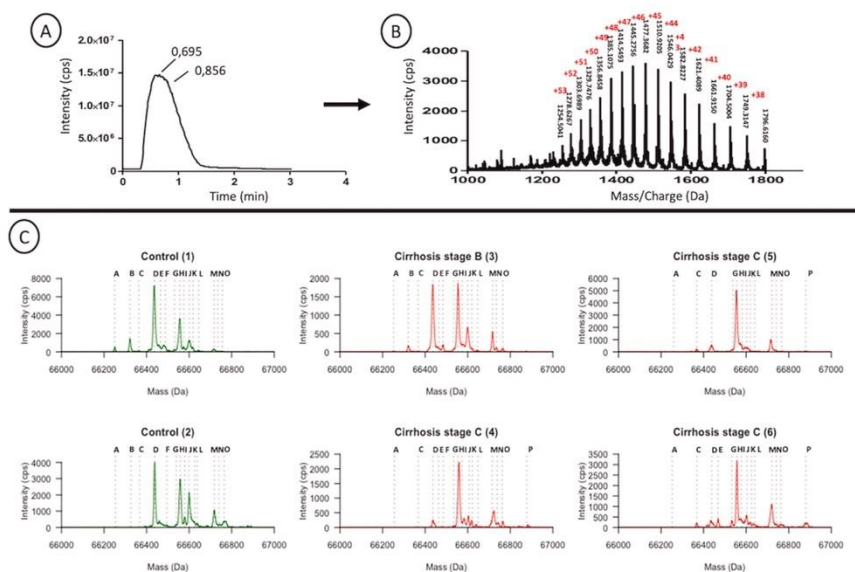


Fig. 2. (A) LC-ESI-MS total ion chromatogram of HSA. (B) Multi-charged mass spectrum acquired on peak apex eluting at 0.7 min and identified as HSA by LC-QTOF-MS. (C) Deconvoluted ESI-MS spectra of HSA and its isoforms from 2 control subjects (green) and 4 cirrhotic patients (red). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

isoform was computed to determine its relative abundance. The abundance of each isoform was defined as the area of each isoform peak over the summed surface area of all the peaks present between 66000 and 67500 Da. HSA isoforms were determined to evaluate replicability and reproducibility in three different patient serums: a control patient (CT), a patient having Child-Pugh score B cirrhosis (CB) and a patient with a Child-Pugh C score cirrhosis (CC). The total albumin concentrations for these patients were 45.9, 28.9 and 24.7 g/L, respectively. The replicability of the method was evaluated by analyzing six different measurements of 6 different preparations of a same sample during the same day. As for the reproducibility, three different measurements of three different preparations of a same sample were measured on two different days. Data were expressed as mean and coefficient of variation ($n = 6$, day 1; $n = 3$, day 2; $n = 3$, day 3).

3. Results

3.1. Top-down strategy

Direct injection of diluted serum samples into the LC-QTOF-MS generates a peak corresponding to HSA and its isoforms in the positive mode (Fig. 2A). The ESI multicharged mass spectrum (Fig. 2B) showed an ion distribution from $[M + 53H]^{53+}$ to $[M + 38H]^{38+}$.

The deconvoluted mass spectrum of HSA, obtained using PeakView® 2.2 software (depicted in Fig. 2C), shows the presence of several isoforms of HSA between 66,000 and 67,000 Da. The peak at 66,438 Da (identified with the letter D in Fig. 2C and in Table 1) corresponds to the native HSA form with its 17 disulfide bonds (theoretical molecular weight of 66,437.94 Da). The other peaks (also coded by a letter in Fig. 2C) are characterized by their difference with the molecular weight of native HSA leading to potential identification of PTM (Table 1).

We identified 15 isoforms in addition to the native isoform. The main modifications corresponded to glycation, cysteinylolation, nitrosylation and oxidation (di- and tri-) detected alone or in combination. We also identified truncated isoforms at the N-terminal end (peak A) and at the C-terminal end (peak B). The peaks identified covered more than 95% of the total area surface of the peaks in the HSA deconvolution spectrum over the considered mass range (Table 2).

3.2. Bottom-up strategy

A spectral library containing a total of 127 peptides, covering 84.1% of the HSA sequence, was built after DDA of multiple tryptic samples prepared in various conditions of reduction/alkylation, with the aim of generating a specific SWATH-MS acquisition method (Supplemental Table III). Among the 127 identified peptides, 35 were not carrying any PTM, 43 were identified only in reduction/alkylation conditions when disulfide bonds were cleaved (and blocked) and 66 peptides were carrying PTM other than cysteine carbamidomethylation (Supplemental Figure S1).

We were able to detect the presence of 12 PTM categories in HSA: (1) cysteinylolation (addition of cysteine to Cys34), (2) di-oxidation (3), cysteine tri-oxidation (4) truncation of the protein end (loss of leucine at the C-terminal), (5) glycation, (6) acetylation, (7) conversion of a cysteine to dehydroalanine, (8) oxidation, (9) carbamylation, (10) deamidation, (11) nitration and (12) amino-acid substitution (Table 3).

3.3. Confrontation of results obtained with the two proteomics strategies

The 6 serum samples selected for the top-down approach were analyzed using the SWATH-MS method after tryptic digestion. Firstly, characteristic fragments of the selected peptides of HSA were extracted to confirm the presence of the different modifications in HSA, then to confirm the potential isoforms identified with the top-down approach (Table 4). From the detected HSA PTM, 10 out of the 15 potential isoforms identified with the top-down strategy were confirmed (Table 4). The relative proportion of the peak areas of these 10 confirmed isoforms in control and cirrhotic patients are reported in Fig. 3A.

The influence of cysteinylolation on Cys34, proposed as a sensitive marker in advanced chronic liver disease [6], was investigated using SWATH-MS analysis. Characteristic fragments described in the SWATH library of the modifications observed on Cys34 (i.e. cysteinylolation and carbamidomethylation), were monitored in control and cirrhotic patients and showed an important increase of cycteinylation over carbamidomethylation in patients with cirrhosis C (Fig. 3B).

3.4. Isoforms determination and method accuracy

The interday and intraday assays performed on a control patients and 2 other cirrhotic patients shown in tables 5, 6 and 7 indicate an

Table 1
HSA isoforms identified and quantified using the top-down strategy. *Calculation of the median of delta mass between the detected isoforms and native HSA for the 6 patient serum samples. Minimum and maximum mass difference values in brackets.

Peak	Theoretical Mass	Theoretical delta mass	Experimental delta differences*	Potential modifications	Identified isoforms
A	66,252	-186.0	-183.9 [-186.0; -177.8]	Truncation at N-terminal end	HSA-DA
B	66,325	-113.0	-114.5 [-114.7; -111.5]	Truncation at C-terminal end	HSA-L
C	66,371	-67.0	-70.0 [-72.7; -68.5]	Cysteinylolation with	HSA + Cys-DA
D	66,438	0.0	0.0	Truncation at N terminal end	Native HSA
E	66,467	+29.0	+29.1 [+28.8; +29.8]	None	HSA + NO
F	66,486	+48.0	+50.1 [+36.8; +51.2]	Nitrosylation	HSA + 3Ox
G	66,534	+96.0	+98.8 [+94.5; +101.0]	Oxidation (x3)	HSA + 2(3Ox)
H	66,557	+119.0	+119.0 [+117.0; +120.0]	Oxidation (x6)	HSA + Cys
I	66,573	+135.0	+139.8 [+136.5; +144.0]	Cysteinylolation	HSA + Cys + 1Ox
J	66,600	+162.0	+164.6 [+161.8; +169.8]	Oxidation	HSA + Glyc
K	66,616	+178.0	+184.3 [+181.0; +188.0]	Glycation	HSA + Glyc + 1Ox
L	66,648	+210.0	+205.6 [+200.8; +211.0]	Glycation	HSA + Glyc + 3Ox
M	66,719	+281.0	+281.5 [+278.8; +283.5]	Oxidation (x3)	HSA + Cys + Glyc
N	66,743	+305.0	+302.6 [+298.3; +304.5]	Cysteinylolation	HSA + GSH
O	66,762	+324.0	+325.9 [318.8; 329.3]	Glycation	HSA + 2Glyc
P	66,881	+443.0	+442.0 [440.8; 442.3]	Glutathionylation	HSA + Cys + 2Glyc
				CysteinylolationGlycation (x2)	

Table 2
Quantification of HSA isoforms by relative intensity in the top-down approach.

Isoforms	Mass (Da)	MD	Control (1)			Control (2)			Cirrhosis B (3)			Cirrhosis C (4)			Cirrhosis C (5)			Cirrhosis C (6)		
			AUC	RI (%)	AUC	RI (%)	AUC	RI (%)	AUC	RI (%)	AUC	RI (%)	AUC	RI (%)	AUC	RI (%)	AUC	RI (%)	AUC	RI (%)
A HSA-DA	66250.5	-186	0.41	1.63	0.01	0.03	0.04	0.17	0.04	0.03	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.00	0.00	0.02	0.00
B HSA-L	66321.8	-115	1.51	6.06	0.01	0.06	0.62	2.48	0.62	0.06	0.01	0.43	0.01	1.71	0.01	0.05	0.45	0.45	1.82	0.05
C HSA + Cys-DA	66363.8	-73	0.12	0.5	0.01	0.03	0.06	0.22	0.06	0.03	0.03	0.22	0.03	0.22	0.03	0.05	0.45	0.45	1.82	0.05
D HSA Native	66436.5	0	10.09	40.35	6.13	24.54	8.00	32.02	8.00	24.54	7.54	32.02	7.54	32.02	7.54	5.57	1.42	1.09	5.67	1.42
E HSA + NO	66465.3	29	1.06	4.24	0.00	0.00	0.69	2.76	0.69	0.00	0.07	0.07	0.07	0.28	0.07	0.07	1.09	1.09	4.38	0.07
F HSA + 3Ox	66487.8	51	1.5	6.01	0.3	1.2	0.67	2.66	0.67	0.03	0.12	0.03	0.12	0.03	0.12	0.03	1.09	1.09	4.38	0.03
G HSA + 2(3Ox)	66521.0	95	0.3	1.21	0.29	1.16	0.22	0.89	0.22	0.03	0.03	0.03	0.03	0.12	0.03	0.03	0.03	0.03	3.4	0.03
H HSA + Cys	66535.3	119	4.99	19.97	5.9	23.61	7.41	29.65	7.41	23.61	14.11	29.65	14.11	56.46	11.84	47.37	8.06	32.24	6.98	8.06
I HSA + Cys + 1Ox	66574.0	138	0.65	2.61	1.00	3.99	1.02	4.1	1.02	3.99	1.85	4.1	1.85	7.4	1.72	6.87	1.74	6.87	6.98	1.74
J HSA + Glyc	66600.8	164	2.44	9.75	4.38	17.52	3.29	13.16	3.29	17.52	0.94	3.29	0.94	3.77	1.73	6.93	2.2	6.93	8.81	2.2
K HSA + Glyc + Ox1	66618.5	182	0.41	1.66	0.57	2.28	0.33	1.32	0.33	1.32	0.27	0.27	0.27	1.07	0.91	3.62	0.74	3.62	2.95	0.74
L HSA + Glyc + 3Ox	66644.8	208	0.19	0.75	0.35	1.42	0.15	0.62	0.15	0.62	0.07	0.07	0.07	0.26	0.37	1.47	0.71	1.47	2.83	0.71
M HSA + Cys + Glyc	66718.0	282	0.47	1.86	2.2	8.79	1.64	6.56	1.64	8.79	2.91	6.56	2.91	11.64	3.98	15.93	4.47	15.93	17.88	4.47
N HSA + GSH	66734.8	298	0.07	0.3	0.37	1.46	0.38	1.5	0.38	1.46	0.33	1.33	0.33	1.33	0.87	3.47	0.59	3.47	2.34	0.59
O HSA + 2Glyc	66755.3	319	0.05	0.21	1.36	5.46	0.34	1.34	0.34	5.46	0.16	0.16	0.16	0.62	0.84	3.35	0.48	3.35	1.94	0.48
P HSA + Cys + 2Glyc	66755.3	319	0.05	0.21	1.36	5.46	0.34	1.34	0.34	5.46	0.16	0.16	0.16	0.62	0.84	3.35	0.48	3.35	1.94	0.48
Total spectrum			25	100	25	100	25	100	25	100	25	100	25	100	25	100	25	100	25	100
Total isoforms			24	97	23	92	25	99	25	99	24	95	24	97	24	97	24	97	24	96

MD: mass difference; AUC: peak area; RI: relative intensity.

5

Table 3

Categories of HSA chemical modification identified by DDA analysis. All MS/MS parameters used to characterize HSA PTM are available in Supplemental Data.

Chemical modification	Modified site
Acetylation	Lys199, Lys525
C-terminal truncation	ΔLeu585
Carbamylation	Lys12, Arg485, Lys525
Cysteinylation	Cys34, Cys177
Dehydroalanine (from cysteine)	Cys75, Cys168, Cys169, Cys177, Cys278, Cys392, Cys476, Cys477, Cys487
Deamidation	Asn44, Gln170, Gln204, Gln268, Gln285, Asn286, Gln404, Asn205, Gln417, Asn458, Gln526, Gln580
Di-oxidation	Cys169, Trp214, Cys279, Cys477, Met548
Glycation	Lys233, Lys525
Nitration	Tyr140
Oxidation	Phe49, Met123, Tyr138, Tyr140, Trp214, Phe228, Met298, Met329, Tyr341, Phe403, Met548
Tri-oxidation	Cys75, Cys487
Amino-acid substitution	Gln94, Gln390, Gln526
Gln->pyro-Glu	

acceptable reproducibility of the method for isoforms present at relative abundances higher than 2.5%. The only exceptions were 2 glycosylated isoforms present in cirrhotic patients that are HSA + 2GLYC and HSA + CYS + 3GLYC.

4. Discussion

A simple, reliable and robust method is needed to characterize the most relevant isoforms of HSA in a timely and comprehensive manner, especially in liver diseases. There is currently a growing interest in developing simple analytical methods that can be implemented in routine lab settings; several teams used top-down high-resolution mass spectrometry methods and demonstrated the value of HSA isoforms as promising biomarker candidates in liver diseases [3,14,16,18]. The fact that the identification of isoforms is currently performed based on characteristic mass shifts after deconvolution of HSA signal entails a risk of misidentification. For instance, several peaks can be observed between the masses of native HSA and cysteinylated HSA (HSA + Cys). Their identification is challenging because they are present at low intensity and because peak resolution and mass precision associated with deconvolution process can give unsatisfactory results probably due to mass deviations (around 1–5 Da [24]). The existence of PTM with close masses, such as acetylation (+42.0 Da), carbamylation (+43.0 Da), nitrosylation (+29.0 Da) or tri-oxidation (+48.0 Da) adds to identification uncertainty. Moreover, the potential isoforms with a mass higher than HSA + Cys (66,555.3 Da) represent mostly combinations of 1 to 3 modifications, which also complicates the identification. To the best of our knowledge, the confrontation of top-down and bottom up approaches performed on the same samples has not been reported yet especially for HSA-PTMs. Dong Q. et al., have created a mass spectral library for identifiable HSA peptides but did not focus on PTMs [26]. More recently, Kannan S. et al. have listed all HAS-PTMs reported in literature but most of these PTMs are issue from in vitro induced chemical reactions and may not exist in blood, at least at significant concentration [27]. Therefore, in this work, we have proposed to critically evaluate top-down analysis for the characterization of HSA isoforms in patients with or without liver dysfunctions. To confirm the existence of the identified isoforms, we have developed a bottom-up approach via SWATH-MS peptide analysis. To achieve exhaustive PTM identification, we have submitted our serum samples to either reduction, or alkylation, or reduction and alkylation, followed by tryptic digestion. Although this process is unusual, it has the advantage of uncovering PTM that may be masked by the reduction or alkylation process (such as carbamidomethylation) and it allows confirmation of PTM when detected in all three extract types. Our SWATH-MS library, containing 127 peptides, was generated after DDA analysis of these multiple tryptic

Table 4

Concordance of the results obtained between the top-down and bottom-up approaches in all patients. (+) confirmation; (empty) not identified.

Isoforms	Chemical modification	Modified site	Top-down	Bottom-up	Reference(s)
HSA-DA	Truncation	Δ (Asp1-Ala2)	+		Brennan <i>et al.</i> , 2000; Bar-Or <i>et al.</i> , 2006; Domenicali <i>et al.</i> , 2014
HSA-L	Truncation	ΔLeu585	+	+	Brennan <i>et al.</i> , 2000; Fanali <i>et al.</i> , 2012; Domenicali <i>et al.</i> , 2014
HSA + Cys-DA	Truncation Cysteinylation	Δ(Asp1-Ala2) Cys 34	+		Domenicali <i>et al.</i> , 2014; Alcaraz-Quiles <i>et al.</i> , 2018
HSA-DHA	Conversion in dehydroalanine	Cys487		+	Bar-Or <i>et al.</i> , 2008; Alcaraz-Quiles <i>et al.</i> , 2018
HSA + NO	Nitrosylation	Cys34 or Cys410	+		Ishima <i>et al.</i> , 2008
HSA + CRM	Carbamylation	Lys525		+	Berg <i>et al.</i> , 2013; Lenglet <i>et al.</i> , 2021
HSA + 2Ox	Di-oxidation	Cys169, Cys279, Cys477 or Trp214		+	Fanali <i>et al.</i> , 2012; Bertozzi <i>et al.</i> , 2018
HSA + 3Ox	Tri-oxidation	Cys487	+	+	Paramasivan <i>et al.</i> , 2020
HSA + Cys-DHA	Cysteinylation	Cys34		+	Bar-Or <i>et al.</i> , 2008; Alcaraz-Quiles <i>et al.</i> , 2018
HSA + 2 (3Ox)	Tri-oxidation (x2)	Cys35 and Cys487	+		–
HSA + Cys	Cysteinylation	Cys34	+	+	Kleinova <i>et al.</i> , 2005; Nagumo <i>et al.</i> , 2014; Domenicali <i>et al.</i> , 2014
HSA + Cys + 1Ox	Cysteinylation Oxidation	Cys34 Cys169, Cys279, Cys477	+	+	–
HSA + Glyc	Glycation	Lys233 or Lys525	+	+	Rondeau <i>et al.</i> , 2011; Domenicali <i>et al.</i> , 2014; Kumari <i>et al.</i> , 2021
HSA + Glyc + 1Ox	Oxidation Glycation	Cys169, Cys279, Cys477 Lys233 or Lys525	+	+	–
HSA + Glyc + 3Ox	Tri-oxidation Glycation	Cys487 Lys233 or Lys525	+	+	Alcaraz-Quiles <i>et al.</i> , 2018
HSA + Cys + Glyc	Cysteinylation Glycation	Cys34 Lys233 or Lys525	+	+	Alcaraz-Quiles <i>et al.</i> , 2018; Rondeau <i>et al.</i> , 2011
HSA + GSH	Glutathionylation	–	+		Turell <i>et al.</i> , 2014
HSA + 2Glyc	Glycation (x2)	Lys233 or Lys525	+	+	Alcaraz-Quiles <i>et al.</i> , 2018

Table 4 (continued)

Isoforms	Chemical modification	Modified site	Top-down	Bottom-up	Reference(s)
HSA + Cys + 2Glyc	Cysteinylation Glycation (x2)	Cys34 Lys233 and Lys525 Cys487	+	+	2018; Kumari <i>et al.</i> , 2021 Alcaraz-Quiles <i>et al.</i> , 2018
	Conversion in dehydroalanine				

digested serum samples from healthy subjects and from patients with various liver pathologies in order to cover the most common PTMs of albumin in liver diseases patients (Fig. 2A and Table 3).

The analysis of HSA by a top-down approach to identify its isoforms as described here is feasible thanks to its physiological and physico-chemical properties. The HSA concentration is so large (around 40 g/L) that a minor fraction change of only 0.1% gives an isoform at a concentration of 40 mg/L, which is more than enough to be detected by high resolution mass spectrometry. HSA represents 60% to 65% of total plasma proteins, which greatly reduces potential interference from other proteins. HSA has a long half-life (about 20 days) allowing relatively long-term follow-up. Large amounts are synthesized in the liver (10–15 g/day: 3.5% of the total HSA pool) and released into the intravascular space (30% to 40% of the total HSA). The rate of transfer of HSA from the intravascular space to the interstitial space is 4% to 5% per hour, and about the same percentage is returned to the intravascular space via the lymphatic system. Since changes in HSA contribute to the micro-heterogeneity of circulating HSA and can alter its biological activity under pathological conditions, it is now clear that not only its quantitative variation but also HSA PTMs serve as an indicator [28].

With our top-down analysis, we were able to identify 15 potential HSA isoforms, listed in Table 1 and 2. Most of these were identified by a similar top-down approaches (Table 4) [2,5,6,9,16,19,29–38]. Among these isoforms, several were reported to be of clinical relevance in advanced chronic liver diseases. The native HSA level in chronic hepatitis and cirrhosis was associated with disease progression and was found to be significantly correlated with the model for end-stage liver disease [14]. The increase of HSA + Cys (HNA1) was associated with chronic liver disease severity, in correlation to Child-Pugh classification [5]. HSA irreversibly oxidized isoforms (HNA2) were proposed as novel biomarkers of advanced chronic liver diseases such as acute liver failure [39]. The degree of oxidation of HSA (HSA + 2Ox and HSA + 3Ox) increased with severity of liver failure, whereas native HSA was significantly decreased in cirrhosis and acute-on-chronic liver failure [10,40]. Finally, in addition to decreased native HSA and increased HNA1 in cirrhosis, Domenicali *et al.* showed that HSA + Cys-DA, HSA + Cys + Glyc and glycosylated HSA + Glyc forms were increased. Other isoforms with unknown links with liver functions were also detected using top-down analysis, such as HSA-L and HSA + GSH [38,41].

Among the 15 isoforms identified by TD, bottom-up analysis enabled us to confirm the existence of 10 isoforms with specifications on the modification sites: HSA + Cys, HSA + 3Ox, HSA + Glyc, HSA + Cys + 1Ox, HSA + 1Ox + Glyc, HSA + 3Ox + Glyc, HSA + Cys + Glyc, HSA + 2Glyc, HSA + Cys + 2Glyc, HSA-L (Table 4). The confrontation of these results shows that all the isoforms identified with top-down, and reported to have a clinical interest, are confirmed by bottom-up analysis and are not likely to be artefacts.

However, the top-down approach did not detect any isoform due to carbamylation, conversion of cysteine into dehydroalanine or HSA dimerization, all of which were well characterized by bottom-up analysis. Several modifications can lead to close mass shifts, which renders the identification of carbamylation difficult. The characterization of this modification, resulting from an excess of urea and proposed as a death risk indicator in end-stage renal disease [19], can only be observed after

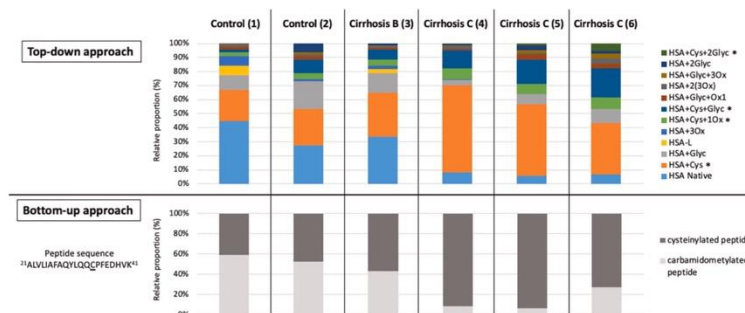


Fig. 3. Relative proportions of the peak areas of: (A) the isoforms confirmed in control patients and cirrhotic patients by top-down analysis. (B) the cysteinylated and carbamidomethylated peptides corresponding to all HSA + Cys isoforms labelled with * in (A) in control patients and cirrhotic patients after tryptic digestion.

Table 5

Inter and intraday assays performed in a serum of a control patient.

Isoforms	Isoform mass range	Interday		Intraday	
		Mean relative abundance%	CV	Mean relative abundance%	CV
HSA-DA	[66251.75–66254.75]	0,06	80%	0,11	69%
HSA-DHA	[66412.25–66417.25]	0,78	20%	0,65	21%
Native	[66436.25–66437.75]	27,27	4%	26,73	7%
HSA + NO	[66462.5–66463]	2,26	33%	2,30	16%
HSA + 3OX	[66477.25–66487.25]	4,11	10%	3,85	13%
HSA + CYS	[66554.5–66557.25]	15,86	9%	15,81	9%
HSA + CYS + 1OX	[66572–66576.25]	3,83	18%	3,58	18%
HSA + GLYC	[66598.75–66600.5]	16,83	5%	16,66	6%
HSA + GLYC + 1OX	[66617.25–66624.75]	3,84	20%	4,62	18%
HSA + Glyc + SO ₂ H	[66638–66652.25]	1,75	27%	1,99	32%
HSA + CYS + GLYC	[66716.75–66720.55]	9,19	8%	8,99	12%
HSA + 2GLYC	[66759.5–66763.25]	5,15	9%	4,72	15%
HSA + CYS + 2GLYC	[66878.25–66884.5]	0,46	64%	0,74	47%

Control patient: Protein: 74.4 mg/mL; Albumin: 45.9 mg/mL. Bold are isoforms that are present at percentages higher than 2.5%. CVs are lower than 20% for these also.

Table 6

Inter and intraday assays performed in a serum of a patient with cirrhosis classified as a Child B.

	isoform mass range	Interday n = 6		Intraday n = 6	
		Mean relative abundance%	CV	Mean relative abundance%	CV
Native	[66438.5–66441]	2,87	8,0%	3,22	7%
HSA + NO/SO ₂ H	[66462.25–66475.75]	0,04	80,1%	0,07	45%
HSA + 3OX	[66478.5–66485.5]	0,08	66,1%	0,09	46%
HSA + 2(3OX)/Cys-DHA	[66531.75–66536]	1,62	24,0%	1,53	17%
HSA + CYS	[66555.5–66557]	26,42	6,8%	26,65	5%
HSA + CYS + 1OX	[66573.5–66579.5]	4,85	16,9%	5,06	19%
HSA + GLYC	[66597–66603.5]	8,21	25,3%	8,19	13%
HSA + Glyc + 2OX	[66618.5–66629.75]	2,31	14,2%	2,43	35%
HSA + Glyc + 3OX	[66631–66643.25]	1,05	19,7%	1,39	31%
HSA + Cys + GLYC-DHA	[66692.75–66699.25]	1,54	32,4%	1,68	26%
HSA + CYS + GLYC	[66718–66721]	20,48	4,3%	19,44	5%
HSA + GSH	[66733.5–66739.75]	4,63	19,1%	4,43	12%
HSA + 2GLYC	[66761.5–66771]	3,99	20,9%	2,99	41%
HSA + SO ₂ H + 2GLYC	[66791.25–66800]	0,82	51,2%	1,13	40%
HSA + Cys + 2GLYC-DHA	[66850.75–66860.5]	1,43	28,0%	2,56	23%
HSA + Cys + 2Glyc	[66877–66883.25]	8,29	15,6%	7,28	17%
HSA + 3GLYC	[66915–66927.75]	1,09	42,2%	1,13	35%
HSA + CYS + 3GLYC	[67039.25–67047.75]	0,21	39,7%	0,21	88%

Protein: 73.4 mg/mL; Albumin: 28.9 mg/mL. Bold are isoforms that are present at percentages higher than 2.5%. CVs are lower than 20% for these also.

** HSA-2GLYC relative abundance was higher than 2.5% but CVs were high.

digestion of the protein [35]. Conversion of Cys487 to DHA was first identified in healthy patients by Bar-Or *et al.*, and has not shown any clinical relevance so far [31]. Nonetheless, it is very unlikely to observe this PTM without enzymatic digestion because it is involved in a disulphide bond with Cys476. According to Naldi *et al.*, the dimerization of

HSA would be of clinical interest in the diagnosis of cirrhosis [12]. However, great care must be taken when interpreting the data related to dimerization due to the very low intensity of the dimers and the potential artefactual dimers generated by the deconvolution process. A separation by size-exclusion chromatography (SEC) would be necessary

Table 7
Inter and intraday assays performed in a serum of a patient with cirrhosis classified as a Child C.

Isoforms	Isoform mass range	Interday Mean relative abundance%	CV	Intraday Mean relative abundance%	CV
Native	[66438.25–66440.25]	4,82	10%	5,31	17%
HSA + 3OX	[66481–66485.75]	0,30	24%	0,50	40%
HSA + 2(3OX)	[66531–66536.75]	0,59	35%	0,67	48%
HSA + CYS	[66555.25–66559]	9,60	7%	10,90	15%
HSA + GLYC	[66599.5–66601.75]	13,19	7%	13,38	8%
HSA + Glyc + 2Ox	[66617.75–66630]	2,50	30%	3,13	17%
HSA + Cys + GLYC-DHA	[66685.75–66699.5]	1,40	21%	1,77	38%
HSA + CYS + GLYC	[66718–66719.75]	16,99	11%	16,50	9%
HSA + 2GLYC	[66760.25–66764.75]	9,93	10%	11,62	11%
HSA + SO ₂ H + 2GLYC	[66788.25–66801.25]	2,53	33%	2,55	33%
HSA + Cys + 2GLYC-DHA	[66837.5–66852.75]	0,72	40%	1,21	27%
HSA + Cys + 2Glyc	[66879.75–66883.5]	11,01	13%	10,88	16%
HSA + 3GLYC	[66921–66929]	4,13	13%	3,95	19%
^{**} HSA + CYS + 3GLYC	[67040.25–67045.5]	2,93	22%	2,98	27%

Child C patient: Protein: 62.8 mg/mL; Albumin: 24.7 mg/mL. Bold are isoforms that are present at percentages higher than 2.5%. CVs are lower than 20% for these also.

^{**} HSA + CYS + 3GLYC relative abundance was higher than 2.5% but CVs were high.

to properly discriminate them [42]. There are also other analytical methods such as two-dimensional electrophoresis under non-reducing conditions that could be used to verify the presence of dimers in patient samples.

Using bottom-up analysis, we could not confirm certain modifications related to the structure of the HSA, namely, truncations at the N-terminal level (HSA-DA and HSA + Cys-DA). The choice of the proteolytic enzyme to cleave HSA is key as the digested peptides are too small to be chromatographically separated after the loss of DA with trypsin (trypsin cuts at lysine 4). Yet, to the best of our knowledge, no paper has described this truncation using bottom-up analysis so far. Other enzymes with different cleavage sites could help to detect this truncation. However, attempts to use Glu-C that cleaves at either aspartic or glutamic acid residues were not successful because of lack of reproducibility (data not shown). Glutathionylation, detected in top-down analysis, is also difficult to separate chromatographically using the bottom-up strategy due to its physico-chemical properties.

The top-down method offers a significant advantage in characterizing intact isoforms of HSA and determining their relative proportions (Fig. 3) within a short analytical run of only 3 min and with minimal sample preparation. Moreover, the method shows acceptable inter- and intraday reproducibility for relative quantification of isoforms present at relative abundances lower than 2%. However, caution should be taken when quantifying isoforms in patients with very low concentrations of HSA, as the accuracy may be compromised. Bottom-up HRMS analysis of HSA is informative, but is losing ground due to the time and labor needed for protein digestion, sample preparation and data reprocessing. The need for reducing and alkylating agents that affect the integrity of HSA is another drawback. Data interpretation after bottom-up analysis is also delicate since artefactual chemical modifications may be produced during the procedure, such as methionine oxidation or the conversion of a cysteine into dehydroalanine [31]. Additionally, the variability in the ionization of each peptide (modified or not) greatly impacts the MS information and the same PTM can be carried by several isoforms (Fig. 3). These two last phenomena renders very tricky the characterization of the most complex and diverse HSA profiles. Our SWATH library constitutes an important database that can be completed with supplementary data obtained after HSA digestion by enzymes other than trypsin in order to cover the N-terminal end of the HSA sequence and to detect other PTM [23]. This could also allow detecting PTM on lysine, such as acetylation, carbamylation and glycation that cannot be efficiently cleaved with trypsin.

5. Conclusion

Top-down analysis can be considered as an “all-in-one” approach where all isoforms can be observed in a single 3-minute run with their relative proportions, provided they are correctly identified. However, several isoforms could be missed or misidentified by TD but as the most clinically significant isoforms known to date are detected with this simple and rapid approach, the simpler could be the better in clinical settings. To the best of our knowledge, the confrontation of top-down and bottom up approaches performed on the same samples has not been reported yet especially for HSA-PTMs. We believe that after optimization of several features, top-down can compete with bottom-up HRMS analysis and will be a method of choice for the investigation of PTM on proteins such as HSA in the context of clinical research.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

The authors thank the BISCEM technical platform at the University of Limoges (Limoges, France).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123740>.

References

- [1] G.J. Quinlan, G.S. Martin, T.W. Evans, Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential, *Hepatology* 41 (2005) 1211–1219.
- [2] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, Human serum albumin: From bench to bedside, *Mol. Aspects Med.* 33 (2012) 209–290.
- [3] M. Naldi, F.A. Giannone, M. Baldassarre, M. Domenicali, P. Caraceni, M. Bernardi, C. Bertucci, A Fast and Validated Mass Spectrometry Method for the Evaluation of Human Serum Albumin Structural Modifications in the Clinical Field, *Eur. J. Mass Spectrom.* 19 (2013) 491–496.
- [4] M.S. Liyasova, L.M. Schopfer, O. Lockridge, Reaction of human albumin with aspirin in vitro: Mass spectrometric identification of acetylated lysines 199, 402, 519, and 545, *Biochem. Pharmacol.* 79 (2010) 784–791.

- [5] R.H. Khan, K. Nagumo, M. Tanaka, V.T.G. Chuang, H. Setoyama, H. Watanabe, N. Yamada, K. Kubota, M. Tanaka, K. Matsushita, A. Yoshida, H. Jinnouchi, M. Anraku, D. Kadowaki, Y. Ishima, Y. Sasaki, M. Otagiri, T. Maruyama, Cys34-Cysteinylation Human Serum Albumin Is a Sensitive Plasma Marker in Oxidative Stress-Related Chronic Diseases, *PLoS One* 9 (2014).
- [6] M. Kleinova, O. Belgacem, K. Pock, A. Rizzi, A. Buchacher, G. Allmaier, Characterization of cysteinylolation of pharmaceutical-grade human serum albumin by electrospray ionization mass spectrometry and low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 2965–2973.
- [7] H. Jakubowski, New method for the determination of protein N-linked homocysteine, *Anal. Biochem.* 380 (2008) 257–261.
- [8] J. Anguizola, R. Matsuda, O.S. Barnaby, K.S. Hoy, C. Wa, E. DeBolt, M. Koke, D. S. Hage, Review: Glycation of human serum albumin, *Clin. Chim. Acta* 425 (2013) 64–76.
- [9] Y. Ishima, T. Akaiki, U. Kragh-Hansen, S. Hiroyama, T. Sawa, A. Suenaga, T. Maruyama, T. Kai, M. Otagiri, S-Nitrosylated Human Serum Albumin-mediated Cytoprotective Activity Is Enhanced by Fatty Acid Binding, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 34966–34975.
- [10] K. Oettl, R. Birner-Gruenberger, W. Spindelboeck, H.P. Stueger, L. Dorn, V. Stadlbauer, C. Putz-Bankuti, P. Krisper, I. Graziadei, W. Vogel, C. Lackner, R. E. Stauber, Oxidative albumin damage in chronic liver failure: Relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival, *J. Hepatol.* 59 (2013) 978–983.
- [11] M. Baldassarre, M. Domenicali, M. Naldi, M. Laggetta, F.A. Giannone, M. Biselli, D. Patrono, C. Bertucci, M. Bernardi, P. Caraceni, Albumin Homodimers in Patients with Cirrhosis: Clinical and Prognostic Relevance of a Novel Identified Structural Alteration of the Molecule, *Sci. Rep.* 6 (2016).
- [12] M. Naldi, M. Baldassarre, M. Nati, M. Laggetta, F.A. Giannone, M. Domenicali, M. Bernardi, P. Caraceni, C. Bertucci, Mass spectrometric characterization of human serum albumin dimer: A new potential biomarker in chronic liver diseases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 112 (2015) 169–175.
- [13] L.M. Smith, N.L. Kelleher, Proteoforms as the next proteomics currency, *Science* 359 (2018) 1106–1107.
- [14] M. Baldassarre, M. Naldi, G. Zacherini, M. Bartoletti, A. Antognoli, M. Laggetta, M. Gagliardi, M. Tufoni, M. Domenicali, K. Waterstradt, P. Paterini, A. Baldan, S. Leoni, M. Bartolini, P. Viale, F. Trevisani, M. Bernardi, P. Caraceni, Determination of Effective Albumin in Patients With Decompensated Cirrhosis: Clinical and Prognostic Implications, *Hepatology* 74 (2021) 2058–2073.
- [15] S. Das, J.S. Maras, M.S. Hussain, S. Sharma, P. David, S. Sukriti, S.M. Shasthy, R. Maiwall, N. Trehanpati, T.P. Singh, S.K. Sarin, Hyperoxidized albumin modulates neutrophils to induce oxidative stress and inflammation in severe alcoholic hepatitis, *Hepatology* 65 (2016) 631–646.
- [16] M. Domenicali, M. Baldassarre, F.A. Giannone, M. Naldi, M. Mastroroberto, M. Biselli, M. Laggetta, D. Patrono, C. Bertucci, M. Bernardi, P. Caraceni, Posttranscriptional changes of serum albumin: Clinical and prognostic significance in hospitalized patients with cirrhosis, *Hepatology* 60 (2014) 1851–1860.
- [17] R. Jalan, K. Schnurr, R.P. Mookerjee, S. Sen, L. Cheshire, S. Hodges, V. Muravsky, R. Williams, G. Matthes, N.A. Davies, Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality, *Hepatology* 50 (2009) 555–564.
- [18] M. Naldi, M. Baldassarre, M. Domenicali, F.A. Giannone, M. Bossi, J. Montomoli, T. D. Sandahl, E. Glavind, H. Vilstrup, P. Caraceni, C. Bertucci, Mass spectrometry characterization of circulating human serum albumin microheterogeneity in patients with alcoholic hepatitis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 122 (2016) 141–147.
- [19] A.H. Berg, C. Drechsler, J. Wenger, R. Buccafusca, T. Hod, S. Kalim, W. Ramma, S. M. Parikh, H. Steen, D.J. Friedman, J. Danziger, C. Wanner, R. Thadhani, S. A. Karumanchi, Carbamylation of Serum Albumin as a Risk Factor for Mortality in Patients with Kidney Failure, *Sci. Transl. Med.* 5 (2013).
- [20] A. Guerin-Dubourg, A. Catan, E. Bourdon, P. Rondeau, Structural modifications of human albumin in diabetes, *Diabetes Metab.* 38 (2012) 171–178.
- [21] S. Kalim, S.A. Karumanchi, R.I. Thadhani, A.H. Berg, Protein Carbamylation in Kidney Disease: Pathogenesis and Clinical Implications, *Am. J. Kidney Dis.* 64 (2014) 793–803.
- [22] M. Casulleras, R. Flores-Costa, M. Duran-Güell, J. Alcaraz-Quiles, S. Sanz, E. Titos, C. López-Vicario, J. Fernández, R. Horrillo, M. Costa, P. de la Grange, R. Moreau, V. Arroyo, J. Clària, Albumin internalizes and inhibits endosomal TLR signaling in leukocytes from patients with decompensated cirrhosis, *Sci. Transl. Med.* 12 (2020).
- [23] G. Sabbioni, R.J. Turesky, Biomonitoring Human Albumin Adducts: The Past, the Present, and the Future, *Chem. Res. Toxicol.* 30 (2016) 332–366.
- [24] F. Tabata, Y. Wada, S. Kawakami, K. Miyaji, Serum Albumin Redox States: More Than Oxidative Stress Biomarker, *Antioxidants* 10 (2021).
- [25] K.A. Brown, J.A. Melby, D.S. Roberts, Y. Ge, Top-down proteomics: challenges, innovations, and applications in basic and clinical research, *Expert Rev. Proteomics* 17 (2020) 719–733.
- [26] Q. Dong, X. Yan, L.E. Kilpatrick, Y. Liang, Y.A. Mirokchin, J.S. Roth, P.A. Rudnick, S. E. Stein, Tandem Mass Spectral Libraries of Peptides in Digests of Individual Proteins: Human Serum Albumin (HSA), *Mol. Cell. Proteomics* 13 (2014) 2435–2449.
- [27] S. Kannan, R. Krishnakutty, S. Souchevsky, Novel Post-translational Modifications in Human Serum Albumin, *Protein Pept. Lett.* 29 (2022) 473–484.
- [28] H. Watanabe, T. Imafuku, M. Otagiri, T. Maruyama, Clinical Implications Associated With the Posttranslational Modification-Induced Functional Impairment of Albumin in Oxidative Stress-Related Diseases, *J. Pharm. Sci.* 106 (2017) 2195–2203.
- [29] J. Alcaraz-Quiles, M. Casulleras, K. Oettl, E. Titos, R. Flores-Costa, M. Duran-Güell, C. López-Vicario, M. Pavesi, R.E. Stauber, V. Arroyo, J. Clària, Oxidized Albumin Triggers a Cytokine Storm in Leukocytes Through P38 Mitogen-Activated Protein Kinase: Role in Systemic Inflammation in Decompensated Cirrhosis, *Hepatology* 68 (2018) 1937–1952.
- [30] D. Bar-Or, L.T. Rael, R. Bar-Or, D.S. Slone, M.L. Craun, The formation and rapid clearance of a truncated albumin species in a critically ill patient, *Clin. Chim. Acta* 365 (2006) 346–349.
- [31] R. Bar-Or, L.T. Rael, D. Bar-Or, Dehydroalanine derived from cysteine is a common post-translational modification in human serum albumin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 711–716.
- [32] L. Bertozzo, E. Tavares Neto, L. Oliveira, V. Ximenes, Oxidative Alteration of Trp-214 and Lys-199 in Human Serum Albumin Increases Binding Affinity with Phenylbutazone: A Combined Experimental and Computational Investigation, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018).
- [33] S.O. Brennan, P.M. George, Three truncated forms of serum albumin associated with pancreatic pseudocyst, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1481 (2000) 337–343.
- [34] N. Kumari, D. Bandyopadhyay, V. Kumar, D.B. Venkatesh, S. Prasad, S. Prakash, P. R. Krishnaswamy, P. Balaran, N. Bhat, Glycation of albumin and its implication in Diabetes: A comprehensive analysis using mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta* 520 (2021) 108–117.
- [35] A. Lenglet, M.A. Rahali, F.-L. Sauvage, S. Liabeuf, G. Choukroun, M. Essig, S. El Balkhi, Z.A. Massy, Effect of Sevelamer and Nicotinamide on Albumin Carbamylation in Patients with End-Stage Kidney Disease, *Drugs R&D* 21 (2021) 231–238.
- [36] S. Paramasivan, S.S. Adav, S.C. Ngan, R. Dalan, M.-K.-S. Leow, H.H. Ho, S.K. Sze, Serum albumin cysteine trioxidation is a potential oxidative stress biomarker of type 2 diabetes mellitus, *Sci. Rep.* 10 (2020).
- [37] P. Rondeau, E. Bourdon, The glycation of albumin: Structural and functional impacts, *Biochimie* 93 (2011) 645–658.
- [38] L. Turell, H. Botti, L. Bonilla, M.J. Torres, F. Schopfer, B.A. Freeman, L. Armas, A. Ricciardi, B. Alvarez, R. Radi, HPLC separation of human serum albumin isoforms based on their isoelectric points, *J. Chromatogr. B* 944 (2014) 144–151.
- [39] R.E. Stauber, W. Spindelboeck, J. Haas, C. Putz-Bankuti, V. Stadlbauer, C. Lackner, K. Oettl, Human Nonmercaptalbumin-2: A Novel Prognostic Marker in Chronic Liver Failure, *Ther. Apher. Dial.* 18 (2014) 74–78.
- [40] K. Oettl, V. Stadlbauer, F. Petter, J. Greilberger, C. Putz-Bankuti, S. Hallström, C. Lackner, R.E. Stauber, Oxidative damage of albumin in advanced liver disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* (2008, 1782,) 469–473.
- [41] J. Nilsen, E. Trabjerg, A. Grevys, C. Azevedo, S.O. Brennan, M. Stensland, J. Wilson, K.M.K. Sand, M. Bern, B. Dalhus, D.C. Roopenian, I. Sandlie, K.D. Rand, J.T. Andersen, An intact C-terminal end of albumin is required for its long half-life in humans, *Communications Biology* 3 (2020).
- [42] B.J. Pieters, E.E. Fibuch, J.D. Eklund, N.W. Seidler, Inhaled Anesthetics Promote Albumin Dimerization through Reciprocal Exchange of Subdomains, *Biochem. Res. Int.* 2010 (2010) 1–7.

III.1.3. Discussion et perspectives

Le débat sur l'application de l'analyse top-down ou bottom-up, en particulier dans le contexte de la recherche clinique, dure depuis un certain temps, et il est important d'examiner les avantages et les limites de chaque approche. Dans la discussion de notre article, nous soulignons la pertinence de l'étude des isoformes d'albumine à l'aide d'une approche bottom-up, à savoir la digestion protéolytique, pour confirmer les modifications post-traductionnelles de l'albumine. Dix des quinze isoformes présentant un intérêt clinique important, identifiées à l'aide d'une approche top-down, ont été confirmées à l'aide de l'approche bottom-up. Toutefois, il est essentiel de reconnaître que l'analyse bottom-up a ses limites. Certaines modifications liées à la structure de l'HSA, en particulier les troncatures N-terminales (HSA-DA et HSA + Cys-DA), n'ont pas pu être confirmées par cette approche.

Quant à l'approche top-down, elle est considérée comme relativement complète, grâce à sa capacité à rechercher toutes les isoformes en un seul passage. C'est l'une des principales raisons pour lesquelles elle est candidate à une utilisation clinique de routine. L'avantage considérable de cette méthode est l'analyse des protéines intactes ce qui permet l'obtention d'une vision globale des modifications et des variantes des protéines. Il convient de noter que l'analyse des protéines intactes a ses limites, en particulier pour les protéines de poids moléculaire élevé (225). En effet, le risque de manquer ou de mal identifier certaines isoformes en raison d'une mauvaise ionisation et d'écarts de masse est proportionnel à la taille de l'albumine et inversement proportionnel à sa concentration, ce qui peut conduire à des données de spectrométrie de masse de mauvaise qualité. Par exemple, ce type d'approche n'a pas pu détecter certains isoformes tels que la carbamylation, la conversion de la cystéine en déhydroalanine et la dimérisation de l'HSA, toutes bien caractérisées par l'analyse bottom-up. De plus, la méthode montre une reproductibilité inter et intra-journée non-acceptable pour la quantification relative des isoformes présentes à des abondances relatives inférieures à 2 %, ce qui fausse la précision et la spécificité de la méthode des isoformes minoritaires.

En se basant sur cette discussion, il est donc conseillé d'optimiser les techniques de digestion enzymatique pour améliorer l'identification des PTM couvrant la séquence peptidique de l'HSA. Les facteurs à prendre en compte sont le choix des enzymes protéolytiques, la méthode d'application, que ce soit individuellement ou en combinaison, et la méthode de séparation des peptides en amont. En fonction de la taille des peptides et des technologies employées pour la séparation, certains peptides peuvent ne pas être retenus ou séparés de manière adéquate. Il peut être préférable d'utiliser d'autres techniques de séparation telles que l'électrophorèse sur gel, ce qui ajoute une charge de travail supplémentaire à une approche déjà chronophage et consommatrice en matériel.

L'analyse top-down présente un avantage potentiel indéniable en milieu clinique avec une capacité à détecter efficacement les isoformes les plus significatives sur le plan clinique d'une façon simple et rapide. Cependant, étant donné l'absence de méthodes robustes de quantification absolue des isoformes de protéines, il sera essentiel de développer et d'optimiser les méthodes de quantification utilisées dans les approches top-down. Cette amélioration revêtira une importance cruciale pour garantir la fiabilité et la précision de l'identification et de la quantification des isoformes de protéines essentielles, notamment les isoformes d'albumine dans un contexte clinique.

En conclusion, l'analyse bottom-up du HSA est informative, mais perd du terrain face aux approches top-down, en raison du temps et de la main-d'œuvre nécessaires à la digestion

des protéines, à la préparation des échantillons et au retraitement des données. En recherche clinique, où la simplicité, la rapidité et la détection d'isoformes cliniquement significatives sont primordiales, l'analyse top-down est prometteuse.

Cette étude nous permet de retenir les points clés suivants :

- **Nous avons confirmé que l'approche top-down est capable de détecter la présence d'au moins 15 isoformes d'albumine chez les patients présentant une atteinte hépatique.**
- **Les approches top-down et bottom-up se sont révélées complémentaires, l'une permettant la détection d'isoformes non détectées par l'autre, et vice versa.**
- **L'approche top-down développée ici est mieux adaptée pour une application clinique de routine que l'approche bottom-up. Toutefois, la méthode telle qu'elle est publiée ici nécessite encore plus d'optimisation pour quantifier les isoformes minoritaires.**

III.2. Article 2. Quantification absolue des isoformes de l'albumine sérique humaine par étalonnage interne sur la base d'une approche top-down LC-MS

III.2.1. Introduction à l'article 2

Après la confirmation des isoformes de l'HSA cliniquement pertinentes dans l'article 1, il devient impératif de les quantifier avec précision pour en faire des biomarqueurs fiables. Le nombre croissant d'articles sur le sujet montre que les isoformes de l'albumine sérique humaine (HSA) est un domaine particulièrement en vue dans la recherche biomédicale actuelle concerne, qui suscitent un intérêt grandissant en tant que biomarqueurs potentiels de pathologies hépatiques.

Cependant, les méthodes développées précédemment pour quantifier ces isoformes en utilisant des approches top-down basées sur la spectrométrie de masse, ont montré un manque de précision de la masse en raison de la déconvolution, à la fois par d'autres chercheurs et par notre propre équipe, comme présenté dans l'article 1. Cela a conduit à la détection d'écarts allant de 1 à 5 Da entre les masses théoriques et expérimentales, en particulier dans l'analyse des isoformes d'albumine. Nos efforts pour améliorer la spécificité de la méthode en explorant plusieurs candidats étalons internes ont échoué, principalement en raison de la concurrence intense entre l'analyte et les étalons internes au sein de la source d'ionisation apporté par le mode d'injection. Par conséquent, l'établissement d'une méthode robuste, simple et rapide pour la quantification absolue adaptée à une application de routine est devenu non seulement souhaitable mais aussi crucial pour surmonter cet obstacle critique.

Dans cette étude, nous avons prévu d'ajouter une technique de séparation chromatographique, avant l'injection, dans l'espoir de limiter, voire d'éliminer la compétition à la source d'ionisation entre l'étalon interne et l'analyte. Cette méthode a été développée dans le but de parvenir à une quantification précise et absolue des isoformes de l'HSA, avec pour objectif ultime son application clinique. La méthode actuelle se distingue par l'introduction d'une solution innovante inédite consistant à l'utilisation d'une protéine comme étalon interne (IS) pour la quantification précise des isoformes de l'HSA.

III.2.2. Article 2: Absolute quantification of Human Serum Albumin isoforms by internal calibration based on a top-down LC-MS approach.

Article soumis dans le journal *Analytical Chemistry* et est en cours de révision depuis le 1 septembre 2023.

Les données supplémentaires de l'article 2 sont disponibles en Annexe 2.

Analytical Chemistry

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Absolute quantification of Human Serum Albumin isoforms by internal calibration based on a top-down LC-MS/MS approach

Journal:	<i>Analytical Chemistry</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Lakis, Roy; Université de Limoges, Pharmacology & Transplantation Sauvage, François-Ludovic; Université de Limoges, Pharmacology & Transplantation Pinault, Emilie; Université de Limoges, BISCEm Marquet, Pierre; Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Saint-Marcoux, Franck; Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie El Balkhi, Souleiman; Centre Hospitalier Universitaire de Limoges

SCHOLARONE™
Manuscripts

ACS Paragon Plus Environment

Absolute quantification of Human Serum Albumin isoforms by internal calibration based on a top-down LC-MS/MS approach

Roy LAKIS^{a,1}, François-Ludovic SAUVAGE^{a,1}, Emilie PINAULT^a, Pierre MARQUET^{a,b},
Franck SAINT-MARCOUX^{a,b}, Souleiman EL BALKHI^{a,b*}

Author's institutional affiliations:

^a P&T, UMR1248, University of Limoges, National Institute for Health and Medical Research (INSERM), Limoges, France.

^b Department of pharmacology, toxicology and pharmacovigilance, CHU Limoges, Limoges, France.

Address for correspondance : Souleiman El Balkhi, Pharmacology-Toxicology and Pharmacovigilance Department, Centre de Biologie et de Recherche en Santé (CBRS), 2, av. Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France. Phone: +33555056140. E-mail: souleiman.elbalkhi@chu-limoges.fr

¹ Roy LAKIS & François-Ludovic Sauvage have contributed equally to this work and share first authorship

Abstract:

Well-characterized biomarkers using reliable quantitative methods are essential for the management of various pathologies such as diabetes, kidney and liver diseases. Human serum albumin (HSA) isoforms are gaining interest as biomarkers of advanced liver pathologies. In view of the structural alterations observed for HSA, insight into its isoforms is required to establish them as reliable biomarkers. Therefore, a robust absolute quantification method seems necessary.

In this study we developed and validated a top-down Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) method for the absolute quantification of HSA isoforms, using myoglobin (Mb) as an internal standard for quantification and for mass recalibration. Two different quantification approaches were investigated based on peak integration from deconvoluted spectrum and Extracted-Ion-Chromatogram (XIC).

The protein mixture human serum albumin/Myoglobin eluted in well-shaped separated peaks. Mb, allowed a systematic mass recalibration for every sample, resulting in extremely low mass deviations compared to conventional deconvolution-based methods. In total eight HSA isoforms of interest were quantified. Specific-isoform calibration curves showing good linearity were obtained using the deconvoluted peaks. Noticeably, HSA ionization behavior appeared to be isoform-dependent suggesting that the use of enriched isoform solution as calibration standards for absolute quantification studies of HSA isoforms is necessary. Good repeatability, reproducibility and accuracy were observed, with better sensitivity for samples with low albumin concentration compared to routine biochemical assays.

With a relatively simple workflow, the application of this method for absolute quantification shows great potential, especially for HSA isoform studies in clinical context, where high method sensitivity is needed.

Keywords: Human serum albumin, Post-translational-modification, Absolute quantification, Top-down, Internal calibration

Introduction

Despite its highly maintained features in humans, human serum albumin (HSA) is subjected to many structural and chemical modifications, leading to isoforms, of which those based on the redox state of Cys-34 are the most extensively studied¹. The quantification of HSA isoforms are of interest not only in diabetes, and kidney diseases²⁻⁴ but also in liver diseases⁵⁻¹⁰ as they can potentially serve as biomarkers^{1,8,11-16}. Baldassarre M. et al. demonstrated that “effective HSA” (the non-modified HSA) has greater prognostic power in patients with liver dysfunction than “total albumin” measured with conventional methods⁶. Therefore, there is a growing demand for an assay capable of accurately quantifying HSA isoforms for its relevance in a clinical context^{17,18}.

Conventional antigen-antibody-based methods, such as immunoturbidimetry, can directly quantify a protein by measuring the light scattered by the immune complexes formed, but are unable to distinguish isoforms^{19,20}. Proteomic approaches based on mass spectrometry were investigated as a possible solution for this limitation. Bottom-up strategies, a peptide-centric proteomic approach, offer deep proteome coverage and reliable quantification of isoforms, but it is unsuitable for clinical settings due to time-consuming sample preparation procedures, data processing and loss of information related to the 3D structure caused by proteolytic digestion^{11,14,15,21}. Since the introduction of nebulization-ionization technologies in top-down strategies, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-HR-MS) techniques gained popularity for native like folded state analyses of molecules^{5,6,22-28}, specifically for isoform characterization^{29,30}. In this way, we recently reported the detection and quantification of several HSA isoforms with minimal sample preparation and relatively short acquisition time^{15,20}.

Nevertheless, quantification of isoforms using MS-based top-down approaches lacks precision in terms of mass accuracy due to mass deconvolution, leading to discrepancies of 1-5 Da being detected between theoretical and experimental masses, particularly for albumin isoform analysis³¹. Mass shifts could be due to mass resolution disrupted by salt adducts, small non-covalently bound ligands or PTMs leading to isoforms³⁰. These discrepancies complicate the development of absolute quantification approaches needed for quality control analyses of isoforms in a clinical context where simplicity, efficacy and rapidity are required.

Most methods rely on relative quantification after deconvolution using relative peak intensities or relative peak areas by dividing the peak intensities of each isoform by the sum of all peaks intensities of the protein^{5,11,15,16,23,25,32–37}. However, relative quantification is done based on the assumption that ionization efficiencies are equivalent for all isoforms during ionization^{23,32}. Size, structural complexity, heterogeneity of large-sized proteins and low levels of proteins may affect the ionization efficiency of individual isoforms^{15,38}. Thus, the quantification of an isoform by relative quantification using the native form of a protein could lead to over or underestimation of the targeted isoform. To overcome this problem, absolute quantification methods applying chemical labeling have been developed^{27,39}. These methods can be reliable and precise but the sample preparation is time-consuming and costly. Chemical labels can possibly alter the structure of the protein causing charge and hydrophobicity changes²⁷.

To investigate the potential utility of HSA isoforms as biomarkers, an ongoing clinical study named ALBoM aims to assess the diagnostic potential of these novel biomarkers in identifying the severity and the origin of various liver injuries. The essential requirement is to accurately quantify HSA isoforms using a simple and rapid method suitable for routine application. Consequently, we present the development and validation of a top-down mass spectrometry approach for accurate measurement of HSA isoforms in patients that we intend to use in clinical settings. The novelty of the present method relies on the use of internal calibration using a protein as an internal standard in order to precisely quantify HSA isoforms. The method uses a reverse phase liquid chromatography (HPLC) coupled to an electrospray ionization (ESI) high-resolution quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (QTOF). To achieve absolute quantification of HSA isoforms, we aimed to: (i) optimize the chromatographic separation between the HSA and the internal standard (IS) in order to avoid ionization competition in the ESI source; (ii) use the internal standard to recalibrate masses and reduce the mass shifts (iii) evaluate two absolute quantification approaches based on peak areas of extracted-ion chromatogram (XIC) or deconvoluted mass peaks; (iv) estimate the intra/inter assays on different plasma samples corresponding to different stages of liver pathologies in order to validate the method.

Materials and methods:

Chemicals and Materials

A commercial albumin solution (albumorm 20% hereinafter referred to as HSAc) was obtained from Octapharma (France). Organic solvents and reagents were of analytical grade. Acetonitrile (ACN) and formic acid were obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France). Myoglobin from equine heart and ammonium formate were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Water (0.9% NaCl) was obtained from Fresenius Kabi AG (Bad Homburg, Germany). The 0.22 μm cellulose acetate spin filters were purchased from Agilent Technologies.

Patients

In compliance with French regulations (Code de la Santé Publique, Art. L1211-2), serum samples were collected from residual blood tubes of patients who did not object to the use of their leftover biological materials after routine care. The tubes collected were "Vacutainer®" lithium heparinate tubes (Beckton Dickinson, France) centrifuged (at 3000 rpm, for 10 minutes) from the hospital routine of the Biochemistry and Molecular Genetics laboratory at Limoges University Hospital.

The selection of "cirrhotic" patients was based on the cooperation of doctors and interns from the hepato-gastroenterology department of Limoges University Hospital, who were required to have diagnosed cirrhosis.

Sample preparation

Plasma samples and HSAc five-point calibration curve (10, 20, 30, 40 and 50 g/L) were prepared with water (0.9% NaCl). Myoglobin (4 g/L) was prepared with milliQ-water. The protein mixture HSAc standard/myoglobin was prepared as follows: 20 μL of a HSAc calibration standard + 20 μL of myoglobin (4 g/L) were diluted (1:50) with 960 μL of water (0.9% NaCl). As for plasma/myoglobin solution: 20 μL of plasma + 20 μL of myoglobin (4 g/L) were diluted (1:50) with 960 μL of water (0.9% NaCl). After vortex-mixing, the mixture was filtered on a 0.22 μm cellulose acetate filter by centrifugation for 2 min at 10°C and 18 000 rcf before injection in the analytical system.

Isoform ionization behavior

To study the ionization behavior of albumin isoforms, the correspondence between the linearity of the response of synthesized isoforms and commercial albumin

was demonstrated using the native albumin isoform. The linearity response of native albumin (native HSA) using two distinct calibration curves (0-50 g/L) spiked with 4g/L of Mb was investigated. The first calibration curve (10-50 g/L) was prepared using a highly concentrated solution of semi-synthetic reduced albumin (HMA; 100 g/L). This solution was prepared according to a protocol developed previously as follows HSAc (100 g/L) was reduced by incubating it with DL-Dithiothreitol (DTT) (concentration ratio DTT/albumin = 1/10), a reducing agent, for 5 min at 37°C²⁰. The second calibration curve (10-50 g/L) was prepared using the HSAc standard solution (HSAc; 200 g/L). Samples used to create the calibration curves and the actual calibration curve points prepared by simple dilution from the initial concentrated solutions were determined by immunoturbidimetry, a widely applied quantification method in clinical settings for protein quantification, for more accuracy. The peak area of native HSA isoform from the deconvoluted spectra of both curves was quantified and the slope was calculated.

Liquid chromatography - time-of-flight mass spectrometry (LC-TOF-MS)

Liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS) analyses were performed using a Nexera X3 system (Shimadzu Corporation, Noisiel, France) equipped with a thermostated column compartment and an autosampler. It is interfaced with a quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometer (TripleTOF® 5600+, Sciex, Concord, Canada), equipped with a DuoSpray™ ion source and operated in the positive ionization mode. The chromatographic separation was performed at a flow rate of 200 µL/min using a reverse-phase C4 Jupiter column (5 µm, 300 Å, 150 x 2 mm; Phenomenex), thermostated at 40°C with a binary gradient of phase A (2mM ammonium formate, 0.1% formic acid) and phase B (0.1 % formic acid in ACN: mobile phase A, 90:10, by volume) as follows : 0-1 min, 30% B; 1-2 min, 30 to 40% B; 2-12 min, 40 to 55% B; 12-13 min, 55 to 90% B; 13-15 min, 90% B; 15-15.1 min, 90% to 30% B and 15.1-20 min, 30% B. The injection volume was 10 µL. The source conditions were as follow: temperature, 400 °C; declustering potential (DP), 225 V; curtain gas (CUR), 40 units; ion source gas (GS1, GS2), 70 and 30 units respectively; and ion-spray voltage floating, 5.5 kV. m/z ratios were scanned using a TOF MS scan from m/z 900 and 2,000 with an accumulation time of 250 ms. All MS parameters were controlled by Analyst® TF 1.7 (Sciex).

Data processing

All LC-MS data were processed using PeakView® 2.2 software and its Bio Tool Kit 2.2.0 feature (Sciex).

Mass recalibration

Mass recalibration was performed using the “recalibrate spectrum” tool after calculating the average absolute errors between the observed and the 5 theoretical masses (1211.7925 [14+], 1304.9298 [13+], 1413.5900 [12+], 1542.0066 [11+] and 1696.1065 [10+]) in the TOF-MS spectra of the myoglobin peak. The masses used for mass recalibration were selected such that they agreed with the range destined to the deconvolution of TOF-MS of the albumin peak. After mass recalibration, only average absolute errors lower than 3 ppm were tolerated.

Spectrum deconvolution

MS spectra were deconvoluted after smoothing from 1,250 to 1,650 for albumin and 925 to 1,450 for myoglobin between m/z 1,000 and 200,000 at resolution 5,000. The reconstructed spectra of albumin and myoglobin were then exported separately as text files for isoform quantification and statistical analyses.

Quantification of HSA isoforms

Two different approaches of quantification were used: (i) the sum of the extracted ion chromatograms (XIC) of the different charge states of the HSA isoforms included in the range of deconvolution (see Table S1) and (ii) the deconvoluted mass spectrum area of specific HSA isoforms between 66,000-67,500 Da. A XIC window of 0.05 was used to generate peaks to be integrated in the XIC approach. After calibration between 10 and 50 g/L, the concentration of each isoform was calculated considering its relative abundance in the commercial albumin. The area under each isoform normalized by the IS, was plotted against the corresponding isoform concentration to create their respective calibration curves. Total albumin concentration was then obtained based on the total surface area of the deconvoluted spectrum of HSA (66000-67500 Da). Due to the inability of the PeakView® 2.2 software to accurately distinguish between close deconvoluted peaks, we developed a R script for surface integration based on the trapezoidal formula.

Validation

Intra and inter-assay of total albumin quantification as well as its isoforms were investigated during three days (D1 n=6; D2 n=3; D3 n=3) using three different plasma samples with different concentrations corresponding to a control sample and two different stages of liver pathologies (cirrhosis child A and C). The accuracy of the quantification of total albumin concentration was evaluated by a routine biochemistry assay. Data were expressed as mean, coefficient of variation and accuracy.

Results

LC–HRMS analysis of intact Human Serum Albumin PTMs

HSA (MW $\approx$ 66.4 kDa) is a monomeric multi-domain macromolecule with a complex charge variant heterogeneity¹. Myoglobin (Mb) (MW $\approx$ 16.7 kDa) used as an internal standard (IS), is a small globular protein, that constitutes up to 5–10% of all the cytoplasmic proteins found in skeletal muscles and in the heart⁴⁰. Traces of Mb are present at concentrations averaging 50 μ g/L in human blood, which represent less than 0.00125% of the quantity added in each sample or calibration point.

Fig 1 shows the resulting chromatogram, multiply charged spectra and zero charged deconvoluted mass spectra obtained after a high resolution RPLC-ESI-QTOF-MS analysis of a mixture of HSA and myoglobin (Mb: 4g/L). This mixture yielded two distinct peaks, at two different retention times (Fig 1A), under the LC conditions. Subsequently, as shown in Fig 1B & D respectively, the multiply charged spectra of HSA and Mb presented different charge states (HSA from +34 to +57 and Mb from +9 to +18), generated within the same m/z (900-2000) range: HSA (m/z: 1250-1650) and Mb (m/z: 925-1450). This characteristic enabled the use of myoglobin for mass recalibration, although it was initially used to compensate analytical variability.

After mass recalibration, an average absolute error lower than 3 ppm was tolerated, meaning deviations between theoretical and experimental masses, of native albumin used as a reference for calculating mass shifts, were lower than 0.3 Da (3 ppm/ $10^6 \times 66347$ Da).

After deconvolution of the multiply charged spectra to the zero charged mass spectra using the following intervals: m/z: 1250-1650 for albumin and 925-1450 for myoglobin, the deconvoluted mass spectrum of Mb yielded one intense peak at 16951.44 Da (Figure 1.E), while HSA presented several peaks corresponding to different isoforms between 66000 and 67500 Da (Fig 1.D). These isoforms correspond

to truncated, native, oxidized, cysteinylated, and glycated forms of albumin^{15,20}, which will be then used to create calibration curves for their proper absolute quantification.

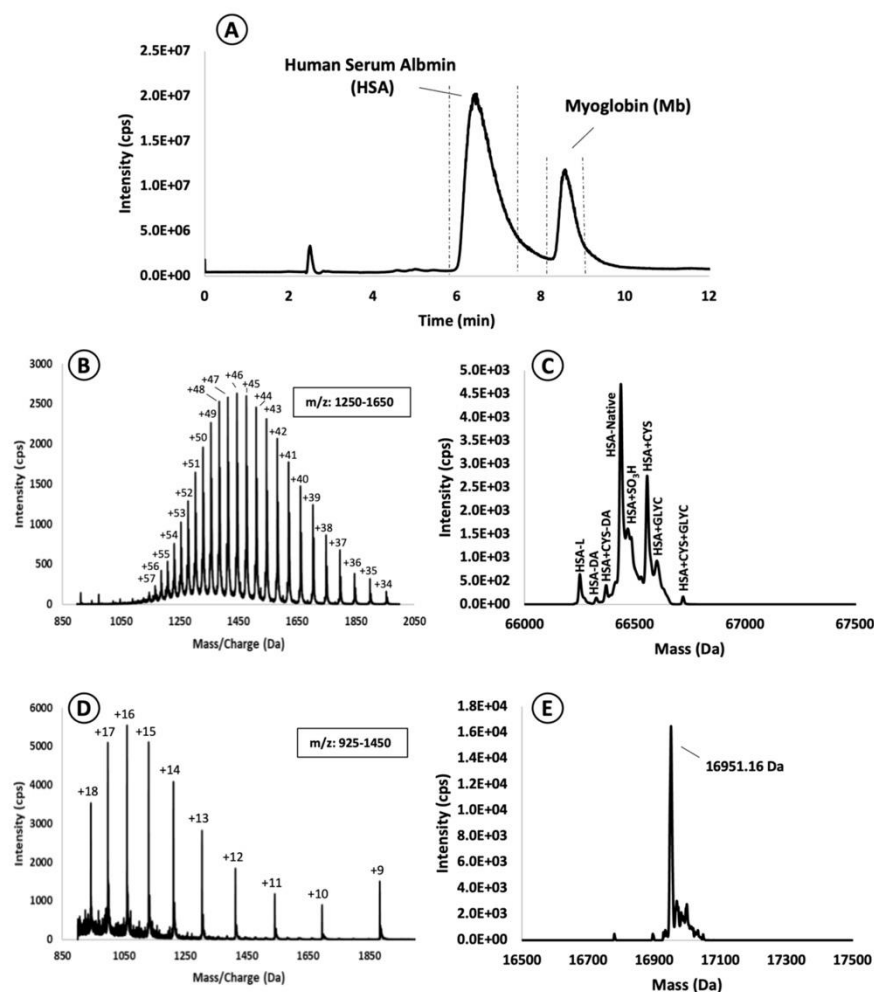


Figure 1: Intact LC-ESI-QTOF/MS analysis of human serum albumin and myoglobin (IS). (A): Total ion current of the reversed-phase separation of HSA and Mb, (B & D): Multi-charged mass spectrum of HSA and Mb respectively and (C & E): deconvoluted mass spectrum of HSA and Mb respectively.

Absolute quantification of intact albumin isoforms using deconvoluted mass peaks

Overlaid deconvoluted spectra of HSAc (from 0 to 50 g/L) spiked with a constant Mb concentration of 4g/L are illustrated in Fig.2.A. HSAc (0-50 g/L) isoforms exhibited consistent masses between 66000-67500 Da with an accordant linear response. Mb exhibited reproducible masses at 16951 Da. Good linearity was observed for the dynamic range 0-50 g/L with $R^2 > 0.97$ using linear regression for the total HSA surface (Fig 2.B0). Mb presented good repeatability with CV=3.24% for 6 replicates.

After mass recalibration and sample deconvolution, eight isoforms of interest were quantified in HSAc: HSA-DA, HSA-L, HSA-DA+CYS, HMA, HSA+SO₃H, HSA+CYS, HSA+GLYC, HSA+CYS+GLYC. The linearity of the calibration curves was acceptable for most of the isoforms ($0.9438 < R^2 < 0.9960$). Slopes varied slightly between 0.03 and 0.04 (Fig 2.B). For example, cysteinylated (HSA+CYS), glycosylated (HSA+GLYC) and irreversibly oxidized (HSA+SO₃H) isoforms had slightly different slopes value compared to the other types of isoforms.

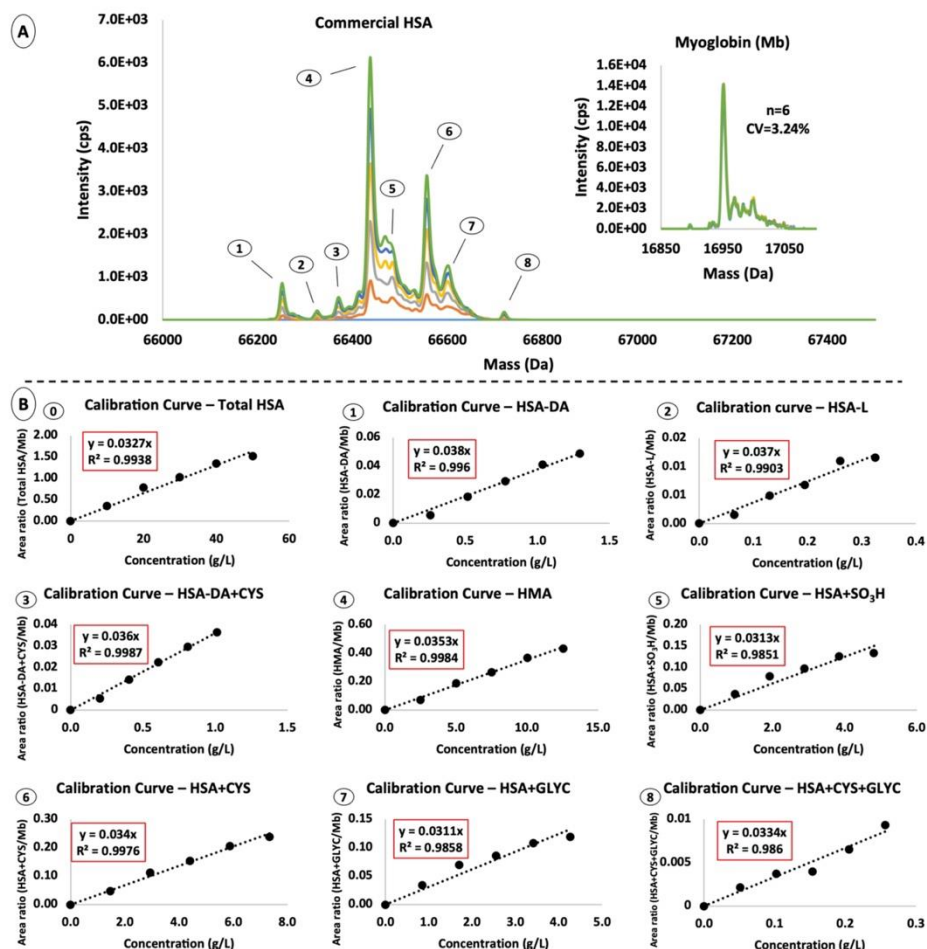


Figure 2: Intact albumin isoforms and their dynamic range in a commercial albumin preparation (A) overlaid deconvoluted spectra of commercial albumin preparation (0-50 g/L) spiked with 4 g/L of Mb. (B) Calibration curves obtained using deconvoluted mass peak areas of different albumin isoforms. B.0: total albumin surface, B.1: N-Terminal truncation, B.2: C-Terminal truncation, B.3: N-Terminal truncation + Cysteinylation, B.4: native albumin, B.5: Irreversible oxidized albumin, B.6: cysteinylated albumin, B.7: glycated albumin, B.8 cysteinylated + glycated albumin

Isoform ionization behavior

The native albumin (native HSA) isoform was used to demonstrate the linear response during ionization between synthesized isoforms and commercial albumin. Two different types of sample preparation were used: an *in vitro* HMA enriched-solution (Fig 3.A) and a non-modified HSAc solution (Fig 3.B). Fig.3 illustrates the overlaid deconvoluted spectra of native HSA (0-50 g/L) from two different preparations spiked with Mb, their calibration curves and the total albumin concentration of the samples dosed by immunoturbidimetry. Albumin levels quantified in samples used to create the calibration curves and the actual calibration curve points prepared after simple dilution from initial concentrated solutions (HMA and HSAc solution), by immunoturbidimetry, were equivalent to what we prepared.

For both preparation of native albumin, good linearity (peak area of native HSA) was observed for the dynamic range 0-50 g/L with $R^2 > 0.99$ using linear regression (Fig 3). Mb (n=6) presented good repeatability with CV=5.55% (Fig 3.A) and CV=1.06% (Fig3.B) respectively. Slopes obtained from both calibration curves of native albumin were equivalent to 0.03.

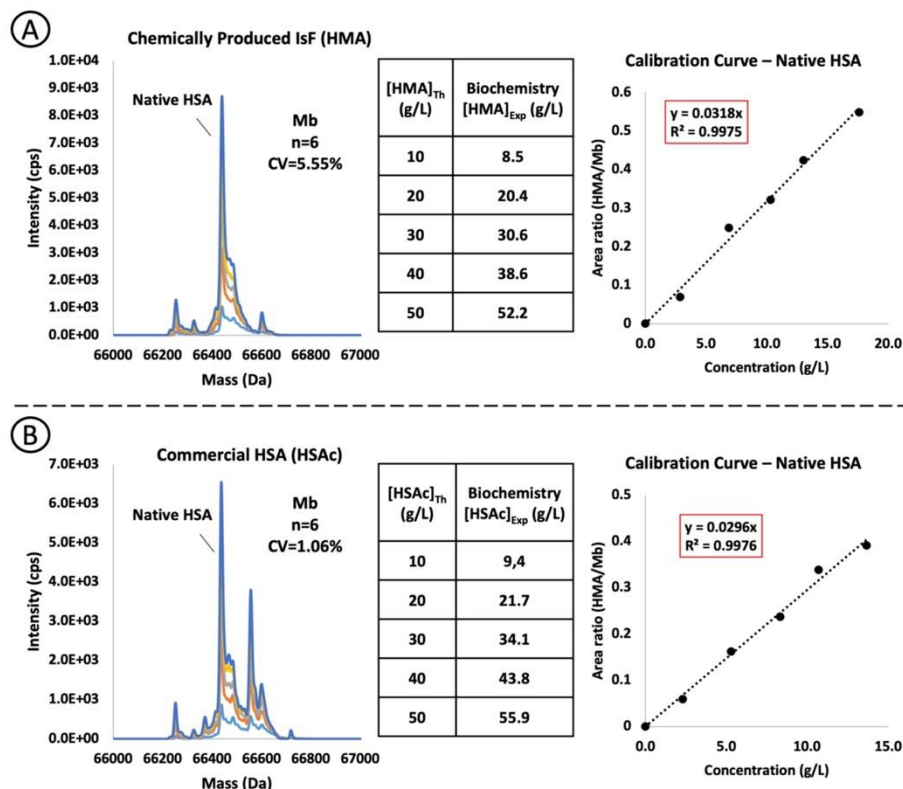


Figure 3: Native albumin quantification from chemically produced and commercial HSA solutions, spiked with Mb (4 g/L), using deconvoluted data. Mass deconvoluted data (0-50 g/L) based on m/z 1250–1650 for chemically produced HMA (A) and commercial HSA (B) along their experimental albumin concentrations dosed by immunoturbidimetry, their resulting calibration curve using the peak area of the native albumin isoform (66437 Da) from 0 to 50 g/L ($r^2 > 0.99$), as well as Mb coefficient of variations.

Analytical validation: Repeatability & Reproducibility

The validation of this analytical method was established with three different plasma samples corresponding to a control patient and two different stages of liver injuries (cirrhosis child A and C). Quantification of albumin levels using deconvoluted spectrum and Extracted-Ion-Chromatogram (XIC) yielded similar results to those determined by immunoturbidimetry (Table.1 and Table.2). Interestingly, quantification by nephelometry corresponded to immunoturbidimetric measurements, except for the sample with low albumin concentrations (19 g/L instead of 22.3 g/L).

Table 1: Accuracy results for intact albumin quantification based on mass deconvolution (D1 n=6; D2 n=3; D3 n=3)

ID	Biochemistry (g/L)	Deconvolution					
		Interday (n=6)			Intraday (n=6)		
		Mean (g/L)	CV (%)	Accuracy (%)	Mean (g/L)	CV (%)	Accuracy (%)
P1	32.3	28.54	4	88	32.80	4	102
P2	22.3	17.43	4	78	19.05	3	85
P3	43.2	41.53	5	96	44.12	4	102

Table 2: Accuracy results for intact albumin quantification based on Extracted Ion chromatogram (XIC) (D1 n=6; D2 n=3; D3 n=3)

ID	Biochemistry (g/L)	Extracted Ion Chromatogram (XIC)					
		Interday (n=6)			Intraday (n=6)		
		Mean (g/L)	CV (%)	Accuracy (%)	Mean (g/L)	CV (%)	Accuracy (%)
P1	32.3	31.83	2	99	37.78	4	117
P2	22.3	19.45	3	87	22.11	4	99
P3	43.2	42.46	2	98	48.54	5	112

Furthermore, when examining the interday and intraday assay results presented in Tables 3, 4, and 5, it becomes evident that the method exhibits excellent reproducibility, particularly for isoforms with concentrations exceeding 0.01 g/L.

Table 3: Inter and intraday assays performed on a serum of a control patient.

Isoforms (g/L)	P3 (Total albumin: 43.2 g/L)	
	Interday (n=6)	Intraday (n=6)
HSA-DA	0.01 CV= 48%	0.01 CV= 17%
HSA-L	-	-
HSA-DA+CYS	0.08 CV= 14%	0.09 CV= 9.5%
Native HSA	8.76 CV= 7%	9.46 CV= 4%
HSA+SO ₃ H	2.46 CV= 5%	2.51 CV= 4%
HSA+CYS	7.18 CV= 4%	7.87 CV= 4%
HSA+GLYC	6.24 CV= 4%	6.62 CV= 4.5%
HSA+CYS+GLYC	2.44 CV= 4%	2.57 CV= 4%

Satisfactory linearity ($r^2 > 0.97$) of the standard calibration curves during the 3-day validation procedure (D1 n=6; D2 n=3; D3 n=3) was observed using deconvoluted and XIC-based data. Furthermore, the observed accuracy and CV values for both approaches applied (Deconvolution: $3 < \text{CV} \% < 5$; $75 < \text{Accuracy} \% < 102$ and XIC: $1 < \text{CV} \% < 4$; $89 < \text{Accuracy} \% < 104$) were within the acceptable range for common acceptance criteria for LC-MS measurements⁴¹. Interestingly, results obtained using deconvolution were similar to those obtained using the XIC approach.

Table 4: Inter and intraday assays performed on a serum of a patient with cirrhosis classified as a Child A.

Isoforms (g/L)	P1 (Total albumin: 32.3 g/L)	
	Interday (n=6)	Intraday (n=6)
HSA-DA	-	-
HSA-L	-	-
HSA-DA+CYS	0.01 CV= 26%	0.01 CV= 12.5%
Native HSA	4.41 CV= 5%	5.2 CV= 4.5%
HSA+SO ₃ H	1.35 CV= 5%	1.51 CV= 3%
HSA+CYS	4.86 CV= 3%	5.74 CV= 4%
HSA+GLYC	4.38 CV= 4%	5.02 CV= 3.5%
HSA+CYS+GLYC	2.11 CV= 4%	2.48 CV= 5%

Table 5: Inter and intraday assays performed on a serum of a patient with cirrhosis classified as a Child C.

Isoforms (g/L)	P2 (Total albumin: 22.3 g/L)	
	Interday (n=6)	Intraday (n=6)
HSA-DA	-	-
HSA-L	-	-
HSA-DA+CYS	0.01 CV= 54%	0.01 CV= 13.5%
Native HSA	0.27 CV= 6%	0.36 CV= 5.5%
HSA+SO ₃ H	0.11 CV= 9%	0.13 CV= 9%
HSA+CYS	4.85 CV= 2%	5.45 CV= 3%
HSA+GLYC	2.48 CV= 3%	2.68 CV= 3.5%
HSA+CYS+GLYC	1.93 CV= 3%	2.1 CV= 3%

Discussion

In this work, we developed a novel and reliable top-down RPLC-MS method for the absolute quantification of the most relevant isoforms of HSA using an internal standard and two different quantitative approaches: deconvolution and XIC. We have demonstrated its successful validation and implementation on plasma samples corresponding to different stages of liver pathologies. In addition, using myoglobin as an internal standard and for mass recalibration, we have improved mass accuracy, which is a critical metric in HSA isoforms identification.

In LC-MS analysis, internal standards (IS) are employed to compensate for variations in the analytical process arising from differences in sample injection reproducibility and fluctuating ionization efficiency in the source. These parameters can lead to a misidentification of isoforms and an uncertainty during quantification. It is assumed that an IS can play its part in reducing the impact of those fluctuations provided it is well separated from the analyte and well ionized in the same m/z range as the analyte. On this basis, we have attempted to develop an absolute quantification method utilizing the direct flow injection technique we previously applied¹⁵.

Initially, our strategy involved separating the HSA from potential IS candidates in the deconvolution spectrum. For this purpose, we set four criteria for our IS candidates: proximity to HSA in terms of physiological properties, non-overlapping deconvoluted mass spectra within the mass range of potential HSA isoforms (66000-69000 Da), good solubility in water and a comparable response in MS. We evaluated various animal albumins, such as ovalbumin, horse, rat, and mouse serum albumin, as well as other protein standards like lysozyme and myoglobin. Despite successfully separating the deconvoluted masses of HSA and potential IS candidates, we observed significant competition at the ionization source due to the direct flow injection method. Consequently, this approach proved to be unsuitable for achieving absolute quantification.

Subsequently, we adopted an alternative approach based on reverse-phase chromatographic separation of HSA and IS candidates to eliminate competition in the ionization source. Interestingly, reverse phase chromatography (RPLC) is generally considered to cause protein denaturation⁴²⁻⁴⁴, which is not convenient for our native MS approach. However, based on literature, the extent of protein denaturation is directly related to the duration of contact with the hydrophobic stationary phase²⁴, and inversely related to the initial salt concentration in the mobile phase^{45,46}. Successful

RPLC involves separating and eluting proteins faster than their denaturation kinetics, while using volatile solvents. Horse, rat and mouse albumin, along with ovalbumin were not eluted or separated from HSA. Conversely, lysozyme and myoglobin were effectively separated through chromatography and well ionized. We did not continue with lysozyme due to stability problems, so myoglobin (Mb) was selected. Using a mixture of binary gradients with volatile solvents, two well separated peaks corresponding to HSA and Mb were detected (Fig 1.A). The elution of Mb after HSA, could indicate the hydrophobic behavior of Mb possibly due to its tight globular structure⁴⁰. It's important to mention that the trace quantities of myoglobin (Mb) found at average concentrations of 50 µg/L in human blood do not exert any influence on our analytical analyses when compared with the amount of Mb (4 g/L) introduced into the samples.

More interestingly, following ionization, the multiply charged spectra of HSA and Mb exhibited distinct charge states (Fig 1B & D) within the identical m/z range (900-2000). Consequently, we could conduct mass recalibration, enabling us to tolerate an average absolute error below 3 ppm, signifying that mass deviations were considered less than 0.3 Da. This enhanced mass accuracy enabled us to address the 1-5 Da mass variations previously encountered when characterizing HSA isoforms³¹, rendering the method applicable for routine clinical analysis.

Isoform behavior during ionization using native albumin from two separate preparations (HMA and HSAc) was investigated (Fig 3). The calibration curves for native albumin yielded identical slopes of 0.03. These findings affirm the similarity in behavior of the HMA isoform across diverse samples. Consequently, employing an HMA-enriched solution as a calibration standard becomes feasible, opening the door to potential future applications of isoform-enriched solutions as calibration standards.

Upon deconvolution and mass recalibration, eight HSA isoforms of interest between 66000-67500 Da and one Mb peak (16951 Da) were identified. Mb presented good repeatability (CV=3.24%) indicating consistent ionization behavior (Fig 2.A). Interestingly, the slopes of the calibration curves for each isoform varied between 0.03 and 0.04, indicating that ionization was similar between isoforms, but not identical. This strongly suggests that ionization and therefore linearity may vary according to isoform type, leading to their separate quantification (Fig 2.B).

Only recently top-down LC-MS method for absolute quantification based on deconvolution started emerging. Lefebvre et al. established their quantification method

1
2
3 of enterotoxin (SE) variants *in vitro* by incorporating both internal and external
4 calibration standards ²⁶. They relied on peak areas from either the extracted-ion
5 chromatogram (XIC) or deconvoluted mass peaks quantification. Although it's an
6 interesting approach for trace level proteins, it remains too specific for this kind of
7 proteins and not applicable for routine albumin analysis.
8
9

10
11 For isoform quantification, two predominant approaches exist: XIC (Extracted
12 Ion Chromatogram) and deconvolution methodologies for LC-MS techniques. Even
13 though XIC is a reliable approach, deconvolution can be advantageous due to
14 advanced noise reduction algorithms to improve the signal-to-noise ratio ²⁵. This is
15 particularly useful when dealing with low-abundance isoforms that might be obscured
16 by background noise in XIC-based approaches. However, a high risk of
17 misidentification is possible when identifying isoforms based on their characteristic
18 mass shifts after deconvolution of the charged mass spectra of HSA. Low-intensity
19 peaks, poor peak resolution and unsatisfactory mass accuracy associated with
20 deconvolution are all factors that can contribute to deviations equivalent to 1-5 Da and
21 therefore to identification errors ^{15,31}. Those factors might arise from the presence of
22 salt adducts, small ligands that are bound non-covalently to HSA, or post-translational
23 modifications ⁴⁷ in general and more specifically those with closely matching masses
24 such as acetylation (+42.0 Da), carbamylation (+43.0 Da) or tri-oxidation (+48.0 Da)
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Part of the present study was dedicated to the validation of the method using
three distinct plasma samples with different concentrations representing a control
patient as well as various stages of liver pathologies. Albumin levels quantified using
deconvoluted spectra and Extracted-Ion-Chromatogram (XIC) approaches closely
matched those obtained through immunoturbidimetry (Table 1 and Table 2), which
validated our method for the absolute quantification of albumin. Intriguingly, the
quantification via nephelometry closely correlated with immunoturbidimetric
measurements, except in the case of the sample with lower albumin concentrations
(19 g/L instead of 22.3 g/L). Research conducted by Etchepare et al. [18] has revealed
that the accuracy of albumin quantification through immunoturbidimetry can be
influenced by the sample's quality. Furthermore, this technique tends to overestimate
albumin levels in samples with low concentrations, necessitating the use of more
expensive alternatives like nephelometry for more accuracy. Therefore, we believe that
our findings reflect more accurately reality, especially for samples involving low albumin

1
2
3 concentrations (as observed in Table 1, P2, and Table 2, P2). Moreover, the method
4 demonstrates satisfactory levels of inter- and intraday reproducibility when quantifying
5 isoforms. Nevertheless, it is important to pay attention when quantifying isoforms in
6 patients with concentrations lower than 0.01 g/L, as accuracy could be compromised
7 under such circumstances (Table.3, 4 and 5).
8
9

10
11 Overall, we can observe a mass shift between the theoretical and observed
12 values of some isoforms, even after mass recalibration. Further studies on a large
13 cohort of patients should therefore be carried out to determine whether these shifts are
14 due to low signal intensity in MS or whether they simply imply that there are other
15 isoforms to explore that were hampered due to the complexity of the deconvolved
16 spectra. Moreover, due to the impossibility of obtaining pure enriched isoform solutions
17 ²⁰, specificity is not guaranteed when quantifying HSA isoforms and misidentification
18 of isoforms is still possible.
19
20

21
22 Finally, this simple LC-MS top-down technique, employing an absolute
23 quantification strategy, has the potential to serve as a reliable alternative for routinely
24 measuring albumin levels and its various isoforms in clinical settings. This could
25 contribute to the validation of its diagnostic and prognostic significance in a large cohort
26 of patients.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Conclusion

We have developed a novel top-down mass spectrometry assay for the absolute quantification of albumin levels as well as its isoforms in human plasma using myoglobin as internal standard. The optimized analytical method was evaluated on plasma samples corresponding to different stages of liver pathologies. An additional level of specificity was obtained by monitoring HSA isoforms using deconvoluted mass peaks after mass recalibration. In total 8 isoforms of interest were quantified. Intra and inter-assay of the top-down assay were within the acceptable range for common acceptance criteria for LC-MS measurements, and measured concentrations of albumin levels matched with conventional biochemistry methods applied in clinical settings. Importantly, HSA ionization behavior appeared to be isoform-dependent allowing the possible use of enriched isoform solution as calibration standards for absolute quantification studies of HSA isoforms. With a relatively simple workflow, the application of the RPLC-MS method demonstrated great potential, especially for HSA isoform studies in clinical context, where high method sensitivity is needed. In the upcoming clinical study called ALBoM, this method will be employed to evaluate how effectively HSA isoforms can be used for diagnosing the degree and source of different liver injuries.

References

1. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: From bench to bedside. *Mol Aspects Med.* 2012;33(3):209-290. doi:10.1016/j.mam.2011.12.002
2. Berg AH, Drechsler C, Wenger J, et al. Carbamylation of Serum Albumin as a Risk Factor for Mortality in Patients with Kidney Failure. *Sci Transl Med.* 2013;5(175). doi:10.1126/scitranslmed.3005218
3. Guerin-Dubourg A, Catan A, Bourdon E, Rondeau P. Structural modifications of human albumin in diabetes. *Diabetes Metab.* 2012;38(2):171-178. doi:10.1016/j.diabet.2011.11.002
4. Kalim S, Karumanchi SA, Thadhani RI, Berg AH. Protein Carbamylation in Kidney Disease: Pathogenesis and Clinical Implications. *Am J Kidney Dis.* 2014;64(5):793-803. doi:10.1053/j.ajkd.2014.04.034
5. Baldassarre M, Domenicali M, Naldi M, et al. Albumin Homodimers in Patients with Cirrhosis: Clinical and Prognostic Relevance of a Novel Identified Structural Alteration of the Molecule. *Sci Rep.* 2016;6(1):35987. doi:10.1038/srep35987
6. Baldassarre M, Naldi M, Zaccherini G, et al. Determination of Effective Albumin in Patients With Decompensated Cirrhosis: Clinical and Prognostic Implications. *Hepatology.* 2021;74(4):2058-2073. doi:10.1002/hep.31798
7. Das S, Maras JS, Hussain MdS, et al. Hyperoxidized albumin modulates neutrophils to induce oxidative stress and inflammation in severe alcoholic hepatitis. *Hepatology.* 2017;65(2):631-646. doi:10.1002/hep.28897
8. Domenicali M, Baldassarre M, Giannone FA, et al. Posttranscriptional changes of serum albumin: Clinical and prognostic significance in hospitalized patients with cirrhosis. *Hepatology.* 2014;60(6):1851-1860. doi:10.1002/hep.27322
9. Jalan R, Schnurr K, Mookerjee RP, et al. Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality. *Hepatology.* 2009;50(2):555-564. doi:10.1002/hep.22913
10. Naldi M, Baldassarre M, Domenicali M, et al. Mass spectrometry characterization of circulating human serum albumin microheterogeneity in patients with alcoholic hepatitis. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;122:141-147. doi:10.1016/j.jpba.2016.01.048
11. Kumari N, Bandyopadhyay D, Kumar V, et al. Glycation of albumin and its implication in Diabetes: A comprehensive analysis using mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 2021;520:108-117. doi:10.1016/j.cca.2021.06.001
12. Oettl K, Birner-Gruenberger R, Spindelboeck W, et al. Oxidative albumin damage in chronic liver failure: Relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. *J Hepatol.* 2013;59(5):978-983. doi:10.1016/j.jhep.2013.06.013
13. Meyer JG, D'Souza AK, Sorensen DJ, et al. Quantification of Lysine Acetylation and Succinylation Stoichiometry in Proteins Using Mass Spectrometric Data-Independent Acquisitions (SWATH). *J Am Soc Mass Spectrom.* 2016;27(11):1758-1771. doi:10.1007/s13361-016-1476-z
14. Liyasova MS, Schopfer LM, Lockridge O. Reaction of human albumin with aspirin in vitro: Mass spectrometric identification of acetylated lysines 199, 402, 519, and 545. *Biochem Pharmacol.* 2010;79(5):784-791. doi:10.1016/j.bcp.2009.10.007
15. Rahali MA, Lakis R, Sauvage FL, et al. Posttranslational-modifications of human-serum-albumin analysis by a top-down approach validated by a comprehensive bottom-up analysis. *J Chromatogr B.* 2023;1224:123740. doi:10.1016/j.jchromb.2023.123740
16. Sharma N, Pandey S, Yadav M, et al. Biomolecular map of albumin identifies

- signatures of severity and early mortality in acute liver failure. *J Hepatol.* 2023;79(3):677-691. doi:10.1016/j.jhep.2023.04.018
17. The Consortium for Top Down Proteomics, Smith LM, Kelleher NL. Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat Methods.* 2013;10(3):186-187. doi:10.1038/nmeth.2369
18. Grant RP, Hoofnagle AN. From Lost in Translation to Paradise Found: Enabling Protein Biomarker Method Transfer by Mass Spectrometry. *Clin Chem.* 2014;60(7):941-944. doi:10.1373/clinchem.2014.224840
19. Etchepare Cassol JP, Scolari R, Moresco RN. Impact of albumin carbamylation on immunoturbidimetric measurement of urinary albumin. *Anal Biochem.* 2021;614:114047. doi:10.1016/j.ab.2020.114047
20. Lakis R, Sauvage FL, Pinault E, Marquet P, Saint-Marcoux F, El Balkhi S. Semi-synthetic human albumin isoforms: Production, structure, binding capacities and influence on a routine laboratory test. *Int J Biol Macromol.* 2023;250:126239. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.126239
21. Chait BT. Mass Spectrometry: Bottom-Up or Top-Down? *Science.* 2006;314(5796):65-66. doi:10.1126/science.1133987
22. Zhang Z, Wu S, Stenoien DL, Paša-Tolić L. High-Throughput Proteomics. *Annu Rev Anal Chem.* 2014;7(1):427-454. doi:10.1146/annurev-anchem-071213-020216
23. Naldi M, Baldassarre M, Nati M, et al. Mass spectrometric characterization of human serum albumin dimer: A new potential biomarker in chronic liver diseases. *J Pharm Biomed Anal.* 2015;112:169-175. doi:10.1016/j.jpba.2014.12.001
24. Chen B, Peng Y, Valeja SG, Xiu L, Alpert AJ, Ge Y. Online Hydrophobic Interaction Chromatography–Mass Spectrometry for Top-Down Proteomics. *Anal Chem.* 2016;88(3):1885-1891. doi:10.1021/acs.analchem.5b04285
25. Jin W, Burton L, Moore I. LC–HRMS quantitation of intact antibody drug conjugate trastuzumab emtansine from rat plasma. *Bioanalysis.* 2018;10(11):851-862. doi:10.4155/bio-2018-0003
26. Lefebvre D, Fenaille F, Merda D, et al. Top-Down Mass Spectrometry for Trace Level Quantification of Staphylococcal Enterotoxin A Variants. *J Proteome Res.* 2022;21(2):547-556. doi:10.1021/acs.jproteome.1c00886
27. Largy E, Cantais F, Van Vyncht G, Beck A, Delobel A. Orthogonal liquid chromatography–mass spectrometry methods for the comprehensive characterization of therapeutic glycoproteins, from released glycans to intact protein level. *J Chromatogr A.* 2017;1498:128-146. doi:10.1016/j.chroma.2017.02.072
28. Harazono A, Hashii N, Kuribayashi R, Nakazawa S, Kawasaki N. Mass spectrometric glycoform profiling of the innovator and biosimilar erythropoietin and darbepoetin by LC/ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2013;83:65-74. doi:10.1016/j.jpba.2013.04.031
29. Gregorich ZR, Ge Y. Top-down proteomics in health and disease: Challenges and opportunities. *PROTEOMICS.* 2014;14(10):1195-1210. doi:10.1002/pmic.201300432
30. Tamara S, Den Boer MA, Heck AJR. High-Resolution Native Mass Spectrometry. *Chem Rev.* 2022;122(8):7269-7326. doi:10.1021/acs.chemrev.1c00212
31. Tabata F, Wada Y, Kawakami S, Miyaji K. Serum Albumin Redox States: More Than Oxidative Stress Biomarker. *Antioxidants.* 2021;10(4):503. doi:10.3390/antiox10040503
32. Demelbauer UM, Plematl A, Kremser L, Allmaier G, Josic D, Rizzi A. Characterization of glyco isoforms in plasmaderived human antithrombin by on-line capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-quadrupole ion trap-mass spectrometry of the intact glycoproteins. *ELECTROPHORESIS.* 2004;25(13):2026-2032. doi:10.1002/elps.200305936
33. Haselberg R, De Jong GJ, Somsen GW. Low-Flow Sheathless Capillary

- Electrophoresis–Mass Spectrometry for Sensitive Glycoform Profiling of Intact Pharmaceutical Proteins. *Anal Chem.* 2013;85(4):2289-2296. doi:10.1021/ac303158f
34. Thakur D, Rejtar T, Karger BL, et al. Profiling the Glycoforms of the Intact α Subunit of Recombinant Human Chorionic Gonadotropin by High-Resolution Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2009;81(21):8900-8907. doi:10.1021/ac901506p
35. Taichrib A, Pioch M, Neusüß C. Toward a screening method for the analysis of small intact proteins by CE-ESI-TOF MS: CE and CEC. *ELECTROPHORESIS.* 2012;33(9-10):1356-1366. doi:10.1002/elps.201100620
36. Cramer DAT, Franc V, Caval T, Heck AJR. Charting the Proteoform Landscape of Serum Proteins in Individual Donors by High-Resolution Native Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2022;94(37):12732-12741. doi:10.1021/acs.analchem.2c02215
37. Füssl F, Trappe A, Carillo S, Jakes C, Bones J. Comparative Elucidation of Cetuximab Heterogeneity on the Intact Protein Level by Cation Exchange Chromatography and Capillary Electrophoresis Coupled to Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2020;92(7):5431-5438. doi:10.1021/acs.analchem.0c00185
38. Cupp-Sutton KA, Wu S. High-throughput quantitative top-down proteomics. *Mol Omics.* 2020;16(2):91-99. doi:10.1039/C9MO00154A
39. Beynon RJ, Armstrong SD, Claydon AJ, et al. Mass spectrometry for structural analysis and quantification of the Major Urinary Proteins of the house mouse. *Int J Mass Spectrom.* 2015;391:146-156. doi:10.1016/j.ijms.2015.07.026
40. Ugone V, Sanna D, Sciortino G, Crans DC, Garribba E. ESI-MS Study of the Interaction of Potential Oxidovanadium(IV) Drugs and Amavadin with Model Proteins. *Inorg Chem.* 2020;59(14):9739-9755. doi:10.1021/acs.inorgchem.0c00969
41. Kaur S, Bateman KP, Glick J, et al. IQ consortium perspective: complementary LBA and LC–MS in protein therapeutics bioanalysis and biotransformation assessment. *Bioanalysis.* 2020;12(4):257-270. doi:10.4155/bio-2019-0279
42. Vellaichamy A, Tran JC, Catherman AD, et al. Size-Sorting Combined with Improved Nanocapillary Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Identification of Intact Proteins up to 80 kDa. *Anal Chem.* 2010;82(4):1234-1244. doi:10.1021/ac9021083
43. Strader MB, VerBerkmoes NC, Tabb DL, et al. Characterization of the 70S Ribosome from *Rhodospseudomonas p alustris* Using an Integrated “Top-Down” and “Bottom-Up” Mass Spectrometric Approach. *J Proteome Res.* 2004;3(5):965-978. doi:10.1021/pr049940z
44. Eschelbach JW, Jorgenson JW. Improved Protein Recovery in Reversed-Phase Liquid Chromatography by the Use of Ultrahigh Pressures. *Anal Chem.* 2006;78(5):1697-1706. doi:10.1021/ac0518304
45. McNay JLM, O’Connell JP, Fernandez EJ. Protein unfolding during reversed-phase chromatography: II. Role of salt type and ionic strength. *Biotechnol Bioeng.* 2001;76(3):233-240. doi:10.1002/bit.10016
46. Haimer E, Tscheliessnig A, Hahn R, Jungbauer A. Hydrophobic interaction chromatography of proteins IV. *J Chromatogr A.* 2007;1139(1):84-94. doi:10.1016/j.chroma.2006.11.003
47. Rathore D, Faustino A, Schiel J, Pang E, Boyne M, Rogstad S. The role of mass spectrometry in the characterization of biologic protein products. *Expert Rev Proteomics.* 2018;15(5):431-449. doi:10.1080/14789450.2018.1469982

III.2.3. Discussion et perspectives

La quantification absolue en appliquant une approche top-down est une méthode indispensable en recherche clinique. Elle nous permet de déterminer avec précision la concentration d'une molécule ou d'un analyte spécifique, en l'occurrence les isoformes HSA, dans un échantillon donné. Les informations sur les variations de concentration des isoformes de l'HSA peuvent être révélatrices de divers états physiologiques ou pathologiques, marquant ainsi leur rôle de biomarqueur des lésions hépatiques. De plus, la sensibilité de ces approches est cruciale, car elles permettent de détecter ces changements subtils dans les concentrations d'isoformes, ce qui peut conduire à un diagnostic plus précoce et à une intervention plus efficace. A souligner qu'un flux de travail relativement simple pour la quantification absolue est un atout important dans le cadre de la recherche clinique. L'obtention des résultats précis de manière efficace peuvent faire gagner du temps et des ressources, ce qui les rend particulièrement attrayants. En outre, la simplicité réduit également le risque d'erreurs dans la préparation et l'analyse des échantillons améliorant ainsi la qualité globale des résultats.

Dans la discussion de notre article, nous soulignons l'importance d'intégrer un étalon interne (IS) dans une approche top-down pour la quantification absolue des isoformes d'albumine. Le choix des candidats IS est crucial car ils doivent répondre à certains critères cruciaux comme la similarité physiologique à l'analyte, des spectres de masse qui ne se chevauchent pas avec l'analyte, la solubilité et une réponse comparable au niveau de spectromètre de masse (MS). Malgré la sélection minutieuse des candidats IS et la séparation réussie des profils au niveau des spectres de déconvolution, un problème inattendu s'est posé lors de l'étape d'ionisation. La première approche que nous avons appliquée, basée sur une méthode d'injection directe déjà établie par notre équipe, a entraîné une compétition importante au niveau de la source d'ionisation. Cette compétition est probablement due au fait que le HSA et le candidat IS ont été introduits simultanément dans la source, ce qui a entraîné une réponse inversement proportionnelle aux niveaux des signaux de déconvolution. En conséquence, on a modifié l'approche en sacrifiant la rapidité de la méthode, normalement applicable en 3 minutes, pour une plus grande précision et spécificité. On a intégré une colonne pour la séparation chromatographique, ce qui augmente le temps d'analyse à 20 minutes mais qui empêche la compétition au niveau de la source d'ionisation. L'un des résultats significatifs est l'amélioration de la précision de la masse obtenue grâce à la recalibration de la masse. Ce développement répond à un défi de longue date dans la caractérisation des isoformes HSA (226). La possibilité d'obtenir une erreur absolue moyenne inférieure à 3 ppm constitue une avancée majeure, qui rend cette méthode adaptée à l'analyse clinique de routine.

En outre, nous avons présenté une première preuve de concept pour l'utilisation de solutions enrichies en isoformes spécifiques comme standard de calibration. De plus amples informations sur ces solutions sont présentées dans l'article 3, chapitre 4. Dans le domaine de la quantification des isoformes, la discussion autour des méthodologies XIC et de déconvolution donne un aperçu des forces et des faiblesses de chaque approche. La déconvolution, avec ses algorithmes de réduction du bruit, semble prometteuse pour les isoformes peu abondantes qui pourraient être masquées par le bruit de fond (227). Toutefois, le risque d'erreur d'identification dû aux modifications post-traductionnelles souligne la nécessité d'une réflexion approfondie lors de l'utilisation de cette technique. Un aspect qui doit encore être pris en compte est l'optimisation du code R afin qu'il puisse détecter automatiquement les pics d'isoformes individuels avec précision. Nous avons utilisé le code R

en raison de l'incapacité du logiciel peak view à différencier les pics proches après déconvolution.

La validation de la méthode à l'aide de différents échantillons de plasma, y compris ceux de patients souffrant de pathologies hépatiques, démontre son utilité pratique. La corrélation étroite avec des méthodes de quantification établies telles que l'immunoturbidimétrie et la néphélométrie renforce la fiabilité de la méthode, en particulier pour les échantillons présentant de faibles concentrations d'albumine. Cependant, l'observation de décalages de masse dans certaines isoformes soulève des questions sur l'intensité du signal et la présence d'isoformes inexplorées, soulignant la nécessité de poursuivre les recherches et de constituer des cohortes de patients plus importantes. Ce débat souligne la complexité de l'analyse des protéines et l'importance de sélectionner la méthodologie la plus appropriée en fonction des objectifs de recherche spécifiques et des caractéristiques de l'échantillon (208).

Dans une perspective plus large, l'utilisation de la méthode top-down LC-MS avec un étalon interne est très prometteuse en raison de sa simplicité. Cette méthode revêt une importance particulière dans le domaine de la recherche clinique, notamment dans le contexte de l'étude des isoformes de l'albumine sérique humaine (HSA). Dans les milieux cliniques, il existe une demande critique pour des méthodes qui offrent une sensibilité élevée, et la méthode développée semble répondre efficacement à cette exigence.

L'étude clinique ALBoM (chapitre 5) profite pleinement de cette avancée. La méthode LC-MS de quantification absolue jouera un rôle central dans ce projet de recherche. Son principal objectif sera d'évaluer et de mesurer la praticité et l'efficacité des isoformes HSA en tant que biomarqueurs diagnostiques potentiels pour différents degrés et sources de lésions hépatiques. Cette recherche est très prometteuse car elle pourrait conduire à une amélioration des capacités de diagnostic dans le domaine de l'hépatologie, permettant une détection plus précise et plus précoce des lésions hépatiques, ce qui pourrait révolutionner la façon dont les lésions hépatiques sont diagnostiquées et prises en charge à l'avenir.

Cette étude nous permet de retenir les points clés suivants :

- **Nous avons pu optimiser l'approche top-down pour permettre une quantification absolue et précise de 8 isoformes d'albumine cliniquement importantes chez les patients souffrant de lésions hépatiques.**
- **La précision provient de la mise en œuvre d'une solution innovante impliquant l'utilisation d'une autre protéine, la myoglobine, comme étalon interne (IS). Cela a permis de recalibrer la masse, rendant l'erreur absolue moyenne inférieure à 3 ppm (<0,3 Da) après déconvolution.**
- **Nous avons montré que le comportement analytique (notamment l'ionisation) est similaire pour un même type d'isoforme. Cette observation a été exploitée dans le chapitre 5 pour calculer les concentrations des isoformes apparaissant à des masses élevées (ex: 2GLYC, 3GLYC) pour lesquelles nous n'avons pas pu générer de courbes d'étalonnage en raison de leur absence dans la solution commerciale standard d'albumine utilisée pour l'étalonnage.**

Chapitre IV. Modifications post-traductionnelles d'albumine entre études *in vitro* et clinique

Les travaux personnels présentés dans ce chapitre portent sur l'étude des modifications post-traductionnelles de l'albumine *in vitro* en clinique. Cette partie du travail vise à caractériser de manière exhaustive les PTM et à tester leur impact sur l'activité fonctionnelle de l'albumine. De plus, la mise en application du SEB test dans des modèles animaux apporte une nouvelle preuve de concept pour l'utilisation de la capacité de liaison de l'albumine comme biomarqueur de lésions hépatiques précoces est présentée.

- Troisième article :

Des isoformes semi-synthétiques imitant celles que l'on trouve dans diverses conditions, notamment le diabète, les maladies rénales et les maladies du foie, ont été produites *in vitro* et caractérisées de manière exhaustive à l'aide des approches protéomiques décrites précédemment. A l'origine de ce projet, l'objectif principal de la production de ces isoformes synthétiques était de tester séparément leur pathogénicité dans des modèles de culture cellulaire, leur impact sur l'activité fonctionnelle de l'HSA, d'étudier chimiquement l'origine de ces isoformes et de valider les méthodes analytiques développées.

- Quatrième article :

Une étude clinique, des modèles animaux et une étude de modélisation moléculaire ont été mis en place pour développer, optimiser et confirmer l'efficacité d'un test basé sur la capacité de l'HSA à lier des ligands spécifiques en présence de PTMs spécifiques. Le but de ces recherches est de vérifier si notre supposition selon laquelle les lésions hépatiques se manifestent précocement est correcte.

IV.1. Article 3. Isoformes semi-synthétiques de l'albumine humaine : Production, structure, capacités de liaison et influence sur un test de laboratoire de routine

IV.1.1. Introduction à l'article 3

Après avoir développé des méthodes analytiques dédiées à la caractérisation exhaustive des isoformes d'albumine dans des matrices complexes, nous nous sommes lancés dans la production *in vitro* des solutions semi-synthétiques d'isoformes d'albumine provenant des modifications post-traductionnelles (PTM) qu'elle subit.

Dans cette étude, l'accent est mis sur les isoformes de l'HSA afin de comprendre leur origine chimique, leurs mécanismes de pathogénicité potentielle et leurs influences sur les propriétés non oncologiques de l'HSA, telles que l'activité antioxydante et la liaison aux ligands. Plusieurs PTM sont abordés dans cette étude, notamment l'acétylation, l'oxydation réversible et irréversible, la glycation et la nitration/nitrosylation.

Notre objectif initial était de développer et d'optimiser les protocoles d'obtention de solutions pures d'isoformes semi-synthétiques, de valider la présence des isoformes cibles en utilisant les méthodes développées précédemment dans le chapitre 3 et de tester ces isoformes sur les modèles cellulaires *in vitro*. Pour cela, nous avons prévu de développer des modèles *in vitro* utilisant 2 lignées cellulaires différentes : Les cellules hépatiques humaines immortalisées (THLE-3) et HEPARG. Un triple objectif était envisagé envers le développement de ces 2 modèles. Premièrement, cette tâche nous permettra d'étudier l'impact de toxines et d'isoformes chimiques spécifiques sur ces deux lignées cellulaires. Deuxièmement, elle nous permettra de fournir une meilleure explication mécanistique des effets des différentes toxines et isoformes au niveau cellulaire. Enfin, le rôle de chaque isoforme, qu'il ait des effets biologiques péjoratifs, protecteurs ou neutres sur les cellules, sera discuté. Tout ceci aboutira à un point où nous pourrons différencier comment chaque toxine peut conduire à un profil d'albumine spécifique.

Malheureusement, l'effort visant à développer des modèles cellulaires hépatiques *in vitro* n'a pas été couronné de succès en raison de plusieurs problèmes techniques. L'un de ces problèmes majeurs était la difficulté des cellules à produire suffisamment d'albumine pour qu'elle puisse être détectée par spectrométrie de masse. En conséquence, nous avons opté pour une approche différente pour étudier l'impact de ces isoformes spécifiques sur la fonction de l'HSA. Nous avons utilisé un test basé sur les ligands appelé "Serum Enhanced Binding (SEB) test" pour évaluer la capacité de l'albumine à lier des ligands spécifiques après de telles modifications. De plus, nous avons examiné comment ces isoformes pourraient potentiellement altérer la mesure de l'albumine en utilisant un test immunoturbidimétrique largement employé en pratique clinique.

IV.1.2. Article 3: Semi-synthetic human albumin isoforms: Production, structure, binding capacities and influence on a routine laboratory test

Les données supplémentaires de l'article 3 sont disponibles en Annexe 3.

International Journal of Biological Macromolecules 250 (2023) 126239



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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



Semi-synthetic human albumin isoforms: Production, structure, binding capacities and influence on a routine laboratory test

Roy Lakis^a, François-Ludovic Sauvage^a, Emilie Pinault^a, Pierre Marquet^{a,b},
Franck Saint-Marcoux^{a,b}, Souleiman El Balkhi^{a,b,*}

^a PdT, UMR1248, University of Limoges, National Institute for Health and Medical Research (INSERM), Limoges, France

^b Department of Pharmacology, Toxicology and Pharmacovigilance, CHU Limoges, Limoges, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Human serum albumin
Post-translational-modification
HSA isoforms
Top-down
Bottom-up
ICP-MS

ABSTRACT

Human Serum Albumin (HSA) undergoes Post-Translational-Modifications (PTMs) leading to isoforms affecting its oncotic and non-oncotic properties. HSA is comprised of several isoforms whose abundance may vary with pathologies such as diabetes, kidney and liver diseases. Studying their impact separately may help to understand their sources and potential pathogenicity and further their evaluation as biomarkers.

The present study examined semi-synthetic HSA isoforms to investigate independently their structure by means of advanced mass spectrometry techniques (LC-TOF-MS and ICP-MS), influence on the HSA binding/antioxidant activities using a binding capacity test, and potential impact on albumin quantification by a routine immunoturbidimetric assay.

Applying different chemical reactions to a commercial HSA solution, we obtained different solutions enriched up to 53 % of native HSA, 78 % of acetylated HSA, 71 % of cysteinylated HSA, 94 % of oxidized HSA, 58 % of nitrosylated HSA and 96 % of glycosylated HSA, respectively. Moreover, the semi-synthetic isoforms showed differently altered binding capacities for a panel of ligands (Cu, Cd, Au, Ds and L-T4). Furthermore, immunoturbidimetry was found to be insensitive to the presence and abundance of the different isoforms.

The fully characterized semi synthetic HSA isoforms obtained should be useful to further investigate their pathogenicity and potential roles as biomarkers.

1. Introduction

Human serum albumin (HSA), which accounts for approximately 50 % of human plasma protein content (3–5 g/dl) [1], is a monomeric multi-domain macromolecule. Concentration of HSA may decrease because of several structural and chemical modifications, which in turn affect the scavenging and anti-oxidant properties of HSA [2,3]. Among these Post-Translational Modifications (PTMs) are truncations, acetylation, oxidation, glycation, nitrosylation and nitration. These PTMs are located mostly on the free cysteine residue at position 34 (Cys-34), the sole free thiol of the entire molecule, but can occur at other sites as well [2,4]. In physiological conditions, the redox state of cys-34 is as follows in healthy subjects: i) Human mercaptalbumin (HMA, also called native albumin), the reduced and most abundant form represent 70–80 %; (ii) Nonmercaptalbumin 1 (HNA1) the reversibly oxidized form, 20–30 %; and (iii) Nonmercaptalbumin 2 (HNA2) the irreversibly oxidized form

<5 % [2]. In a pro-oxidant environment, the thiol group (SH) of other HSA cysteine residues is vulnerable to reversible mono/di-oxidation reactions [5–7], leading finally to an irreversible reaction forming tri-oxidized cysteine (Cys-SO₃H) [7]. For instance, the gradual increase in the HNA1 and HNA2 oxidized isoforms was detected in patients with severe cirrhosis and notably correlated with high levels of systemic proinflammatory cytokines [3,8–11]. This raised the hypothesis that such HSA PTMs can be considered as biomarkers for the diagnosis and monitoring of liver diseases [3,12–16].

Alongside oxidation, glycation is one of the most observed PTMs and has been the subject of several studies [17]. In diabetic patients, non-enzymatic glycation of HSA due to glucose interaction with albumin can lead to the impairment of HSA ligand binding and anti-oxidant properties through the modification of lysine, arginine and the N-terminus sites [18]. Glycated forms have been found to correlate with methionine oxidation, and may be taken as a biomarker of severe

* Corresponding author at: Pharmacology-Toxicology and Pharmacovigilance Department, Centre de Biologie et de Recherche en Santé (CBRS), 2, av. Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France.

E-mail address: souleiman.elbalkhi@chu-limoges.fr (S. El Balkhi).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126239>

Received 28 June 2023; Received in revised form 2 August 2023; Accepted 7 August 2023

Available online 10 August 2023

0141-8130/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

diabetic conditions [1,2]. Another PTM that was investigated is the N-acetylation of lysine residues, which can modify the protein activities, conformation, and ligand binding properties [2,19,20]. PTMs can also be caused by free radicals, in particular by reactive nitrogen species (RNS) that attack free L-tyrosine causing its nitration and bind covalently a nitrosyl group to free thiol groups leading to S-nitrosylation [21,22].

Numerous research teams have been studying the impact of circulating HSA-PTMs on diseases they originate from. However, to explore their influence thoroughly *in vivo* and *ex vivo* studies, it is essential to study the impact of HSA isoforms separately and to comprehensively characterize them individually. To achieve this, it is necessary to have access to the purified isoforms. Thus, we aimed here to: (i) optimize the chemical reactions and processes to produce different albumin isoforms from native HSA *in vitro*; (ii) extensively examine HSA-PTMs using top-down and bottom-up mass spectrometry; (iii) investigate the possible interference of the different isoforms with total albumin quantification in routine clinical immunoturbidimetric measurements; and (iv) examine specific binding capacities of the different albumin isoforms.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

A commercial albumin solution (Vialbex 20 %; 200 mg/mL) was obtained from LFB-Biomedicaments (Courtaboeuf, France). This solution is produced from human donor plasma and contains sodium (chloride and caprylate): 2.8 mg sodium per mL, as notable excipients. Organic solvents and reagents were of analytical grade. Acetonitrile, methanol, trifluoroacetic acid and formic acid were obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France); cobalt(II) chloride (CAS: 7646-79-9), gold(III) chloride trihydrate (CAS: 16961-25-4), copper(II) chloride (CAS: 7447-39-4), silver acetate (CAS: 563-63-3), L-thyroxine sodium salt pentahydrate (CAS: 6106-07-6), dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAA), acetylsalicylic acid, D-Glucose, ammonium bicarbonate, sodium chloride, and hydrochloric acid from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) and Sequencing Grade Modified Trypsin from Promega (Charbonnières, France). L-Cysteine was purchased from Acros Organics (Cole-Parmer, France). Water (0.9 % NaCl) was obtained from Fresenius Kabi AG (Bad Homburg, Germany). Amicon® Ultra 0.5 mL Centrifugal filters Ultracel® 10 K were purchased from Millipore (Molsheim, France) and Oasis® HLB (3 cc, 60 mg) cartridges from Waters (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). The 0.22 µm cellulose acetate spin filters were purchased from Agilent Technologies.

2.2. Semi-synthetic production of HSA isoforms *in vitro*

Modified HSA isoform solutions (hereafter referred to as isoforms-enriched solutions) were prepared using a commercial albumin (HSAc) solution (200 mg/mL eq. 3 mM). The final concentration of albumin was set at 10 mg/mL for proteomic analyses (Top Down & Bottom Up) and the binding capacity test, or at 40 mg/mL for the biochemistry tests. We aimed at obtaining enriched human mercaptalbumin (HMA, also called native albumin), as well as oxidized (HNA1, HMA-HNA2), acetylated (HSAc-acetyl, HMA-acetyl), glycosylated (HMA-glyc) and nitrated (HMA-nitro) isoforms. To obtain solutions with a high percentage of a specific isoform, two consecutive chemical reactions were needed (HMA-X with X corresponding to the desired isoform after the second chemical reaction). For most of the solutions, we first reduced Cys-34 in HSAc by incubating it with DL-Dithiothreitol (DTT)/albumin concentration ratio = 1/10, a reducing agent, for 5 min at 37 °C. After reduction, the reduced albumin (HMA) was filtered and recovered to remove residual DTT as explained in supplementary data. Then, HMA was incubated with optimized concentrations of specific reactants (cysteine, H₂O₂, acetylsalicylic acid, D-glucose, sodium nitrite) following specific protocols, detailed hereafter, leading to the desired isoform

HMA-X. After treatment, samples were filtered and recovered using Amicon 10 K filters. All experiments were performed in triplicates for Top-Down analyses and the ligand-binding test (Fig. 1) and in quadruplicates for albumin determination by biochemistry tests. Finally, samples were stored at -80 °C or analyzed/treated according to the protocols mentioned below.

2.2.1. HSA oxidation (HNA1, HMA-HNA2)

To obtain reversibly oxidized HSA, namely HNA1, 225 µL of 2 mM HSAc (135 mg/mL) were incubated with 30 µL of a cystine solution (30 mM) in a final volume of 3 mL water (0.9 % NaCl) (cystine/albumin concentration ratio = 1/2) for 72 h at 37 °C. The irreversibly oxidized albumin with reduced Cys-34 (HMA-HNA2) was produced by incubating the filtered protein solution (Amicon 30 K) with 90 µL of H₂O₂ solution (1 M) in a final volume of 3 mL water (0.9 % NaCl) (H₂O₂/albumin concentration ratio = 1/200) for 1 h at room temperature. Oxidation of free thiol (SH) groups and methionine residues is expected.

2.2.2. HSA acetylation (HSAc Acetyl, HMA-acetyl)

In vitro acetylation of albumin consisted of the transfer of an acetyl group to the N-amino groups of Lysine (Lys) residues [20]. To obtain acetylated albumin, 225 µL of 2 mM HSAc (135 mg/mL) were incubated with increasing amounts (450 µL and 2250 µL) of 20 mM acetylsalicylic acid in a final volume of 3 mL water (0.9 % NaCl) (acetylsalicylic acid/albumin concentration ratio = 1/20 and 1/100, respectively) for 24 h at 37 °C. HMA-acetyl was produced by reduction using DTT to free Cys-34, followed by acetylation as mentioned previously. Dose-dependent concentrations were used to study the progressive behavior of albumin isoforms under stressful conditions.

2.2.3. HSA glycation (HMA-glyc)

To obtain glycosylated albumin containing reduced Cys-34 (HMA-glyc), the reduced filtered solution were incubated with 60 µL, 120 µL et 180 µL of 500 mM D-glucose in a final volume of 3 mL water (0.9 % NaCl) (D-glucose/albumin concentration ratio = 1/66; 1/133; 1/200, respectively) for 7 days at 55 °C. Sodium azide (1 mM) was added to avoid bacterial contamination. Controls with and without sodium azide were incubated in the same conditions at 55 °C to confirm that the observed changes are really due to albumin transformation and not to its destruction.

2.2.4. HSA nitration/nitrosylation (HMA-nitro)

To obtain S-nitrosylated/nitrated albumin, reduced albumin was filtered through Amicon 10 K filters to get rid of residual DTT and then incubated with 90 µL of an acidified sodium nitrite solution (500 mM) in a final volume of 3 mL water (0.9 % NaCl) (sodium nitrite/albumin concentration ratio = 1/100) for 1 h at room temperature.

2.3. Top-down high-resolution mass spectrometry analysis

Twenty microliters of each isoforms-enriched solution were diluted in 180 µL of an aqueous 20 mM ammonium formate solution with 0.1 % formic acid. After vortex-mixing, the mixture was filtered on a 0.22 µm cellulose acetate filter by centrifugation for 2 min at 4 °C and 18,000 rcf before injection. Analyses were performed by flow-injection [23] using a Nexera LC40 system (Shimadzu, Noisiel, France). A volume of 5 µL of each sample was directly injected at 50 µL/min without column under isocratic conditions with a mixture of 50 % phase A (2 mM ammonium formate, 0.1 % formic acid) and 50 % phase B (0.1 % formic acid in acetonitrile: mobile phase A, 90:10, by volume), for a total runtime of 3 min.

High-resolution mass spectrometry analysis was performed using a Sciex TripleTOF® 5600+ system equipped with a DuoSpray™ ion source and operated in the positive ion mode. A calibration solution was injected each hour in order to recalibrate the mass analyzer. The source conditions were as follows: temperature, 200 °C; declustering potential

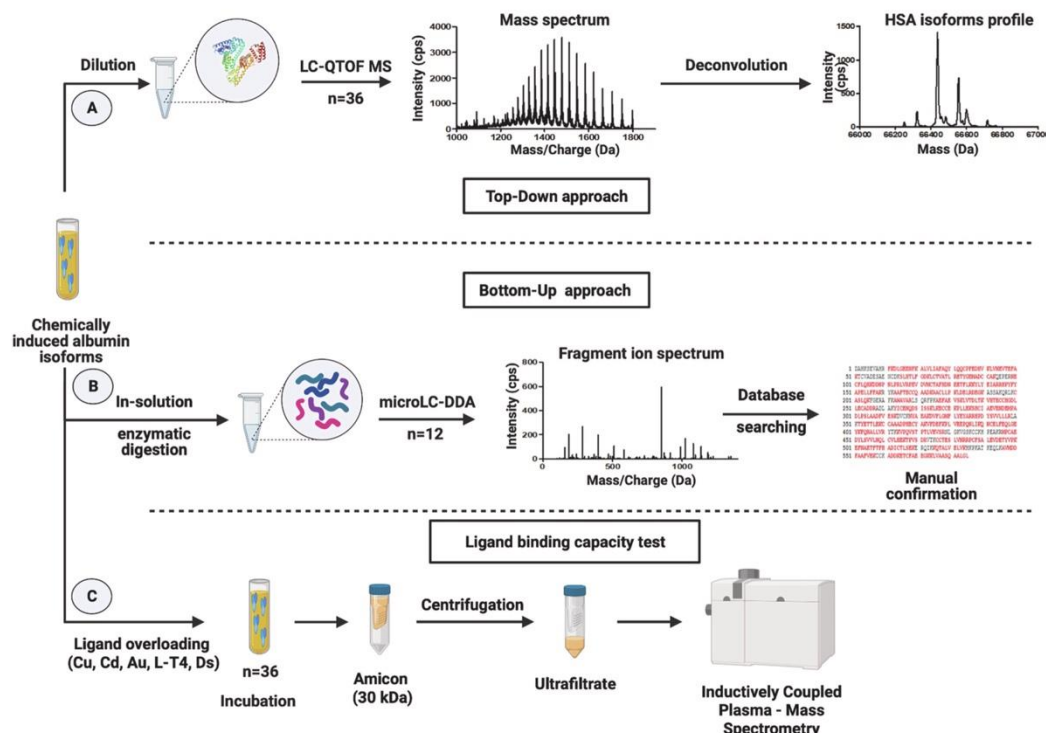


Fig. 1. Illustrative workflow of the three-phase experiments designed to profile, characterize, and determine different chemically-induced posttranslational modifications of commercial Human Serum Albumin (HSA) as well as to study their impact on specific ligand binding by means of a binding capacity test. In the first phase (A), for top-down analysis, chemically-induced albumin isoforms were directly injected into the LC-quadrupole time-of-flight (QTOF) instrument. HSA isoforms were characterized by their molecular weight after “deconvolution” of the MS spectra. In phase two (B), corresponding to bottom-up analysis, albumin isoforms were digested with trypsin and analyzed by microLC-QTOF-MS/MS to confirm their structure. The nature and site of structural modifications were determined from the fragmentation spectra. In phase (C), isoforms-enriched solutions were incubated with several ligands and the free fraction of these ligands quantified by ICP-MS. The binding capacity was deduced from the concentration of the ligands in the ultrafiltrate.

(DP), 250 V; curtain gas (CUR), 40 units; ion source gas (GS1, GS2), respectively 70 and 10 units; and ion-spray voltage floating, 5.5 kV. All MS parameters were controlled by Analyst® 1.7 TF (Sciex); m/z ratios were scanned from 900 to 1800 with an accumulation time of 500 ms.

LC-MS data were processed using PeakView® 2.2 software and its Bio Tool Kit 2.2.0 feature (Sciex). The input MS spectra between m/z 1350 and 1650 were deconvoluted at low resolution (5000) with an output mass range of m/z 1000 to 200,000. The mass spectra of modified albumin showed multiple peaks between 66,000 and 67,500 Da. All isoforms were characterized based on their molecular weight difference with native HSA. Each isoform peak area was expressed as percent total albumin content using a code developed in R [23].

2.4. Bottom-up mass spectrometry analysis

An amount of 50 µg proteins was mixed with 4 µL of 1 M ammonium bicarbonate (AMBIC). Afterwards, samples were either reduced by incubation with 4 µL of a 50 mM DTT solution for 35 min at 56 °C then alkylated, or just alkylated at room temperature in the dark for 30 min after addition of 4 µL of a 100 mM IAA solution. MilliQ water was then added to dilute AMBIC to a final concentration of 50 mM. Homogenization was necessary after each step. Protein digestion was performed overnight (16 h) at 37 °C after addition of 10 µL of 0.1 µg/µL trypsin,

corresponding to a protein/trypsin ratio = 1/50. Modified albumin digests were solid-phase extracted (supplementary data) and reconstituted in 200 µL of a mixture of acetonitrile/water (2:98, by volume) with 0.05 % trifluoroacetic acid to obtain an estimated protein concentration of 0.25 µg/µL. After vortexing, each solution was filtered on a 0.22 µm cellulose acetate filter by centrifugation for 2 min at 10 °C and 18,000 rcf, before injection into the microLC-MS/MS system comprised of a nanoLC 425 operated in the micro-flow mode (Eksigent, Dublin, CA) coupled with a TripleTOF® 5600+ (Sciex) operated in the high-sensitivity mode.

Reverse-phase LC was performed in a trap-and-elute configuration using a trap column (C18 Pepmap100 cartridge, 5 × 0.3 mm i.d., 5 µm; Thermo Scientific) and a ChromXP C18 analytical column (150 × 0.3 mm i.d., 120 Å, 3 µm; Sciex) with the following mobile phases: loading solvent (water/ACN/TFA 98/2/0.05 (v/v)), solvent A (0.1 % (v/v) FA in water) and solvent B (water/ACN/FA 5/95/0.1 (v/v)). All samples were loaded, trapped and desalted at 10 µL/min of the loading solvent for 5 min. Chromatographic separation was performed over 80 min at a flow rate of 3 µL/min as follows: initially, 5 % B, increased to 35 % in 65 min, then increased to 95 % B in 3 min, maintained at 95 % for 7 min, and finally, decreased to 5 % B for re-equilibration.

A volume of each sample equivalent to 1 µg proteins was subjected to data-dependent acquisition (DDA). All DDA mass spectrometer files

were searched with ProteinPilot™ software v.5.0.1 (Sciex) and Paragon™ algorithm using the following search parameters: cysteine alkylation with iodoacetamide, digestion by trypsin, and biological modifications. A thorough identification search was conducted using an in-house database containing HSA sequence and its known truncated isoforms. The end-result of this search led to the creation of a reference spectral library containing all the validated peptides carrying PTMs or not, after manually confirming their existence on the proposed amino acid sequence.

2.5. Isoforms-enriched solutions binding capacities

The capacity of isoforms-enriched solutions to bind a panel of chosen ligands (Cu, Cd, Au, Ds, L-T4) was tested separately. Ligands were chosen to cover the whole albumin structure: copper (Cu) with affinity for N-terminal/multi-metal binding site B (MBSB) [24,25], cadmium (Cd) with affinity for the multi-metal binding site A (MBSA) [26], gold (Au) with affinity for Cys-34 [25,27,28], dansylsarcosine (Ds) with affinity for the drug site 3 [29] and L-thyroxine (L-T4) with affinity for four binding sites distributed in the 4 cavities of HSA (Tr1-Tr4) [30]. Adapted concentrations for each ligand were chosen to saturate the isoforms-enriched solutions. The preparation of the ligand solutions is detailed in Supplementary data Table S1. The ligands were added to each isoforms-enriched solution and to HSAc to obtain theoretical HSA/ligand ratios (mol/mol) of 1/5 for Cu and Cd, 1/10 for L-T4, 1/50 for Au, 1/20 for Ds. These ratios resulting from the optimization phase were set to obtain theoretical binding >90 % for each ligand. For this, solutions were prepared at 300 µM for Cu and Cd, 3000 µM for Au and 37 µM for L-T4. To 200 µL of each isoforms-enriched solution, 500 µL of each ligand (Cu, Cd, Ds and Au) were added separately. For L-T4, 50 µL were added to 2000 µL of each isoforms-enriched solution. After incubation for 30 min at 4 °C, samples were subjected to ultrafiltration on Amicon® 30 kDa for 40 min, 3000 rpm at 4 °C. We measured by ICP-MS the unbound concentrations of copper, gold, cadmium, iodine (for L-Thyroxine) and sulfur (for dansylsarcosine) in the spiked samples after ultrafiltration, and calculated the percentage of retention with respect to the nominal concentrations, to calculate the binding capacity of HSA.

2.5.1. ICP-MS analysis

Calibration curves were built with 6 calibrants for each element. Concentrations ranged between 10 and 100 µg/L for Cu, Cd, Au and sulfur and between 1 and 20 µg/L for L-thyroxine.

L-cysteine was used for the calibration of sulfur and L-thyroxine for the calibration of iodine. Cu was measured at m/z 65, Cd at m/z 112, Au at m/z 197, iodine at m/z 127 and sulfur at m/z 48 as previously described [31]. To be able to measure sulfur (^{32}S), interfered by $^{32}\text{O}_2$, we introduced oxygen as a reactant gas in the reaction cell of the instrument to generate ^{48}SO . For this, the kinetic energy discrimination (KED) mode was used with oxygen flow rate at 0.3 mL/min. This was applied to all element measurements, calibration points, controls and ultrafiltrates. The ultrafiltrates were diluted with HNO_3 0.1 M when necessary.

2.6. Biochemistry analysis: albumin dosage

To study the impact of PTMs on immunoturbidimetric measurements, modified albumin isoforms (HMA, HNA1, HNA2, HMA-HNA2 and HMA-nitro) were produced in quadruplets. Some of these isoforms-enriched solutions contain reduced Cys-34 (HMA, HMA-HNA2 and HMA-nitro) to study possible role of certain PTMs in altering immunoturbidimetric measurements. Samples were filtered using Amicon 10 K filters to remove residual chemical products. Modified albumin was recovered from filters using the initial volume of preparation (1 mL of 0.9 % NaCl) as detailed in supplementary data. When DTT was used as a reduction agent, samples went through two filtration/recovery processes, except for HMA which underwent a single filtration/recovery process. Controls (40 mg/mL HSAc) were subjected to the same

procedure, i.e., single or double filtration/recovery. Aliquots of each isoform were analyzed after storage at +4 °C and -80 °C. Quantification was performed using a COBAS® 8000 automated system (Roche, Germany).

2.7. Statistical analysis

Quantitative data were expressed as means and standard deviations. Surface peak areas of each isoform were expressed as percentages based on the average profile (isoforms-enriched solution) of triplicates, calculated using a code developed in R. Univariate analysis of the association between HSA isoforms and percent retention of ligands in the different isoforms-enriched solutions employed the Student *t*-test. ANOVA followed by the Tukey's *post hoc* test was used to evaluate the association between HSA isoforms and immunoturbidimetric albumin apparent concentration in isoforms-enriched solutions. All tests were two sided, and $p < 0.05$ was considered statistically significant. Data were analyzed using GraphPad Prism®, version 5.04 for Windows.

3. Results

3.1. In vitro production of HSA isoforms

The HSAc (CTRL) solution showed: two major peaks (C: m/z 66438.25 and E: m/z 66555.75) corresponding to the native and cysteinylated forms (HSA + Cys) of HSA (Fig. 2.2); truncated form at N-terminal end such as HSA-DA (peak A); oxidized form like sulfinylated HSA (HSA + SO_2H ; peak D) and glycosylated HSA (HSA + Glyc; peak G); as well as a combination of isoforms (peaks B: HSA-DA + Cys, F: HSA + Cys + Ox and H: HSA + Cys + glyc) (Fig. 2). Several isoforms were then produced by submitting HSAc to optimized chemical reactions. The structural alterations due to the chemical reactions as well as the resulting isoforms are illustrated (Fig. 3). *In vitro* reduction by DTT led to an increase of HMA from 36.33 % (Fig. 2.1; peak C) to 52.64 % (Fig. 3.1; peak C), to the detriment of cysteinylated albumin (Fig. 2.1; peak E: 22.67 %), which became insignificant in (Fig. 3.1; peak E). All the isoforms related to cysteine were also reduced (HSA-DA + Cys, HSA + Cys and HSA + Cys + Ox). A decrease in glycosylated and sulfinylated forms alongside an increase in the truncated form (HSA-DA) was observed. Two new modifications were detected (peaks B and E) corresponding to the truncated C-terminal and sulfonated (+ SO_3H) HSA, respectively (Fig. 3.1; Fig. 4.1). Furthermore, HMA percentage in commercial albumin solutions was lower than in physiological conditions in agreement with previous studies [32].

After incubation with 20 mM acetylsalicylic acid, albumin was 78 % acetylated (Fig. 4.2). We observed acetylation (+42 Da) of the N-amino groups of certain lysine residues in cascade (peaks E to J, Fig. 3.2). Acetylation of a combination of isoforms was also observed (Fig. 4.2). However, isoforms-enriched solution produced with reduced albumin followed by acetylation led to the elimination of the isoforms that were acetylated on the cys-34 site Fig. S1.A.

Treatment of albumin with cystine led to isoforms-enriched solutions containing 71 % cysteinylated HSA, 50.6 % of which corresponds to cysteinylation of native albumin, characterized by a mass shift of +119 Da. Cysteinylation of other isoforms was also detected (peak A, B, D and E in Fig. 3.3; Fig. 4.3).

As for the irreversibly oxidized form of albumin (HMA-HNA2), we obtained an isoforms-enriched solution containing completely oxidized isoforms (94.18 %). Two isoforms (peaks C and D, Fig. 3.4) corresponding to different oxidized residues, more precisely to S-sulfonated cysteine and oxidized methionine amino acids were dominant (Fig. 3.4; Fig. 4.4).

In vitro incubation of reduced albumin with acidified sodium nitrite (HMA-nitro) led to an isoforms-enriched solution with 58 % nitrated/nitrosylated forms (Fig. 4.5). One major isoform (43.56 %) with m/z 66469.75 Da possibly corresponds to nitrosylation of cys-34 (HSA +

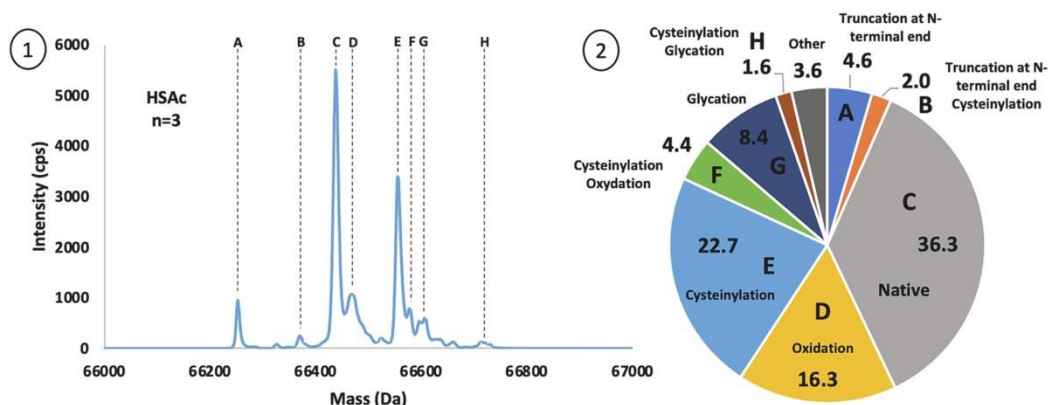


Fig. 2. (1) Deconvolution spectra of the commercial albumin solution (HSAC), used to create different HSA isoform profiles. The m/z peaks in the spectra represent different albumin isoforms. (2) HSA isoforms surface percentage were obtained using R software by determining the area of each peak. Each letter corresponds to a particular albumin isoform, whose characteristics are detailed in supplementary data Table S2. Data were expressed as mean ($n = 3$).

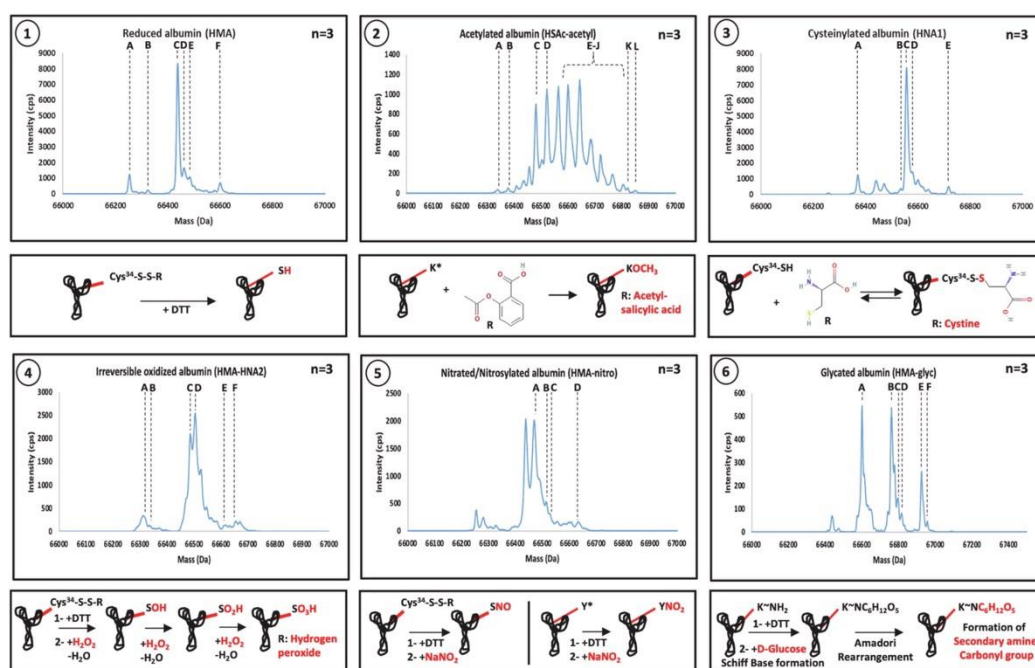


Fig. 3. Deconvoluted ESI-MS spectra focused on the 66,000–67,500 Da mass range (where most of the isoforms can be detected) and relative abundance of representative, chemically-induced HSA isoforms: reduced HSA (1), acetylated HSA (2), cysteinylation HSA (3), reduced and irreversibly oxidized HSA (4), S-Nitrosylated/Nitroated HSA (5), glycated HSA (6). The peaks in the spectra represent different albumin isoforms based on their mass. Under each isoforms-enriched solution profile, the chemical reaction responsible for such alteration is illustrated. Each letter corresponds to a particular albumin isoform, the characteristics of which are detailed in Fig. 4 and in supplementary data Table S2. Data are expressed as mean ($n = 3$).

SNO) with a mass shift equal to 31 Da (peak D, Fig. 3.5). Other combinations of nitroated/nitrosylated isoforms were also found.

Treatment of albumin with 30 mM of glucose led to an isoforms-enriched solution with 96.1 % glycated isoforms. Albumin with

multiple glycation states separated by a mass shift of +162 Da were detected (peak A, B and E) alongside the glycation of some oxidized forms of albumin (peaks C, D and F) in (Fig. 3.6; Fig. 4.6).

Other isoforms-enriched solutions derived from these six major

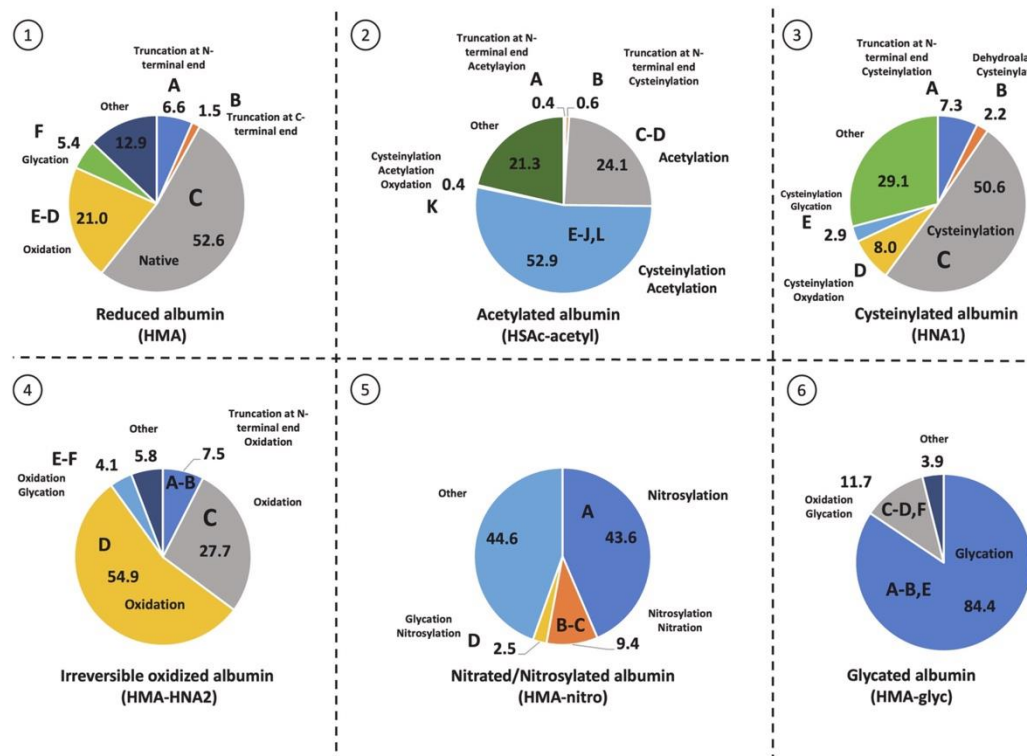


Fig. 4. Identification and quantification of HSA isoforms using a top-down high-resolution mass spectrometry strategy. Isoforms were determined based on their mass difference with the native form of HSA. Data are expressed as mean (n = 3). *The percentage of each isoform peak was calculated using a code developed in R software based on the area of each peak in the mass spectrum.

chemical reactions (with/without the contribution of Cys-34 residue or concentration-dependent) were produced to study and understand the pattern of certain modifications are presented in Fig. S1.

3.2. Confirmation of specific HSA isoforms by bottom-up high-resolution mass spectrometry analysis

Bottom-up analysis confirmed the nature of all our synthetic isoforms (Fig. 5). The tryptic digest of the acetylated isoforms obtained with a high concentration of acetylsalicylic acid showed 14 acetylated lysine residues (K-12, K-137, K-159, K-190, K-199, K-212, K-233, K-323, K-351, K-378, K-414, K-432, K-534, K-541), of which 3 had only recently been discovered (K-181, K-190 and K-432) (Fig. S2).

Cysteinylation was only detected on the only free thiol group of Cys-34. Nitration led to two, not yet reported nitrated tyrosine (Y-138 or Y-140, Fig. S3) residues located on the same tryptic peptide (Fig. 5) [33].

On the irreversibly oxidized isoform, we detected cysteine, methionine and tryptophan oxidation, as reported by others [34].

After strong glycation, we located 11 glycated lysine residues (K-12, K-73, K-137, K-233, K-262, K-351, K-378, K-414, K-475, K-525, K-574), of which K-73 and K-414 (Fig. S4) have never been reported before. Overall, we detected 7 types of chemically induced HSA PTMs: lysine acetylation, cysteinylation, cysteine tri-oxidation, methionine di-oxidation, tryptophan di-oxidation, tyrosine nitration, lysine glycation. For certain isoforms-enriched solution profiles, modified peptides and

their respective MS/MS fragmentation pattern are listed as supplementary data.

3.3. Specific ligand binding capacities of isoforms-enriched solutions

Spiking modified albumin isoforms with Cu or Cd, showed different and discriminating, behaviors. A significant decrease was observed in the retention of Cu and Cd in the acetylated, reduced acetylated, cysteinylation and nitrated isoforms. The retention of Cd by reduced albumin (HMA) was even more increased than that of Cu (Fig. 6). Significant decrease in the retention of Au, with affinity for Cys-34, was observed mainly with the reduced acetylated, irreversibly oxidized and nitrated/nitrosylated isoforms. Interestingly, Au retention by the reversibly oxidized form of albumin (HNA1) increased. The acetylated and reduced albumin isoform enriched-solutions did not differ from native albumin as far as the retention of Au is concerned. The retention of Ds, decreased with the reduced acetylated (HMA-acetyl), irreversibly oxidized (HMA-HNA2) as well as some of the glycated forms (Fig. 6). L-T4, did not show any difference in binding across most of the isoforms. Increased retention of L-T4 was observed with the reversibly oxidized form of albumin (HNA1), less so with the irreversibly oxidized (HMA-HNA2) isoform (see Table 1).

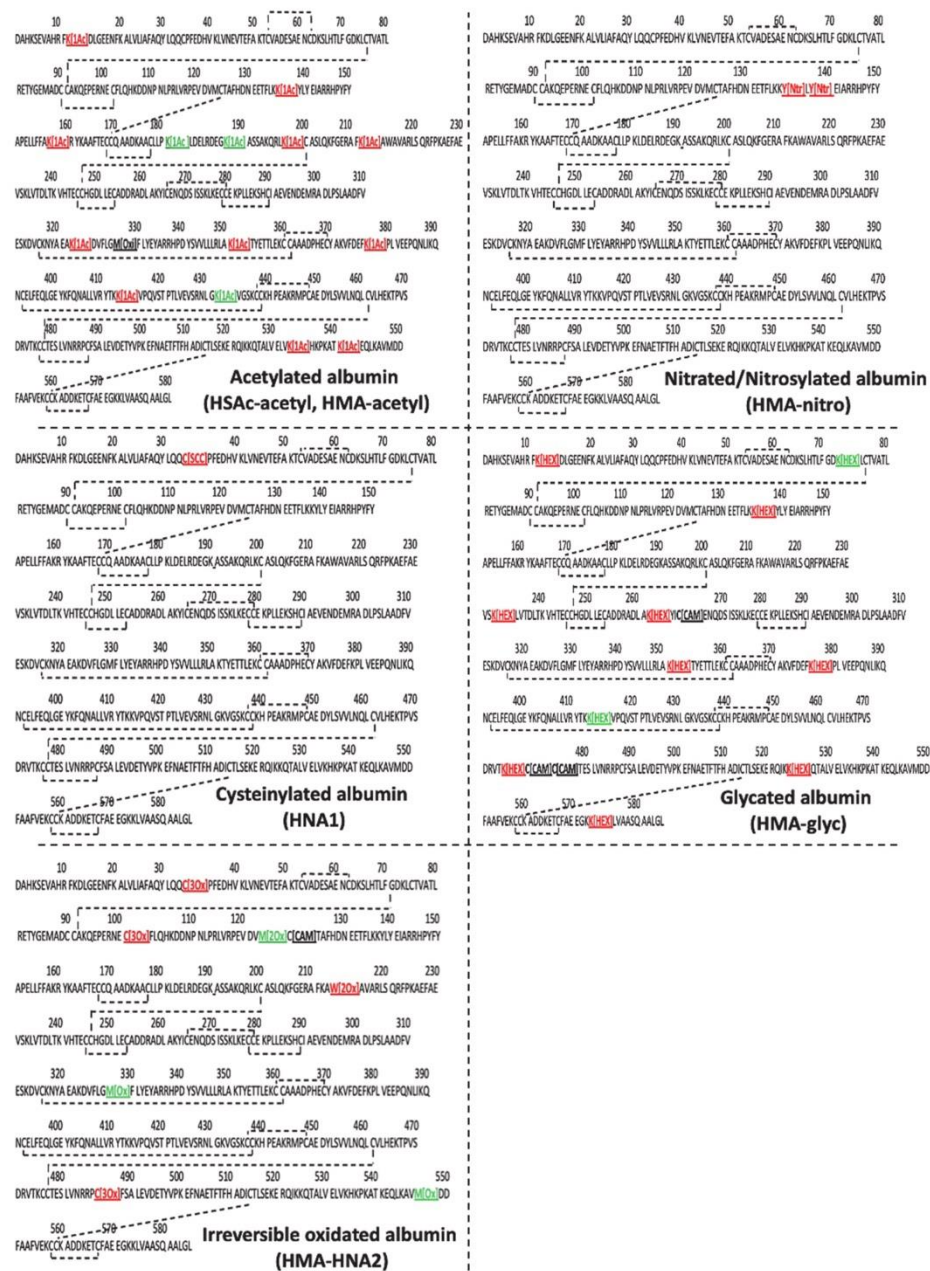


Fig. 5. Validation of the targeted chemical modifications using tryptic enzymatic digestion. Glycated lysine residues, cysteinylated cysteine residues, nitrated tyrosine residues, oxidized cysteine/methionine residues and glycated lysine residues were identified according to their modified mass spectra with respect to that of native albumin enzymatic digests. Red color expresses already known modification sites, and green newly identified modifications sites. Dashed lines map the disulfide bridges in albumin structure.

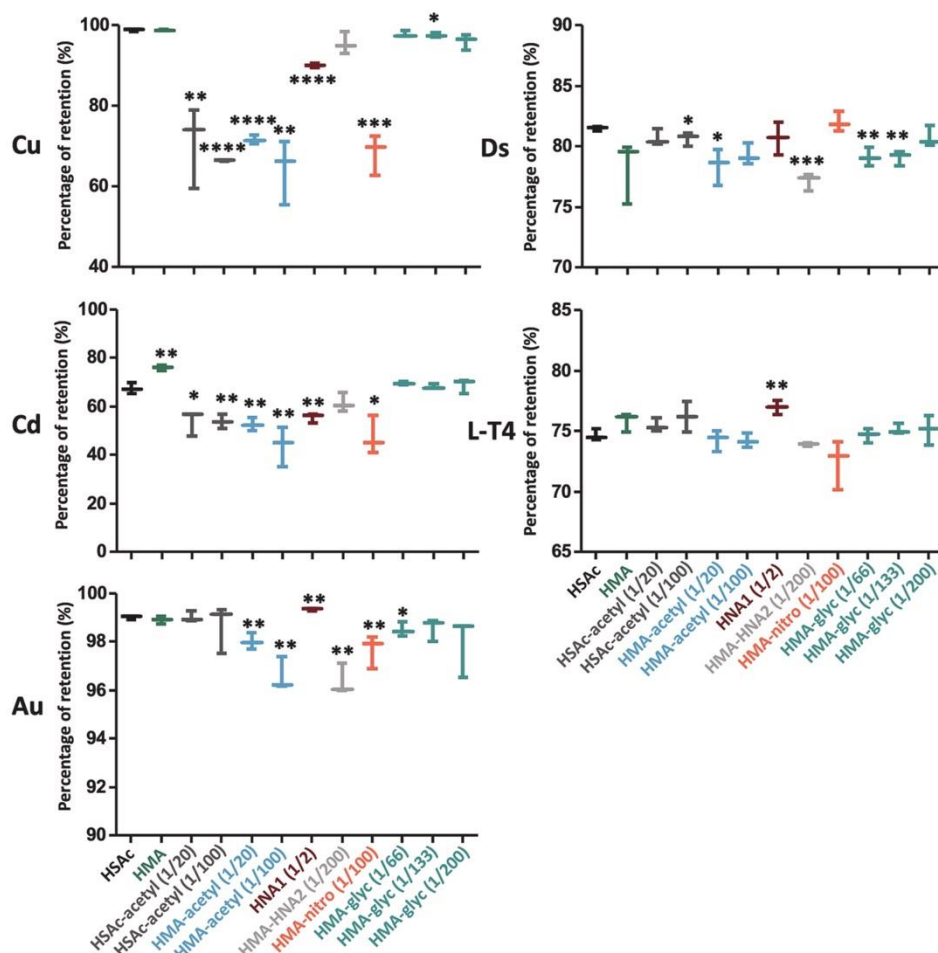


Fig. 6. Comparison of specific ligand binding capacities between commercial human serum albumin (HSAc, control) and chemically-induced HSA isoforms. Ligands were spiked to the different albumin solutions at the following HSA/ligand ratios (1 molecule of HSA for X atoms of a given ligand): Cu and Cd 1/5, L-tyrosine 1/10, Au 1/50, dansylsarcosine 1/20. All analyses were performed in triplicates. The retention ratios are expressed in (μM of spiked - μM of free ligand) per μM of HSA. Based on the type of the modification, the ligands were able to discriminate between control samples and isoforms-enriched solutions with sensitivity and specificity. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0005$.

3.4. Impact of isoform-enrichment on the determination of albumin by automated laboratory test results

No significant variations of albumin levels measured using the immunoturbidimetric assay were detected across the isoforms-enriched solutions. Specifically, modified isoforms (with cys-34: HNA1, HNA2; without cys-34: HMA-HNA2 and HMA-nitro) did not alter albumin quantification. For isoforms-enriched solutions that underwent one filtration/recovery step (HMA, HNA1 and HNA2), albumin levels detected after storage at 4 °C and -80 °C were almost the same (33–36 mg/mL) as controls (HSAc 40 mg/mL) (Fig. 7). Similarly, for isoforms-enriched solutions that underwent two recovery steps (HMA-HNA2 and HMA-nitro), albumin levels quantified after storage at 4 °C and -80 °C were not different (24–27 mg/mL) from their respective control.

4. Discussion

In this work, we produced isoforms-enriched solutions of HSA from a commercial preparation by chemical reactions. We confirmed the presence of the isoforms of interest in these solutions and determined the nature and the location of PTMs by coupling top-down and bottom-up high-resolution mass-spectrometry analyses. Then, we evaluated the influence of isoforms enrichment on one of the main functional properties of HSA, that is its binding capacity of specific ligands. Finally, we evaluated the impact of the presence of different percentages of HSA isoforms on albumin quantitation by an automated immunoturbidimetric laboratory test.

The capacity of albumin to exert its antioxidant and scavenging properties is not only related to its quantity but also to its quality. HSA is

Table 1

Summary of the discriminating performance of specific ligand binding capacities across control and isoforms-enriched solutions based on: retention capacity, types of isoforms and site modifications.

	Copper (Cu)	Cadmium (Cd)	Gold (Au)	Dansylsarcosine (Ds)	L-Thyroxine (L-T4)	Concerned isoforms	Amino acid modification sites
Reduced albumin (HMA)		X				HSA-DA, HSA-L, HSA + nOx, HSA + Glyc	[Asp1-Ala2], [-Leu585], Met, Lys
Acetylated albumin (HSAc-acetyl)	X	X				HSA + Acetyl, HSA-DA, HSA + nOx, HSA + Cys, HSA + Glyc	[Asp1-Ala2], Cys, Met, Lys
Reduced acetylated albumin (HMA-acetyl)	X	x	x			HSA + Acetyl, HSA-DA, HSA + nOx, HSA + Cys, HSA + Glyc	[Asp1-Ala2], Met, Lys
Cysteinylation albumin (HNA1)	x	x	x		x	HSA-DA, HSA + nOx, HSA + Cys, HSA + Glyc, HSA-DA, HSA + nOx, HSA + Glyc	[Asp1-Ala2], Cys, Met, Lys
Reduced oxidized albumin (HMA-HNA2)			x	x			[Asp1-Ala2], Met, Lys, Trp
Nitrated albumin (HMA-nitro)	x	x	x			HSA + NO/SNO, HSA + nOx, HSA + Cys, HSA + Glyc	Tyr, Cys, Met, Lys
Reduced glycated albumin (HMA-glyc)				x		HSA + nOx HSA + Glyc	Met, Lys

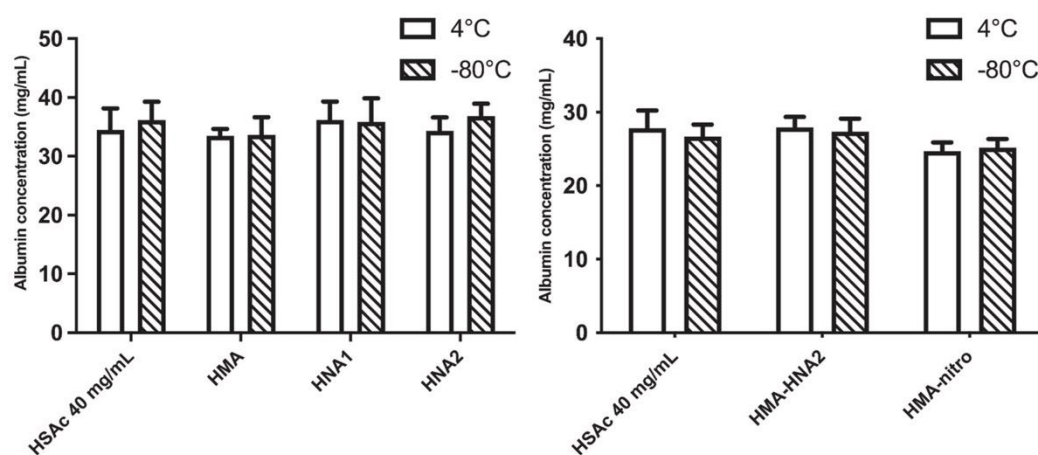


Fig. 7. Albumin levels quantified before (4 °C) and after deep-freezing (−80 °C) by immunoturbidimetry after the different treatment procedures of a commercial albumin (HSAC) solution prepared in water (0.9 % NaCl). Data are expressed as means and standard deviations. $n = 4$ for each isoforms-enriched solution.

sensitive to the intra-cellular and extra-cellular chemical environments, which result in chemical modifications and ultimately in the formation of isoforms that can have an influence on its non-oncotic roles [35,36]. Actually, there is now experimental evidence that a few albumin isoforms may participate in the progression of renal or liver failure [9,10], which deserves further “albuminomic” research in the different etiologies of renal or liver dysfunction, in other diseases such as diabetes mellitus, as well as to evaluate the mechanisms of action of these detrimental effects. We believe HSA isoforms-enriched solutions will be of great value for such research. Albumin can be seen as a complex network in which one type of modification can affect another and in turn influence the progression of the related disease [37]. For instance, the redox state Cys-34 residue (leading to HMA, HNA1 or HNA2) can serve as a tool to assess oxidative stress, as well as the diagnosis and prognosis of renal or liver diseases [10]. Our oxidative-isoforms-enriched solutions will help us to explore their potential role in the progression of such diseases.

The chemical environment surrounding HSA can also affect other parts of the albumin structure [38]. The glycation of HSA, particularly of

lysine residues, correlates with oxidative biomarkers in diabetes and various degenerative diseases. The acetylation of lysine residues can impact significantly the dynamics of protein–protein interactions, protein complexes [19] and specifically the N-terminal metal ions chelating site [39], considered as a key scavenging-metal-site with a major role in limiting the generation of reactive oxygen species (ROS) [40]. Albumin structure and function can also be altered in an environment rich in reactive nitrogen species (RNS) that can modify tyrosine residues, causing a nitration of HSA, and favor the covalent binding of a nitrosyl group to HSA leading to S-nitrosylation [21,22].

Despite optimization, our production procedures were limited by an incomplete transformation to a pure isoform for most of the isoforms-enriched solutions. Obtaining isolated isoforms was actually out of reach because of the complexity of albumin and the purity of the commercial albumin solution, due to the bioprocesses used during production [40].

The binding capacity of enriched isoform solutions was investigated using a novel multi-ligand based approach, contrasting with previous works where the binding studies were limited to one ligand [40,41]. We

carefully chose the ligands so as to cover the whole albumin structure as well as the most important HSA modifications with clinical relevance in liver dysfunctions. Au was selected to reveal Cys34 modifications [25,27,28], Cu for its high affinity for the N-terminal site and the multi-binding site B [24,25], L-T4 for its 4 binding sites distributed in the 4 cavities of HSA (Tr1 to Tr4) [30], Ds for its affinity for drug site 3 (or diazepam-binding site), which is also the bilirubin binding site [29], and Cd for its high affinity to the multi-binding site A (or Cd binding site) [26]. The retention values of some ligands were higher than expected compared to the theoretical and experimental reported ones. It was demonstrated that HSA can bind less than two Cu atoms [42]. Later on, only one specific binding site, the NTS, was shown to be able to bind Cu, and that the multi metal binding site has a very low affinity for it. Our results suggest that albumin was capable of binding >5 atoms of Cu. This could be due to non-specific liaisons. However, our results show that even the non-specific bindings are impacted by the HSA modifications. This general trend can be extended to the other ligands tested in our binding experiments.

4.1. Native albumin enriched solution (HMA)

In the commercial albumin solution, cysteinylated (HSA + Cys), truncated C-terminal (HSA-L) and truncated N-terminal (HSA-DA) isoforms were found, consistent with a previous report [32]. To obtain a higher percentage of native albumin as the template for further chemical modifications, HSAc solution was reduced using DTT. An increase in HMA percentage and a decrease of other isoforms was observed. After spiking this "rectified" solution with specific ligands (Cu, Cd, Au, Au and L-T4), the binding capacity of HMA compared to HSAc was maintained (for Cu, Au and LT4) or improved (for Cd). This rectification process might be considered for therapeutic use of albumin since it may improve albumin non-oncotic properties through the decrease in oxidized forms that play a pejorative role in chronic liver diseases [10,43].

4.2. Albumin acetylation (HSAc-acetyl, HMA-acetyl)

Analysis of tryptic digests revealed three not-yet-reported acetylated residues (on Lys-190, Lys-432, Lys-181: Fig. S2). The acetylation of HSAc with our procedure showed that the peptide containing the Cys34 was also acetylated ($66,555 + 42$ (acetylation) = 66,597 Da), which has not been reported yet (Fig. S1). Indeed, acetylation at different concentrations of non-reduced albumin (referred to as HSAc-Acetyl) resulted in a peak ($\approx 66,600$ Da) that overlapped with the glycosylated isoform. The intensity of this peak increased with the concentration of acetylsalicylic acid during the process, confirming the acetylation of Cys34.

Interestingly, after spiking acetylated isoforms with Cu, Cd and Au, a decrease in the retention of Cu and Cd was observed. Acetylation targets N-terminal sites and might generate N-truncation [40]. Our results support the use of Cu as a ligand to assess the binding activity of the N-terminal site. Cd showed the same decreased binding since it shares with Cu a strong affinity for the multi-metal binding site. However, Cd has no affinity for the N-terminal, which explains reduced sensitivity in comparison to Cu. The decrease in Au binding by reduced and acetylated albumins despite an unoccupied Cys-34 can be due to its poor accessibility to the free thiol group (SH) after acetylation. Acetylation had no impact on the retention of Ds and LT4, maybe because their binding sites are buried in the cavities of the albumin 3D structure.

4.3. Albumin cysteinylolation (HNA1)

Incubating albumin with cystine led to reversible oxidation (HNA1) by cysteinylating Cys-34. This modification decreased the retention of Cu and Cd with a more pronounced effect on Cu. The oxidation of the Cys-34 residue could affect the conformation and dynamics of the N-terminal, lowering its binding activity, due to its close proximity with the oxidized Cys-34 residue [35]. Interestingly, Au binding was

increased as compared to the control solution (HSAc). Displacement of cystine (used as a chemical agent) from Cys34 by Au might explain this observation. Similarly, the binding of L-T4 was increased. A previous study [44] demonstrated, using, ^1H NMR, that Cys-34 cysteinylolation can alter the structure and the activity of the entire domain I and the interface between albumin domains I and II. Therefore, a fifth thyroxine binding site (Tr-5) composed by a mix of helices connecting domains I/II and subdomain IIIA [2] might have been exposed, thereby increasing the retention capacity of L-T4. Finally, similar to acetylation, cysteinylolation did not influence the retention of Ds, probably because of steric hindrance.

4.4. Irreversible albumin oxidation (HMA-HNA2)

Using hydrogen peroxide we detected trioxidized cysteine residues on disulfide bridges in HMA-HNA2, in accordance with the work of Paramasivan et al. [34]. The formation of mono/di-oxidized and irreversibly trioxidized cysteine and methionine residues decreased the capacity of native albumin to bind Au, contrary to what was observed with HNA1. Oxidation of cysteines involved in disulfide bridges and of tryptophan can be an indication of extensive structural alterations of albumin. A significant decrease in the retention of Ds is further proof of intense structural alterations affecting domain 1 of the albumin structure. Our irreversibly-oxidized-HSA enriched solution can serve to study role of these extensively modified isoforms in the various conditions mentioned above, particularly liver diseases [10].

4.5. Nitration of albumin (HMA-nitro)

For nitrosylated HSA enriched solutions, analysis of tryptic digests revealed only two nitrated tyrosine residues (Y-138 or Y-140: Fig. S3), never reported before. This low number of modifications may be due to poor nitrating capacity of our procedure or to the type of nitrating agent we employed. We think that a more adapted denaturation technique may improve the nitration procedure somewhat by exposing more tyrosine residues located in the secondary β -sheets structure and reducing the hindering effect caused by disulfide bonds [33]. However, the 3D structure of HSA would be irretrievably lost.

The decrease in Cu and Cd binding that we measured could be due to the modifications affecting the tyrosine residues and Cys-34, close to the N-terminal and the multi-metal binding sites. After reduction followed by nitration, Cys-34 became unoccupied and then assumingly nitrosylated, which could explain decreased Au binding. We believe that the nitrosylated form is less reversible and therefore less exchangeable with Au, contrary to what we observed with the cysteinylated form (HNA1). Affinity for the binding sites located in the cavities of albumin (Ds and LT4) was unaffected. This is possibly due to albumin structure self-assembly, caused by repulsive electrostatic unfolding in a charged acidic environment [45]. Accordingly, the nitrated-enriched-solution showed that the nitration/nitrosylation of albumin could have a similar effect to that observed during albumin cysteinylolation (HNA1), with a more pronounced effect on the functional activity of Cys-34. These results will help us understand more the imbalance between ROS/RNS and antioxidant defense systems, defined by the dysregulation of the redox state of Cys-34.

4.6. Albumin glycation (HMA-glyc)

Albumin reacted with glucose in a concentration-dependent manner where advanced forms of glycation were reported. Among glycosylated lysine residues, two new glycosylated sites were detected (K-73 and K-414: Fig. S4). Decreased binding capacity for Ds was observed, suggesting important structural alterations. The glycosylated isoforms had no impact on the binding capacity of the other ligands (Cu, Cd, Au and LT4). Glycation, like acetylation, affects mainly lysine residues, but it does not affect Cu and Cd binding contrary to acetylation. This can be due to steric

hindrance on the whole structure of albumin caused by lysine pKa, proximal carboxyl residues (Asp, Glu) that could be observed by molecular modeling [1].

4.7. Immunoturbidimetric quantification of isoforms-enriched solutions

Effective albumin (eAlb) as described by Baldassare et al. [15] refers to native albumin, the structure and functions of which are maintained. They demonstrated that eAlb can be quantified, and distinguished from total albumin concentration measured in clinical practice. Normally, patients with advanced liver injury present a decreased concentration of eAlb associated with an increase of other HSA isoforms. Our results showed that total albumin levels determined in control samples and in our isoforms-enriched solutions as measured by immunoturbidimetry were equivalent (Fig. 7), contrary to a previous study [46]. In their work, Etchepare Cassol et al. quantified carbamylated albumin directly after incubation with a KOCN without prior elimination of reaction chemicals, which might explain their observations. This confirms that the quantification of albumin by immunoturbidimetry is insensitive to its conformational states and, in patients with liver injuries, does not capture all the information about the hepatocyte environment nor the liver status.

5. Summary

Recently, albumin PTMs have gained popularity mostly as biomarkers in advanced liver diseases [10]. In this work, we present a comprehensive analysis of isoform-enriched solutions mimicking those found in different conditions, including diabetes, kidney and liver diseases. The deconvoluted spectra of each isoform-enriched solution and analysis of the site-specific modifications confirmed the presence of the isoform of interest in relatively high abundance. The presence of these isoforms did not affect HSA quantification by immunoturbidimetry. Finally, the different albumin isoforms showed altered binding capacities for different specific ligands. For future studies, this work will serve to investigate the pathogenicity of semi-synthetic HSA isoforms in cellular and animal models, with the aim of gaining a better understanding of their mechanisms under *in vitro* and physiological conditions.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CRedit authorship contribution statement

Roy Lakis: Writing – original draft, Conceptualization, Formal analysis, Data curation. **François-Ludovic Sauvage:** Formal analysis, Resources. **Emilie Pinault:** Formal analysis, Resources. **Pierre Marquet:** Writing – review & editing, Supervision. **Franck Saint-Marcoux:** Writing – review & editing, Supervision. **Souleiman El Balkhi:** Writing – review & editing, Project administration.

Declaration of competing interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

The authors would like to thank the BISCEM technical platform at the University of Limoges (Limoges, France).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126239>.

References

- [1] N. Kumari, D. Bandyopadhyay, V. Kumar, D.B. Venkatesh, S. Prasad, S. Prakash, P. R. Krishnaswamy, P. Balam, N. Bhat, Glycation of albumin and its implication in diabetes: a comprehensive analysis using mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta* 520 (2021) 108–117, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.06.001>.
- [2] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, Human serum albumin: from bench to bedside, *Mol. Asp. Med.* 33 (2012) 209–290, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002>.
- [3] M. Domenicali, M. Baldassare, F.A. Giannone, M. Naldi, M. Mastroroberto, M. Biselli, M. Laggetta, D. Patrono, C. Bertucci, M. Bernardi, P. Caraceni, Posttranscriptional changes of serum albumin: clinical and prognostic significance in hospitalized patients with cirrhosis, *Hepatology*. 60 (2014) 1851–1860, <https://doi.org/10.1002/hep.27322>.
- [4] M. Naldi, M. Baldassare, M. Nati, M. Laggetta, F.A. Giannone, M. Domenicali, M. Bernardi, P. Caraceni, C. Bertucci, Mass spectrometric characterization of human serum albumin dimer: a new potential biomarker in chronic liver diseases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 112 (2015) 169–175, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.12.001>.
- [5] J. Paulech, K.A. Liddy, K. Engholm-Keller, M.Y. White, S.J. Cordwell, Global analysis of myocardial peptides containing cysteines with irreversible sulfinic and sulfonic acid post-translational modifications, *Mol. Cell. Proteomics* 14 (2015) 609–620, <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.044347>.
- [6] R. Li, C. Klockenbusch, L. Lin, H. Jiang, S. Lin, J. Kast, Quantitative protein sulfenic acid analysis identifies platelet releasate-induced activation of integrin β_2 on monocytes via NADPH oxidase, *J. Proteome Res.* 15 (2016) 4221–4233, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00212>.
- [7] T.M. Jensen, D.R. Witte, D. Pieragostino, J.N. McGuire, E.D. Schjerning, C. Nardi, A. Urbani, M. Kivimäki, E.J. Brunner, A.G. Tabák, D. Vistisen, Association between protein signals and type 2 diabetes incidence, *Acta Diabetol.* 50 (2013) 697–704, <https://doi.org/10.1007/s00592-012-0376-3>.
- [8] R. Spinella, R. Sawhney, R. Jalan, Albumin in chronic liver disease: structure, functions and therapeutic implications, *Hepatol. Int.* 10 (2016) 124–132, <https://doi.org/10.1007/s12072-015-9665-6>.
- [9] K. Oettl, R. Birner-Gruenberger, W. Spindelboeck, H.P. Stueger, L. Dorn, V. Stadlbauer, C. Putz-Bankuti, P. Krisper, I. Graziadei, W. Vogel, C. Lackner, R. E. Stauber, Oxidative albumin damage in chronic liver failure: relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival, *J. Hepatol.* 59 (2013) 978–983, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.06.013>.
- [10] J. Alcaraz-Quiles, M. Casulleras, K. Oettl, E. Titos, R. Flores-Costa, M. Duran-Güell, C. López-Vicario, M. Pavesi, R.E. Stauber, V. Arroyo, J. Clària, Oxidized albumin triggers a cytokine storm in leukocytes through P38 mitogen-activated protein kinase: role in systemic inflammation in decompensated cirrhosis, *Hepatology*. 68 (2018) 1937–1952, <https://doi.org/10.1002/hep.30135>.
- [11] G. Rabbani, S.N. Ahn, Review: roles of human serum albumin in prediction, diagnoses and treatment of COVID-19, *Int. J. Biol. Macromol.* 193 (2021) 948–955, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.095>.
- [12] M. Baldassare, M. Domenicali, M. Naldi, M. Laggetta, F.A. Giannone, M. Biselli, D. Patrono, C. Bertucci, M. Bernardi, P. Caraceni, Albumin homodimers in patients with cirrhosis: clinical and prognostic relevance of a novel identified structural alteration of the molecule, *Sci. Rep.* 6 (2016) 35987, <https://doi.org/10.1038/srep35987>.
- [13] M. Naldi, M. Baldassare, M. Domenicali, F.A. Giannone, M. Bossi, J. Montomoli, T. D. Sandahl, E. Glavind, H. Vilstrup, P. Caraceni, C. Bertucci, Mass spectrometry characterization of circulating human serum albumin microheterogeneity in patients with alcoholic hepatitis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 122 (2016) 141–147, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.048>.
- [14] S. Das, J.S. Maras, Md.S. Hussain, S. Sharma, P. David, S. Sukriti, S.M. Shasthry, R. Maiwall, N. Trehanpati, T.P. Singh, S.K. Sarin, Hyperoxidized albumin modulates neutrophils to induce oxidative stress and inflammation in severe alcoholic hepatitis, *Hepatology*. 65 (2017) 631–646, <https://doi.org/10.1002/hep.28897>.
- [15] M. Baldassare, M. Naldi, G. Zaccherini, M. Bartoletti, A. Antognoli, M. Laggetta, M. Gagliardi, M. Tufoni, M. Domenicali, K. Waterstradt, P. Paterini, A. Baldan, S. Leoni, M. Bartolini, P. Viale, F. Trevisani, M. Bernardi, P. Caraceni, Determination of effective albumin in patients with decompensated cirrhosis: clinical and prognostic implications, *Hepatology*. 74 (2021) 2058–2073, <https://doi.org/10.1002/hep.31798>.
- [16] R. Jalan, K. Schnurr, R.P. Mookerjee, S. Sen, L. Cheshire, S. Hodges, V. Muravsky, R. Williams, G. Matthes, N.A. Davies, Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality, *Hepatology*. 50 (2009) 555–564, <https://doi.org/10.1002/hep.22913>.
- [17] J.M. Ashraf, G. Rabbani, S. Ahmad, Q. Hasan, R.H. Khan, K. Alam, I. Choi, Glycation of H1 histone by 3-deoxyglucosone: effects on protein structure and generation of different advanced glycation end products, *PLoS One* 10 (2015), e0130630, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130630>.
- [18] G. Rabbani, S.N. Ahn, Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: a natural cargo, *Int. J. Biol. Macromol.* 123 (2019) 979–990, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.053>.

- [19] J.G. Meyer, A.K. D'Souza, D.J. Sorensen, M.J. Rardin, A.J. Wolfe, B.W. Gibson, B. Schilling, Quantification of lysine acetylation and succinylation stoichiometry in proteins using mass spectrometric data-independent acquisitions (SWATH), *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27 (2016) 1758–1771, <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1476-z>.
- [20] M.S. Ljyasova, L.M. Schopfer, O. Lockridge, Reaction of human albumin with aspirin in vitro: mass spectrometric identification of acetylated lysines 199, 402, 519, and 545, *Biochem. Pharmacol.* 79 (2010) 784–791, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.10.007>.
- [21] K. Jiao, S. Mandapati, P.L. Skipper, S.R. Tannenbaum, J.S. Wishnok, Site-selective nitration of tyrosine in human serum albumin by peroxynitrite, *Anal. Biochem.* 293 (2001) 43–52, <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5118>.
- [22] B. Zoanni, M. Briochi, A. Mallia, E. Gianazza, S. Elgini, M. Carini, G. Aldini, C. Banfi, Novel insights about albumin in cardiovascular diseases: focus on heart failure, *Mass Spectrom. Rev.* (2021), <https://doi.org/10.1002/mas.21743>.
- [23] M.-A. Rahali, R. Lakis, F.-L. Sauvage, E. Pinault, P. Marquet, F. Saint-Marcoux, S. El Balkhi, Posttranslational-modifications of human-serum-albumin analysis by a top-down approach validated by a comprehensive bottom-up analysis, *J. Chromatogr. B* 1224 (2023), 123740, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123740>.
- [24] T. Peters, Ligand Binding by Albumin, *Albumin*, Elsevier, in, 1995, pp. 76–132, <https://doi.org/10.1016/B978-012552110-9/50005-2>.
- [25] M. Sokolowska, M. Wszelaka-Rylik, J. Poznański, W. Bal, Spectroscopic and thermodynamic determination of three distinct binding sites for Co(II) ions in human serum albumin, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 1005–1013, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.04.011>.
- [26] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, Human serum albumin: from bench to bedside, *Mol. Asp. Med.* 33 (2012) 209–290, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002>.
- [27] Y. Li, X.-P. Yan, C. Chen, Y.-L. Xia, Y. Jiang, Human serum albumin-mercurial species interactions, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 2277–2286, <https://doi.org/10.1021/pr0700403>.
- [28] X.-C. Shen, H. Liang, J.-H. Guo, C. Song, X.-W. He, Y.-Z. Yuan, Studies on the interaction between Ag(+) and human serum albumin, *J. Inorg. Biochem.* 95 (2003) 124–130.
- [29] A. Kawakami, K. Kubota, N. Yamada, U. Tagami, K. Takehana, I. Sonaka, E. Suzuki, K. Hirayama, Identification and characterization of oxidized human serum albumin. A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions, *FEBS J.* 273 (2006) 3346–3357, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05341.x>.
- [30] I. Petitpas, C.E. Petersen, C.-E. Ha, A.A. Bhattacharya, P.A. Zunszain, J. Ghuman, N.V. Bhagavan, S. Curry, Structural basis of albumin-thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 6440–6445, <https://doi.org/10.1073/pnas.1137188100>.
- [31] S. El Balkhi, J. Poupon, J.-M. Trocillo, F. Massicot, O. Laprévote, Human plasma copper proteins speciation by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. Solutions for columns calibration by sulfur detection, *Anal. Chem.* 82 (2010) 6904–6910, <https://doi.org/10.1021/ac101128x>.
- [32] T. Takahashi, T. Terada, H. Arikawa, K. Kizaki, H. Terawaki, H. Imai, Y. Itoh, S. Era, Quantitation of oxidative modifications of commercial human albumin for clinical use: thiol oxidation and carbonylation, *Biol. Pharm. Bull.* 39 (2016) 8.
- [33] Y. Zhang, H. Yang, U. Pöschl, Analysis of nitrated proteins and tryptic peptides by HPLC-chip-MS/MS: site-specific quantification, nitration degree, and reactivity of tyrosine residues, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 459–471, <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4280-9>.
- [34] S. Paramasivan, S.S. Adav, S.C. Ngan, R. Dalan, M.K.-S. Leow, H.H. Ho, S.K. Sze, Serum albumin cysteine trioxidation is a potential oxidative stress biomarker of type 2 diabetes mellitus, *Sci. Rep.* 10 (2020) 6475, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62341-z>.
- [35] A. Kawakami, K. Kubota, N. Yamada, U. Tagami, K. Takehana, I. Sonaka, E. Suzuki, K. Hirayama, Identification and characterization of oxidized human serum albumin: a slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions, *FEBS J.* 273 (2006) 3346–3357, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05341.x>.
- [36] R. Garcia-Martinez, P. Caraceni, M. Bernardi, P. Gines, V. Arroyo, R. Jalan, Albumin: pathophysiologic basis of its role in the treatment of cirrhosis and its complications, *Hepatology*. 58 (2013) 1836–1846, <https://doi.org/10.1002/hep.26338>.
- [37] G. Rabbani, E.J. Lee, K. Ahmad, M.H. Baig, I. Choi, Binding of tolperisone hydrochloride with human serum albumin: effects on the conformation, thermodynamics, and activity of HSA, *Mol. Pharm.* 15 (2018) 1445–1456, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00976>.
- [38] G. Rabbani, M.H. Baig, E.J. Lee, W.-K. Cho, J.Y. Ma, I. Choi, Biophysical study on the interaction between eperisone hydrochloride and human serum albumin using spectroscopic, calorimetric, and molecular docking analyses, *Mol. Pharm.* 14 (2017) 1656–1665, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01124>.
- [39] B. Lipinski, Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease, *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2011 (2011) 1–9, <https://doi.org/10.1155/2011/809696>.
- [40] F. Mori, L. Natali, R. Danesi, S. Nannizzi, C. Farina, Post-translational modifications and antioxidant properties of different therapeutic human serum albumins, *Int. J. Biol. Macromol.* 183 (2021) 927–935, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.046>.
- [41] S. El Balkhi, J.-M. Trocillo, J. Poupon, P. Chappuis, F. Massicot, N. Girardot-Tinant, F. Woimant, Relative exchangeable copper: a new highly sensitive and highly specific biomarker for Wilson's disease diagnosis, *Clin. Chim. Acta* 412 (2011) 2254–2260, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.08.019>.
- [42] D.W. Appleton, B. Sarkar, The absence of specific copper(II)-binding site in dog albumin, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 5040–5046, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)61966-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)61966-0).
- [43] M. Bernardi, Effective albumin – a novel paradigm in the management of decompensated liver cirrhosis, *J. Transl. Intern. Med.* 11 (2023) 11–14, <https://doi.org/10.2478/jtim-2022-0070>.
- [44] A.J. Stewart, C.A. Blindauer, S. Berezenko, D. Sleep, D. Tooth, P.J. Sadler, Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin: redox activity of albumin Cys34, *FEBS J.* 272 (2005) 353–362, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2004.04474.x>.
- [45] K. Baler, O.A. Martin, M.A. Carignano, G.A. Ameer, J.A. Vila, I. Szeleifer, Electrostatic unfolding and interactions of albumin driven by pH changes: a molecular dynamics study, *J. Phys. Chem. B* 118 (2014) 921–930, <https://doi.org/10.1021/jp409936v>.
- [46] J.P. Etchepare Cassol, R. Scolari, R.N. Moresco, Impact of albumin carbamylation on immunoturbidimetric measurement of urinary albumin, *Anal. Biochem.* 614 (2021), 114047, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.114047>.

IV.1.3. Discussion et perspectives

L'albumine est très sensible aux environnements chimiques intra et extra cellulaire, ce qui entraîne des modifications chimiques et la création d'isoformes. Des découvertes expérimentales récentes suggèrent que certaines isoformes d'albumine pourraient jouer un rôle dans le développement de l'insuffisance rénale ou hépatique. Cela justifie une exploration et une compréhension plus approfondie des mécanismes qui sous-tendent ces effets néfastes.

Dans cette étude, nous avons cherché à explorer les différents aspects des isoformes générées par les modifications post-traductionnelles de l'HSA, y compris leurs mécanismes de pathogénicité et leurs structures, qui sont fortement liées à la capacité de l'HSA à remplir ses fonctions non oncotiques, à savoir l'activité antioxydante et la liaison aux ligands.

Pour ce faire, on a produit des solutions enrichies d'isoformes de l'HSA à partir d'une préparation commerciale d'albumine par le biais de réactions chimiques que nous avons optimisées. Malgré nos efforts d'optimisation, la transformation complète en isoformes pures s'est avérée difficile en raison de la complexité de l'albumine et de la pureté très relative de la solution d'albumine commerciale. Plusieurs équipes ont signalé la présence d'isoformes de HSA dans des solutions commerciales (228,229). Diverses méthodes d'optimisation ont été essayées pour augmenter la proportion d'albumine native avant d'effectuer des modifications pour obtenir des solutions pures d'isoformes spécifiques, mais elles n'ont pas été couronnées du succès espéré, à savoir des solutions d'isoformes pures.

L'efficacité des modifications induites par les réactions chimiques a été vérifiée en utilisant les deux approches protéomiques top-down et bottom-up déjà établies par notre équipe (chapitre 3 ; article 1).

Quant à l'identification des isoformes, on s'est basé sur les différences de masse observée dans les pics déconvolués par rapport à l'isoforme d'origine, en utilisant les données générées par l'approche top-down sans séparation chromatographique préalable. Il convient de noter que des erreurs d'identification peuvent se produire en raison de la proximité des pics déconvolués, en particulier avec les écarts de masse de 1 à 5 Da admis habituellement lors de l'application de la déconvolution (226). Cette faible différence de masse entre certains pics est attribuable à diverses modifications, telles que les formes oxydées, où la différence de masse entre une forme et une autre ne dépasse pas 16 Da.

Pour l'acquisition des données lors de l'analyse bottom-up, le mode d'acquisition dépendant des données (DDA), également connu sous le nom de mode d'acquisition dépendant de l'information (IDA), a été appliqué. Tous les peptides situés dans une certaine gamme de masse sont fragmentés dans la spectrométrie de masse en tandem. En mode DDA, le spectromètre de masse sélectionne les ions peptidiques les plus intenses dans une première étape de spectrométrie de masse en tandem, puis les fragmente et les analyse dans une seconde étape de spectrométrie de masse en tandem. Cette méthode pourrait potentiellement sous-estimer l'importance de certaines modifications post-traductionnelles (PTM) moins marquées, car elles peuvent être masquées par des PTM plus prononcées, entraînant ainsi une perte significative d'informations concernant les modifications spécifiques de la séquence peptidique.

En raison de problèmes techniques, nous n'avons pas pu poursuivre l'un de nos objectifs initiaux, à savoir l'étude de l'impact de ces solutions isoformes sur deux modèles de cellules hépatiques in vitro. Ce qui a compliqué notre mission, c'est l'incapacité des cellules à

produire suffisamment d'albumine pour être détectée par spectrométrie de masse. De plus, nous avons tenté, sans succès, d'évaluer la capacité des cellules à se développer en l'absence de sérum de veau fœtal afin d'éviter toute compétition entre l'albumine produite par les cellules hépatiques et celle présente dans le milieu de culture.

Toutefois, l'obtention des solutions purifiées d'isoformes a été utile pour une validation in vitro du SEB test. Une fois les modifications validées, nous avons examiné l'effet de ces solutions isoformes sur la capacité de liaison de l'HSA à l'aide de SEB test, ainsi que leur influence sur la quantification de l'albumine à l'aide d'un test immunoturbidimétrique couramment utilisé. Au cours de l'étude des capacités de liaison de SEB test, il a été observé que les valeurs de rétention de certains ligands dépassaient les valeurs attendues par rapport aux valeurs théoriques et expérimentales précédemment rapportées. Ceci pourrait être attribué à des interactions non spécifiques qui sont eux même encore influencé par les modifications structurelles de HSA.

Sur la base de cette discussion, plusieurs perspectives peuvent être envisagées :

Les réactions chimiques pourraient être optimisés pour obtenir un meilleur pourcentage d'isoformes spécifiques, ce qui pourrait nécessiter des procédés et du matériel de purification spécifique et une expertise en chimie organique, non disponible dans notre unité.

D'autre part, les solutions enrichies en isoformes doivent être analysées en utilisant la méthode top-down de quantification absolue récemment mise au point pour une plus grande précision dans l'identification des isoformes, en particulier lorsqu'il s'agit de formes oxydées. Cela devrait réduire nos doutes en éliminant les écarts de masse de 1 à 5 Da déjà signalés.

Ensuite, pour l'analyse des sites de modifications spécifiques, nous pensons qu'une analyse utilisant le mode DIA (acquisition indépendante des données) est nécessaire pour une étude plus approfondie de la présence des PTM de l'HSA. En mode DIA, pour chaque cycle, l'instrument se concentre sur une fenêtre de masse étroite de précurseurs et acquiert des données MS/MS de tous les précurseurs détectés dans cette fenêtre. Cette fenêtre de masse est ensuite étendue à l'ensemble de la gamme de masse, ce qui permet de recueillir systématiquement des données MS/MS pour chaque masse et pour tous les précurseurs détectés sans se limiter seulement aux ions peptidiques les plus intenses.

Comme pour le Serum Enhanced Binding (SEB) test, les comportements inattendus de l'HSA liant davantage d'atomes devraient être étudiés à l'aide de la modélisation moléculaire afin d'obtenir une compréhension structurelle plus approfondie des interactions non spécifiques ainsi que le comportement de la structure de l'HSA face aux PTM.

Enfin, ces travaux représentent une étape importante dans la compréhension des complexités des isoformes HSA et de leur rôle potentiel dans la pathogenèse des maladies. Ce qui rend ces travaux encore plus intéressants, c'est la révélation que l'albumine présentent des capacités de liaison distinctes pour des ligands spécifiques en fonction des isoformes présentes. Cette découverte suggère que ces isoformes peuvent jouer des rôles uniques dans divers processus physiologiques et pathologiques.

Pour l'avenir, cette étude ouvre une série de pistes de recherche passionnantes. Tout d'abord, elle ouvre la voie à l'étude de la pathogénicité des isoformes de HSA dans des modèles cellulaires et animaux. Cette approche pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de pathogénicité de ces isoformes dans des conditions *in vitro* contrôlées, ainsi que dans des environnements physiologiques complexes. La collaboration avec d'autres équipes sera nécessaire pour développer des modèles cellulaires et animaux prometteurs.

Cette étude nous permet de retenir les points clés suivants :

- **La mise à disposition d'informations cruciales sur la majorité des PTM dans l'albumine à partir de solutions enrichies d'isoformes spécifiques, y compris les caractéristiques de ces isoformes et les sites de ces modifications, typiquement observées dans diverses conditions pathologiques, y compris les maladies du foie.**
- **Nous avons démontré que les isoformes d'albumine n'ont pas eu d'incidence sur la mesure de l'albumine par immunoturbidimétrie. Cela met en évidence le fait que cette méthode, couramment utilisée en pratique clinique, demeure insensible aux modifications structurelles de l'albumine, ce qui signifie qu'elle ne peut pas refléter avec précision l'état des hépatocytes et du foie.**
- **Nous avons présenté des résultats préliminaires sur le comportement discriminatoire d'isoformes spécifiques de l'HSA vis-à-vis de ligands spécifiques couvrant la quasi-totalité de la structure de l'HSA. Ces notions ont été utilisées comme éléments substantiels dans la preuve de concept du SEB test.**

IV.2. Article 4. Détection précoce des lésions hépatiques par le Serum Enhanced Binding test sensible aux modifications post-traductionnelles de l'albumine

IV.2.1. Introduction à l'article 4

Bien que le test SEB ait été développé préalablement avant les travaux décrits dans l'article 3, nous le présentons en dernier, car les travaux antérieurs fournissent des éléments substantiels de validation de concept.

Étant donné que l'albumine est exclusivement synthétisée dans le foie, qu'elle a de nombreux ligands et sites de liaison, il est maintenant évident que la qualité de l'albumine, en plus de sa quantité, peut être un indicateur de dysfonctionnement hépatique. De manière logique, il semble possible d'exploiter ces PTM. Cependant, les méthodes de dosage de l'albumine couramment utilisées en biochimie ne permettent pas de détecter de telles PTM comme démontré dans l'article 3.

Dans cette étude, nous posons l'hypothèse que les PTM se produisent tôt dans les lésions hépatiques et peuvent avoir un impact sur les propriétés de liaison de l'HSA avec divers ligands. Par conséquent il est possible d'utiliser les PTM de l'albumine en tant que biomarqueurs précoces d'une altération de la fonction hépatique, en exploitant la corrélation significative entre la structure secondaire, voire tertiaire, de l'HSA et la capacité de ses sites de liaison à remplir leurs fonctions.

De ce fait, le SEB test a été conçu dans le but premier de servir d'essai fonctionnel pour la détection des PTM de l'HSA. Cela a été illustré par les résultats obtenus lors de l'application du SEB test aux isoformes semi-synthétiques d'albumine décrites dans l'article 3. En outre, son utilité potentielle en tant que biomarqueur précoce du dysfonctionnement hépatique était un aspect crucial de cette étude.

Outre les isoformes semi-synthétiques, nous avons cherché à évaluer le SEB test dans des modèles animaux d'insuffisance hépatocellulaire. La pertinence du modèle, qui reproduit les conditions réelles des lésions hépatiques, était un élément essentiel de cette étude. L'étude a également cherché à caractériser les conséquences structurelles et dynamiques de ces modifications par le biais de la modélisation moléculaire et à fournir une interprétation complète des résultats du test SEB dans le contexte plus large de l'évaluation de la santé du foie.

Cette approche à multiples facettes contribue à l'ensemble des connaissances scientifiques relatives à la fonction hépatique et aux méthodologies de diagnostic, ce qui nous permettra d'améliorer notre capacité à diagnostiquer et à surveiller les troubles hépatiques.

IV.2.2. Article 4: Early detection of liver injuries by the Serum Enhanced Binding test sensitive to albumin post- translational modifications.

Article soumis dans le journal *Scientific report* et est en cours de révision depuis le 22 septembre 2023.

Les données supplémentaires de l'article 4 sont disponibles en Annexe 4.



Preprints are preliminary reports that have not undergone peer review.
They should not be considered conclusive, used to inform clinical practice,
or referenced by the media as validated information.

Early detection of liver injuries by the Serum enhanced binding test sensitive to albumin post-transcriptional modifications

Souleiman El Balkhi (✉ souleiman.elbalkhi@chu-limoges.fr)

P&T, UMR1248, Inserm, Univ. Limoges

Mohamad Ali Rahali

P&T, UMR1248, Inserm, Univ. Limoges

Roy Lakis

P&T, UMR1248, Inserm, Univ. Limoges

François Ludovic Sauvage

P&T, UMR1248, Inserm, Univ. Limoges

Marving Martin

P&T, UMR1248, Inserm, Univ. Limoges

Angelika Janaszekiewicz

P&T, UMR1248, Inserm, Univ. Limoges

Roland Lawson

P&T, UMR1248, Inserm, Univ. Limoges

Ruben Goncalves

P&T, UMR1248, Inserm, Univ. Limoges

Paul Carrier

P&T, UMR1248, Inserm, Univ. Limoges

Veronique Loustaud-Ratti

P&T, UMR1248, Inserm, Univ. Limoges

Anne Guyot

CHU Limoges

Pierre Marquet

P&T, UMR1248, Inserm, Univ. Limoges

Florent Di Meo

P&T, UMR1248, Inserm, Univ. Limoges

Franck Saint-Marcoux

P&T, UMR1248, Inserm, Univ. Limoges

Article

Page 1/24

Keywords: DILI, biomarker, Post-transcriptional modification, albumin, ligand binding.

Posted Date: August 29th, 2023

DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3228457/v1>

License: © ⓘ This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

[Read Full License](#)

Abstract

Background: Early and sensitive biomarkers of liver dysfunction and drug-induced liver injury (DILI) are still needed, both for patient care and drug development.

Methods: We developed the Serum Enhanced Binding (SEB) test to reveal post-transcriptional modifications (PTMs) of human serum albumin resulting from hepatocyte dysfunctions and further evaluated its performance in an animal model. The SEB test consists in spiking serum ex-vivo with ligands having specific binding sites related to the most relevant albumin PTMs and measuring their unbound fraction. To explore the hypothesis that albumin PTMs occur early during liver injury and can also be detected by the SEB test, we induced hepatotoxicity in male albino Wistar rats by administering high daily doses of ethanol and CCl₄ over several days. Blood was collected for characterization and quantification of albumin isoforms by high-resolution mass spectrometry, for classical biochemical analyses as well as to apply SEB test.

Results: In the exposed rats, the appearance of albumin isoforms paralleled the positivity of the SEB test ligands and histological injuries. These were observed as early as D3 in the Ethanol and CCl₄ groups, whereas the classical liver tests (ALT, AST, PAL) significantly increased only at D7. The behavior of several ligands were supported by structural and molecular simulation analysis.

Conclusion: The SEB test and albumin isoforms revealed hepatocyte damage early, before the current biochemical biomarkers. The SEB test should be easier to implement in the clinics than albumin isoform profiling.

1. Introduction

Post-translational modifications (PTMs) of Human serum albumin (HSA) have gained interest recently as biomarkers of advanced liver diseases¹⁻¹¹. HSA may undergo several PTMs including truncations, acetylation, cysteinylolation, homocysteinylolation, glutathionylation, glycation, nitrosylation, nitration, phosphorylation and oxidation¹². They translate in modifications of albumin binding properties [5]. This aspect has been exploited by Bar-Or et al., who proposed the albumin cobalt binding test (ACB) also known as the Ischemia Modified Albumin test (IMA) to detect cardiac ischemia [6]. The IMA test is based on the fact that cardiac ischemia is associated with modifications in the structure of albumin and, thus, in the capacity of a specific binding site to bind cobalt. Since the approval of the IMA as a biomarker of cardiac ischemia by the FDA (Regulation number: 862.1215; <http://www.accessdata.fda.gov>), this test has also been investigated in liver diseases showing correlation with the severity of cirrhosis^{7,13-15}. Briefly, the IMA test is performed by adding CoCl₂ and dithiothreitol to serum, followed by colorimetric measurement of the (free-Co)-dithiothreitol complex at 470 nm.

Thereafter, the clinical relevance of other albumin modifications has been investigated in advanced liver diseases^{10,12}. PTMs related to Cys34 oxidation have been the most studied. They are characterized on

the basis of the redox state of Cys34 as follows: (i) Human mercaptalbumin (HMA), also known as reduced HAS or native HSA (70 -80% of total HAS in healthy subjects); (ii) Nonmercaptalbumin 1 (HNA1), a reversibly oxidized form (20 – 30%); and (iii) Nonmercaptalbumin 2 (HNA2), an irreversibly oxidized form of albumin (< 5%) ¹². The increase in HNA1 and HNA2 has been documented in end-stage liver pathologies, with a progressive increase of these isoforms in severe cirrhosis that is associated with a very high short-term mortality ^{4,9,10}. PTMs involving sites others than Cys34 were also reported. N- or C-terminal truncated, as well as glycosylated, forms were found in plasma samples from patients with acutely decompensated cirrhosis or severe alcoholic hepatitis ⁴. Interestingly, HNA1 played a pejorative role in decompensated cirrhosis ¹⁶, whereas native HSA had a protective role by reducing the proinflammatory environment present in patients with acutely decompensated cirrhosis ¹⁷. At present, it is not fully established whether other albumin isoforms possess yet uncharacterized biological properties.

This bundle of arguments strongly suggests that albumin modifications detected in blood may reflect the dys/function of hepatocytes and could represent a versatile tool for the diagnosis and the prognosis of liver injuries and/or diseases. Since HSA is continuously and exclusively synthesized and matured in the liver, albumin modifications may be directly related to the chemical environment into the hepatocytes, hence any liver dysfunction. Also, due to its peculiar structure, to its abundance in blood (60% of all proteins), to the multiplicity of its ligands and binding sites and to its role as the primary scavenger, it is now clear that not only the quantity, but also the quality of albumin could impact its physiological roles.

We here hypothesize that PTMs occur at early stages of liver injuries. Furthermore, given that some of PTMs locally modify albumin structure, we assume that modulations of binding properties of HSA can be associated with different structural dynamics. This can in turn be indirectly revealed by investigating HSA binding capacity for different ligands. Interestingly, it was reported that each of the following ligands has a specific binding site on HSA: (i) gold (Au) binds preferentially to Cys34; (ii) copper (Cu) to the N-terminal binding site; (iii) cadmium (Cd) to the multi-metal binding site; (iv) L-thyroxine up to 5 specific binding sites and (v) dansylsarcosine to drug site 2[8].

On these premises, this study aimed to: (i) develop the serum enhanced binding (SEB) test, using all the ligands mentioned above, as a functional test of PTMs and an early biomarker of liver dysfunctions; (ii) evaluate the SEB test as well as albumin PTMs in an animal model repeatedly exposed to toxic doses of ethanol and Carbon tetrachloride (CCl₄); (iii) investigate the impact of PTMs onto the structure and dynamics of albumin, (iv) interpret the results of the SEB test in light of albumin PTMs, classic hepatic laboratory tests and liver histology.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals:

The ligand solutions were prepared using reagents purchased from Sigma-Aldrich: cobalt(II) chloride (CAS: 7646-79-9), gold(III) chloride trihydrate (CAS: 16961-25-4), copper(II) chloride (CAS: 7447-39-4),

silver acetate (CAS: 563-63-3), and L-thyroxine sodium salt pentahydrate (CAS: 6106-07-6). Dansylsarcosine Piperidinium Salt (>95%) was obtained from RareChemicals GmbH. All ligands were diluted with MilliQ purified water, and their pH levels were measured before use. Human albumin Valebex, 200 mg/mL, was utilized to test binding capacity.

2.2 Setting up the Serum Enhanced Binding (SEB) test

2.2.1. Patients

We collected residual serum samples from 90 patients admitted to Limoges University Hospital, following their consent for the use of residual biological materials, in accordance with local and French regulations (Code de la Santé Public, Art. L1211-2) and the declaration of Helsinki for experiments involving human subjects. The study was coordinated by the University Hospital of Limoges and the biocollection was authorized by the French Ministry of Health and registered under numbers DC 2010-1074 and AC-2016-2758, in accordance with the French Bioethics Act 2011-814 of July 7, 2011. Informed consent has been obtained from all patients.

Among the 90 collected samples, 45 were obtained from control patients without hepatic impairment, and the remaining 45 were from patients at various stages of cirrhosis. The serum samples, collected in dry tubes and sent to the laboratory for routine biochemical tests, were used in this study after the completion of routine analyses. Control patients were included when their clinical diagnosis did not indicate any liver dysfunction, and their levels of transaminases (AST, ALT), alkaline phosphatases (ALP), gamma-glutamyl transferases (GGT), total and conjugated bilirubin (BILIT, BILID), and lactate dehydrogenase (LDH) were within normal ranges. Cirrhotic patients, classified as cirrhosis A, B, or C using Child-Pugh scores, were diagnosed according to BAVENO VII recommendations ¹⁸.

2.2.2. Analytical procedures

2.2.2.1. Ligands optimization

We first evaluated the global capacity of serum to bind Cu, Au, L-thyroxine, Cd and dansylsarcosine in patients with no liver dysfunction. Each ligand was independently added in increasing concentrations to patient serum samples in order to obtain HSA/ligand theoretical ratios (mol/mol) of 1/1, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/500, and 1/1000 when possible. These theoretical ratios were calculated with 0.6 mM as an average concentration HSA in the serum.

Six different serum samples (from six different patients) per ligand and per ratio were used for this evaluation. After incubation for 30 min at 4°C, the serum samples were ultrafiltrated on Amicon® filters with a 30 kDa cut-off and 10 µL of the ultrafiltrate was then diluted in HNO₃ 0.1 M before analysis using a multi-element ICP-MS method for the determination of free (unbound) concentrations of Cu, Au, Cd, iodine (for L-Thyroxine) and sulfur (for dansylsarcosine). The bound fractions as well as the concentration ratios of HSA/bound ligand (mol/mol) were then calculated.

To confirm that the binding is only due to HSA and that there is no unspecific binding, we performed the same tests on a commercial human albumin solution Valebexâ, 200mg/mL. This allowed us to determine for each ligand its maximum unspecific binding capacity. These thresholds were then set to best discriminate between serum samples containing mostly modified HSA or mostly native HSA.

Comparison of HSA binding capacities in patients with liver cirrhosis or no hepatic dysfunction:

After establishing the threshold for >90% albumin binding for each ligand, we proceeded to apply the Serum Enhanced Binding (SEB) test to a separate group of patients: 12 diagnosed with cirrhosis and 12 with no liver dysfunction. It's important to note that these patients were different from those used in the analytical development of the SEB test.

In brief, independent solutions of Cu and Cd at 1190 µM, Au at 11900 µM, and L-thyroxine at 75 µM were individually incubated with 200 µL of serum for Cd, Cu, L-thyroxine, and dansylsarcosine to achieve HSA/ligand theoretical ratios (mol/mol) of 1/5. For Au, 50 µL of serum was incubated to obtain an HSA/ligand ratio of 1/50. The same ligands and concentrations were also applied to rat plasma albumin in our animal models for comparison.

2.2.2.2. ICP-MS analysis:

Calibration curves were constructed for each element using a six-point calibration range of 10 to 100 µg/L for Cu, Cd, Au, and sulfur, and 1 to 20 µg/L for L-thyroxine. Sulfur calibration employed L-cysteine, while iodine calibration utilized L-thyroxine. The KED mode was applied with oxygen at a flow rate of 0.3 ml/min for both calibrators, controls, and ultrafiltrates. When necessary, ultrafiltrates were diluted with 0.1 M HNO₃. Cu was measured at m/z 65, Cd at m/z 112, Au at m/z 197, iodine at m/z 127, and sulfur at m/z 48, following previously described methods¹⁹. To standardize SEB test results across samples, the concentration of each ligand in the ultrafiltrate was normalized by the total albumin concentration in the sample.

2.3 Animal experiments:

All animal care and experimental procedures were approved by the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (APAFIS reference APAFIS#20354-2019042414581742) and were performed in accordance with the guidelines for animal experimentation of the European Communities Council Directive (EU/63/2010). These experiments and procedures are reported according to the ARRIVE guidelines^{20,21} with the recommendations made by French Ministry of Higher Education. All methods are reported in accordance with ARRIVE guidelines (<https://arriveguidelines.org>).

For all included animals, weight was recorded daily throughout the experimental period until sacrifice. Animals were euthanized with intraperitoneal injection of pentobarbital (150 mg/kg). Blood was collected in Vacutainer® lithium heparin tubes (Beckton Dickinson, France) and centrifuged at 3000 rpm for 10

minutes. The resulting plasma samples were stored at -80 °C for analysis. The liver was promptly excised and fixed in formalin for histological analysis.

2.3.1. Induction of ethanol (EtOH) hepatotoxicity:

Six different groups of 6 rats were orally administered (by gavage) 2 mL of a 50% EtOH solution (equivalent to 0.4 g or 1.6 g/kg of body weight) prepared in physiological saline (0.9% NaCl). The groups were followed for 1, 3, 7, 10, or 14 days, respectively to evaluate the time-dependent changes in biochemical markers and histological liver injuries. The animals were sacrificed 24 hours after their last intake of EtOH. Control rats (n=6) received 0.9% NaCl by gavage for 14 days.

2.3.2. Induction of carbon tetrachloride (CCl₄) hepatotoxicity:

Five groups of 6 rats were orally administered (by gavage) 1 mL/kg body weight of a 30% solution of CCl₄ diluted in olive oil (equivalent to 1.594 g/kg of body weight). The groups were followed for 1, 3, 7, 10 days, respectively and the animals were sacrificed 24 hours after their last intake of CCl₄. Control rats (n=6) received olive oil by gavage for 10 days.

2.3.3. Pathological analysis of the liver

After animal sacrifice, the liver was cut into sections of 1 to 1.5 cm perpendicular to the major axis to allow homogeneous fixation in a 4% formalin solution, and kept at ambient temperature for a maximum of 7 days. Samples were stained for light microscopy with hematoxylin, eosin and Masson's trichrome. The pathologist performed histological analysis blindly of the experimental groups.

2.3.4 Biochemistry analyzes

From the collected plasma, measurements of classic biochemistry parameters such as albumin (ALB), total (BILIT) and conjugated (BILID) bilirubin, aspartate aminotransferases (ASAT), alanine aminotransferases (ALAT) and alkaline phosphatases (PAL) were determined using a COBAS® 8000 system (Roche, Germany).

2.3.5. Characterization and quantification of albumin isoforms in rat plasma

Albumin isoforms were determined using the method described elsewhere²². Briefly, 20 µL of plasma were diluted with 980 µL of an aqueous solution of 20mM ammonium formate with 0.1 % formic acid, vortex-mixed before filtration on a 0.22 µm cellulose filter and then injected on LC-HR-MS system (Nexera LC40 system coupled to a TripleTOF® 5600+, Shimadzu, Noisiel, France and Sciex, Concord, Canada). The LC-HRMS data were processed using PeakView® 2.2 and its Bio Tool Kit 2.2.0 (Sciex). The input MS spectra were filtered-in between 1300 to 1600 and then deconvoluted at low resolution (5000) between m/z 1,000 to 200,000.

2.4 Molecular dynamics simulations:

The initial HMA model was obtained from the protein data bank (PDB ID 5GIX) which has been co-crystallized with seven palmitate (PLM) molecules²³. Missing N- and C-terminal residues were added using the Modeller software²⁴. Protonation states of titratable residues (namely arginine, lysine, glutamate and aspartate) were determined using the H++ server assuming a physiological pH at 7.4. Since HMA was shown to be natively bound to PLM with a molecular ratio ranging from 0.1 to 2.0 in physiological conditions, we built the present HMA model with two PLM molecules, which were considered docked in fatty acid binding sites (FABS) 2 and 5^{25,26}. The apo form of HMA was also considered in the present investigations. Three models of palmitate-bound PTM albumins were also built in the present study, namely HNA1, HNA2 and N-truncated HMA. All systems were solvated in explicit water box for which minimal distance between atoms and box edges were set up at 10 Å. Systems were all neutralized considering physiological NaCl salt concentration ([NaCl] = 154 mM). FF14SB²⁷ and TIP3P^{28,29} forcefields were used to respectively model protein residues and water molecules. Parameters from Joung and Cheatham³⁰ were used to model Na⁺ and Cl⁻ counterions. Parameters for PLM, S-bonded cysteine were derived from Lipid17³¹ and FF14SB force fields while those for cysteic acid residues were derived from amber 99SB-based parameters available in the literature³². Each replica was minimized and then equilibrated for 10.25 ns. MD production run were performed for 2 ms. Simulations were analyzed using the CPPTRAJ package³³, and in house python scripts. Plots were obtained using the matplotlib v3.7.0 Python package³⁴. Rendering was prepared using VMD software (alpha-v1.9.4). Structural clustering was carried out using density peak algorithms³⁵, with inter-subdomain distances as metrics. Clusters representing more than 10% of the overall conformational space were considered. Allosteric communications were calculated with Allopath Tool³⁶.

3. Results

3.1 Enhanced binding capacity of serum/HSA

By adding increasing concentrations of Cu to serum, we observed that up to 12 Cu atoms per albumin molecule were retained on the filter with an average retention of 95%. This percentage dropped to 40% or less when more Cu was added (Figure 1). Serum samples were able to bind up to 150 atoms of Au, 50 atoms of Cd, 2.5 molecules of dansylsarcosine and 10 molecules of L-thyroxine per molecule of albumin, all with near 100% retention. However, L-thyroxine could not be tested further than 1/10 (HSA/L-thyroxine) because of dissolution problems. The binding capacities of the commercial solution of pure HSA Valebex[®] at 200mg/mL (40 Cu per HSA and 150 Au per HAS for example) were equivalent or higher than those of patient serum samples (data not shown), suggesting that binding to other proteins is negligible.

3.2 Comparison of HSA binding capacities in patients with liver cirrhosis or no hepatic dysfunction:

Among the 45 cirrhotic patients, 17 (37.8%) were diagnosed with Child-Pugh score A, 16 patients (35.5%) Child-Pugh B and 10 patients (22.2%) Child-Pugh C. The ligands of the SEB test had individually excellent sensitivity and specificity to discriminate cirrhotic patients from control patients (Figure 2). All

cirrhotic patients had at least 3 ligands above threshold (except one patient who had only 2) (Figure 3): 26 patients (57.8%) had 5 ligands above threshold, 9 patients (20%) had 4 and only 7 patients (15.5%) had 3 positive ligands. Among the 45 control patients, only 4 patients had one ligand above threshold. None of the ligands alone was able to discriminate patients regarding their Child-Pugh score (Figure 2).

3.3 Early diagnostic performance of the SEB test in animal models

After daily administration of 1.6 g ethanol/kg or 1.59 g CCl₄/kg of body weight to different rat groups, the SEB test was performed in the serum of all rats using Cu, Cd, L-thyroxine, dansylsarcosine at 1:5 mol ratio and Au at 1:50 mol ratio as described above. In the EtOH model, on D14, all rats were positive for all ligands except dansylsarcosine (Figure 4.A). The Au binding capacity was decreased on D1 (24h after the first dose), restored on D7 and reduced again thereafter. The same behavior was observed for the binding capacity of Cu and L-thyroxine. In contrast, the binding capacity of Cd was only decreased on D14 (Figure 4.B). In the CCl₄ model, albumin-binding capacities were reduced for Cu, Au and dansylsarcosine (except on D7), but not for Cd at any time (Figure 4.B).

In both models, the decrease of albumin-binding was paralleled by albumin modifications. Native albumin was decreased as soon as 24h after the administration of hepatotoxic compound. It then increased back at D3 and D7 in the CCl₄ and EtOH models, respectively, prior to a final drop observed at D10 or D14. Decreases in native albumin were associated with increases of ALB isoforms, as shown in figure 1 (e.g., ALB+Cys, ALB+SO₂H or glycated albumin, see Figure 4.A and 4.B).

In the EtOH model, a significant increase in AST level was observed at D7, D10 and D14 (Table 1). In the CCl₄ model, AST and ALT levels were significantly increased at all time points and bilirubin (BILIT & BILID) levels at D7 and D10 (Table 2). Histologically, only minor inflammation was detected in some rats receiving ethanol. Rats exposed to CCl₄ exhibited steatosis from D3 onwards and 2 rats exhibited fibrotic liver tissue (1 on D3 and 1 on D10).

3.4 Structural variabilities of HSA isoforms

The secondary structure of albumin was not affected by Cys34 oxidation nor N-truncation as pictured by the backbone root-mean square deviations (RMSD) versus X-ray structure²³ ranging from ca 3.0 and 5.0 Å (Supplementary Figure S1-S4). MD simulations revealed that albumin isoforms adopted different conformational dynamics of inter-domain arrangements. Inter-subdomain distances were monitored showing the impact from Cys34 oxidation or N-truncation (Supplementary Figure S5). This is particularly true for following subdomain pairs: IA-IIIB, IB-IIIB IIA-IIIB and to a lesser extent IA-IIA, IA-IIB IIA-IIIA. Representative structures were obtained from structural clustering and are shown in Figure 5. Palmitate-bound HMA and HNA2 isoform exhibited similar patterns in which the overall structure showed dynamic closing of central cleft defined by the distance between domains I and III for which domain II acts as pivot. Palmitate-bound HNA1 and D^{DA} HMA isoforms showed less variability in term of domain arrangements. Palmitate-bound HNA1 clusters are slightly more open cleft conformations, The N-

truncated D^{DA} HMA isoform only populated open-cleft conformations pictured by larger distances between subdomain IA/IB and IIIB (Figure 5c and Supplementary Figure S5). This was confirmed by largest RMSDs when comparing D^{DA} HMA subpopulations with other isoforms (Supplementary Figure S6).

Subtle differences in term of structural dynamics were observed by comparing per-residue root-mean-squared fluctuations with those of native HMA (DRMSF, Figure 5b). Simulations revealed larger deviations for domains I and III. This is particularly true for the domain I of D^{DA} HMA isoforms which exhibited DRMSF up to 1.5 Å. To lesser extent, HNA1 and HNA2 also exhibited similar trends.

Albumin PTMs leads to subtle but significant differences which may be associated with different binding capacities. Different dynamics for the bound palmitate molecules were observed. The FA5 palmitate molecule showed larger structural variability for HMA than for other isoforms as shown by different binding modes for during MD simulations. In contrast, FA5 palmitate molecule remains tightly bound for HNA1, HNA2 and D^{DA} HMA isoforms. It may suggest a lower binding affinity for HMA which might favour palmitate substitution by other ligands. Interestingly, no significant difference regarding palmitate dynamics in FA2 was observed. This might be explained by (i) the known highest affinity of FA2^{25,37} and (ii) its location in domain IIA which was not shown to be affected by PTMs.

Albumin PTMs might affect the distant communications between the different subdomains. To this end, the efficiency of the information flow from Cys34 or Asp1-Ala2 sequence to different substrate binding sites were assessed for every systems (Figure 1e). Allosteric communications from Cys34 to all binding sites is significantly lower in the N-truncated D^{DA} HMA isoform than in others. Likewise, HNA1 and HNA2 isoforms exhibited lower allosteric communications from N-terminal region to all binding sites. Oxidation of Cys34 might disrupt the propagation of the information flow from N-terminal domain to the rest of the protein. Finally, metal binding capacities were assessed by simply considering electrostatic potentials for each representative snapshots (Supplementary Figure S7). Open-cleft conformations lead to more exposed electropositive regions which may be associated to larger repulsion with cationic metals. This may be relevant for the N-truncated D^{DA} HMA isoform for which only such a population was observed during MD simulations.

Discussion

We developed a multi-element functional test of albumin binding capacities, whose results parallel the relative decrease in native human serum albumin and discriminate patients with liver cirrhosis from controls. When applied to two different induced hepatotoxicity models in rats, the SEB test detected liver injuries very early, when the most important posttranslational modifications of albumin also appeared, contrary to classical functional liver tests.

The ligands used for the SEB test were carefully selected based on their binding sites to albumin in order to cover the most important albumin modifications that may occur in liver dysfunctions. This has been

inspired by recent studies by Baldassare *et al.* and Dominicali *et al.* showing the decrease of effective albumin (the native form) and the increase of several isoforms in advanced liver diseases ^{2,4}. Three metals, Au, Cu and Cd, were selected to respectively monitor modifications occurring at (i) the Cys34 position ³⁷⁻³⁹, (ii) the N-terminal site and the multi binding site B (18,19) and (iii) multi binding sites A (also known as Cd binding site) (8). Organic ligands were also considered. L-thyroxine was shown to possibly bind up to 5 binding sites (20) and dansylsarcosine having a binding site located in the drug site2 (5). Albumin binding capacities toward dansylsarcosine and L-thyroxine are expected to reflect conformational modifications since their binding sites are positioned in the cavities of the protein. It is worth mentioning that the ligands used to perform the SEB test can be directly measured using a single and rather straightforward analytical method based on inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), and possibly by means of other analytical procedures. Our analytical approach is in line with a former work by Bar-Or *et al.* in the context of cardiac ischemia. They proposed the albumin-cobalt binding test (ACB), also known as the Ischemia Modified Albumin test (IMA) [6]. The IMA test is based on the hypothesis that cardiac ischemia is associated with modifications of albumin structure which, in turn, decrease cobalt binding. Briefly, the IMA test is performed by adding CoCl_2 and dithiothreitol to serum, followed by a colorimetric measurement of the (free-Co)-dithiothreitol complex at 470 nm. Although there is some controversy about the origin of the decreased HSA capacity to bind cobalt, a correlation between the albumin binding functions and the severity of cirrhosis was observed using the same test ⁷. Importantly, in these applications, given that albumin represents 60% of serum proteins, it is assumed that any significant decrease of HSA binding capacity for a ligand with a high affinity is prominently due to a modification on its albumin-binding site.

In developing the SEB test, we determined the maximum binding capacities of different ligands. Serum can bind up to 150 atoms of Au, 50 atoms of Cd, 50 atoms of Cu, 2.5 molecules of dansylsarcosine, and at least 10 molecules of L-thyroxine per albumin molecule (Figure 1). Our study goes beyond assessing known albumin binding sites by using high ligand concentrations to investigate adsorption on the albumin surface (except for dansylsarcosine). Molecular modeling shows that PTMs affect albumin dynamics and inter-domain communications, particularly with Cys34 oxidation or N-truncation. Dansylsarcosine predominantly binds Sudlow's site 1, minimally affected by PTMs, but PTMs impact Sudlow's site 2 and FA binding site 5 more in HNA1 and Δ DA albumin isoforms. This may explain lower binding affinity for a second dansylsarcosine binding.

In the preliminary phase, various molar ratios (ligands/albumin) were tested on patients with liver diseases and control patients. Surprisingly, even at molar ratios below maximum binding capacities, all ligands effectively differentiated cirrhotic patients from non-cirrhotic individuals with satisfactory sensitivities and specificities (data not shown). Based on these findings, we selected the lowest effective ratios observed in patients for further application in a cohort of cirrhotic and control patients, as well as in our animal experiments. The SEB ligands successfully discriminated cirrhotic patients, regardless of the Child-Pugh score, further supporting our hypothesis that albumin PTMs occur early during liver injury. However, it is important to acknowledge a potential limitation of our study, as we relied on an animal

model to test this hypothesis due to the absence of crystalized rat albumin. Nevertheless, the results obtained in our study align with the assumption that the same binding sites and mechanisms apply to rat albumin, reinforcing the validity of our findings.

In the animal hepatotoxicity models, the decrease in the binding capacities of the SEB test ligands was correlated with the decrease of the native albumin fraction to the benefit of the other isoforms. Although the decrease of native albumin might explain the behaviors of some ligands as observed in Figure 4, it is worth further interpretation. First, albumin oxidation on Cys34 resulted in the disruption of Au binding, leading to decreased Au-binding capacities in intoxicated rats. Cys34 oxidation was also associated to conformational and dynamic alterations of human albumin (5), at the interface between domain I and domain I-II, leading to lower binding capacities of endogenous (L-tryptophan) and exogenous ligands (cefazoline and verapamil). The corresponding binding sites being distant from Cys34, allosteric modulation might explain lower binding capacity of Cd in some of our experiments. Actually, the Cd binding site has not been fully characterized yet, but would be in the vicinity of the L-tryptophan, cefazoline and verapamil binding site. Secondly, the normal binding capacities for Au, Cu and dansylsarcosine observed at D3 and/or D7 in the EtOH and CCl₄ models is consistent with the normal levels of native albumin observed. This is likely due to a short phase of liver regeneration, which has been extensively reported at least for animals intoxicated with CCl₄⁴⁰⁻⁴². Third, Cu is reported to have strong affinity for the N-terminal binding site and the metal binding site B (MBSB). However, we did not identify any isoform with a truncation of the N-terminal moiety, suggesting that MBSB modifications alone are responsible for decreased Cu binding. Also, we detected N-Glycation and hypothesized that they occurred on Lys199, Lys281, Lys439, and Lys525 (3), all located near the L-thyroxine sites. These modifications would alter local dynamics and in turn affect the L-thyroxine binding capacity. Finally, Cu binding capacity showed the earliest decrease in our models. Therefore, Cu could be considered as a very early sensitive marker of an albumin PTM. In contrast, decreased Cd binding capacity was observed only at later stages, suggesting that it could be used as a biomarker of more intense, or different, albumin PTMs.

Our results show that the use of one ligand (as proposed with the IMA test) might not be sufficient to detect albumin PTMs in general. Actually, the coverage of a larger part of the albumin structure seems to be key to detect liver injuries early. Further investigations including molecular modeling should be further conducted to comprehend the albumin isoforms-ligands binding relationships and to finely tune the SEB test.

The SEB test and albumin PTMs show potential for early detection of Drug-induced liver injury (DILI), a life-threatening adverse effect of certain drugs and a significant challenge in patient care and drug development. DILI is a major concern for regulators and the pharmaceutical industry, often leading to termination of drug development or post-approval withdrawal. Despite efforts to identify biomarkers, DILI diagnosis remains challenging due to the diverse presentations and lack of early, specific indicators. While some mechanistic biomarkers have shown promise, the extensive number of candidates highlights the unmet medical needs in DILI diagnosis and prediction. Timely medical care and prediction of outcomes, particularly in DILI-induced acute liver failure (ALF), are crucial. Prognostic biomarkers for

overall DILI and predicting injury development in patients with normal-to-low ALT values are still lacking. Although micro-RNA-122 is the most promising biomarker to date, its clinical use is limited by biological variations. The SEB test and albumin PTM monitoring hold promise in addressing these gaps, offering a patient-specific, temporal approach for DILI diagnosis and prognosis. Future investigations are warranted to explore their broader potential in hepatology. The early detection capability of the SEB test suggests its potential as a prognostic biomarker, pending further confirmation through future studies.

Abbreviations

PTM: Post-translational modification

HAS: Human serum albumin

IMA: Ischemia Modified Albumin test

ABC: albumin cobalt binding test

HMA: Human mercaptalbumin

HNA1: Nonmercaptalbumin 1

HNA2: Nonmercaptalbumin 2

Au: gold

Cu: copper

Cd: cadmium

SEB: serum enhanced binding test

CCl₄: Carbon tetrachloride

ALP: alkaline phosphatases,

GGT: gamma-glutamyl transferases

BILIT and BILID : total and conjugated bilirubin,

LDH: lactate dehydrogenase

EtOH: Ethanol

FABS: fatty acid binding sites

PLM: palmitate molecules

RMSD: root-mean square deviations

Declarations

Authors Contributions:

Souleiman El Balkhi: Conceptualization, Methodology, data collection, data analysis and interpretation, drafting the article.

Mohamad Ali Rahali and Roy Lakis: Sample analysis, data collection, analysis and interpretation

François Ludovic Sauvage: Sample analysis, data collection, analysis and interpretation

Marving Martin and Angelika Janaszekiewicz: Data collection and interpretation of molecular simulation,

Roland Lawson and Ruben Goncalves: Design of in vivo experiments, data collection and analysis.

Paul Carrier and Veronique Loustaud-Ratti: patients sample collection, data analysis and interpretation

Anne Guyot: Histological analysis, data collection

Pierre Marquet and Franck Saint-Marcoux: Methodology, data analysis and interpretation, critical revision of the article.

Florent Di Meo: Molecular simulation, methodology, data collection, analysis and interpretation, drafting the article.

Conflicts of interest statement: The authors have no conflicts of interest to declare.

The manuscript contains 4649 words, 5 figures and 2 tables.

Funding statement: this work did not receive any funding

Data availability: The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Declaration of transparency and scientific rigour

This study involved animal experimentation: This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research as stated in the scientific reports guidelines for Design and Analysis, and Animal Experimentation, and as recommended by funding agencies, publishers and other organisations engaged with supporting research.

Ethics and integrity Statements

Declaration of transparency: this declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research as stated in the scientific reports guidelines for design and analysis, and as recommended by funding agencies, publishers and other organizations engaged with supporting research. All methods were performed in accordance with the guidelines for animal experimentation of the European Communities Council Directive (EU/63/2010). The animal experiments and procedures are reported according to the ARRIVE guidelines (<https://arriveguidelines.org>).

References

1. Baldassarre, M. *et al.* Albumin Homodimers in Patients with Cirrhosis: Clinical and Prognostic Relevance of a Novel Identified Structural Alteration of the Molecule. *Sci Rep* **6**, 35987, doi:10.1038/srep35987 (2016).
2. Baldassarre, M. *et al.* Determination of effective albumin in patients with decompensated cirrhosis: clinical and prognostic implications. *Hepatology*, doi:10.1002/hep.31798 (2021).
3. Das, S. *et al.* Hyperoxidized albumin modulates neutrophils to induce oxidative stress and inflammation in severe alcoholic hepatitis. *Hepatology* **65**, 631-646, doi:10.1002/hep.28897 (2017).
4. Domenicali, M. *et al.* Posttranscriptional changes of serum albumin: clinical and prognostic significance in hospitalized patients with cirrhosis. *Hepatology* **60**, 1851-1860, doi:10.1002/hep.27322 (2014).
5. Jalan, R. *et al.* Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality. *Hepatology* **50**, 555-564, doi:10.1002/hep.22913 (2009).
6. Kawakami, A. *et al.* Identification and characterization of oxidized human serum albumin. A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions. *FEBS J* **273**, 3346-3357, doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05341.x (2006).
7. Klammt, S. *et al.* Albumin-binding function is reduced in patients with decompensated cirrhosis and correlates inversely with severity of liver disease assessed by model for end-stage liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **19**, 257-263, doi:10.1097/MEG.0b013e3280101f7d (2007).
8. Naldi, M., Baldassarre, M., Domenicali, M., Bartolini, M. & Caraceni, P. Structural and functional integrity of human serum albumin: Analytical approaches and clinical relevance in patients with liver cirrhosis. *J Pharm Biomed Anal* **144**, 138-153, doi:10.1016/j.jpba.2017.04.023 (2017).
9. Oettl, K. *et al.* Oxidative albumin damage in chronic liver failure: relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. *J Hepatol* **59**, 978-983, doi:10.1016/j.jhep.2013.06.013 (2013).
10. Spinella, R., Sawhney, R. & Jalan, R. Albumin in chronic liver disease: structure, functions and therapeutic implications. *Hepatol Int* **10**, 124-132, doi:10.1007/s12072-015-9665-6 (2016).
11. Stauber, R. E. *et al.* Human nonmercaptalbumin-2: a novel prognostic marker in chronic liver failure. *Ther Apher Dial* **18**, 74-78, doi:10.1111/1744-9987.12024 (2014).

12. Fanali, G. *et al.* Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med* **33**, 209-290, doi:10.1016/j.mam.2011.12.002 (2012).
13. Sun, L. *et al.* Albumin binding function is a novel biomarker for early liver damage and disease progression in non-alcoholic fatty liver disease. *Endocrine* **69**, 294-302, doi:10.1007/s12020-020-02319-z (2020).
14. Xiao, L.-L. *et al.* Using advanced oxidation protein products and ischaemia-modified albumin to monitor oxidative stress levels in patients with drug-induced liver injury. *Scientific Reports* **10**, doi:10.1038/s41598-020-75141-2 (2020).
15. Chen, C.-Y., Tsai, W.-L., Lin, P.-J. & Shiesh, S.-C. The value of serum ischemia-modified albumin for assessing liver function in patients with chronic liver disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **49**, doi:10.1515/cclm.2011.675 (2011).
16. Alcaraz-Quiles, J. *et al.* Oxidized Albumin Triggers a Cytokine Storm in Leukocytes Through P38 Mitogen-Activated Protein Kinase: Role in Systemic Inflammation in Decompensated Cirrhosis. *Hepatology* **68**, 1937-1952, doi:10.1002/hep.30135 (2018).
17. Casulleras, M. *et al.* Albumin internalizes and inhibits endosomal TLR signaling in leukocytes from patients with decompensated cirrhosis. *Science Translational Medicine* **12**, doi:10.1126/scitranslmed.aax5135 (2020).
18. de Franchis, R. *et al.* Baveno VII - Renewing consensus in portal hypertension. *J Hepatol* **76**, 959-974, doi:10.1016/j.jhep.2021.12.022 (2022).
19. El Balkhi, S. *et al.* Human plasma copper proteins speciation by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. Solutions for columns calibration by sulfur detection. *Anal Chem* **82**, 6904-6910, doi:10.1021/ac101128x (2010).
20. Lilley, E. *et al.* ARRIVE 2.0 and the British Journal of Pharmacology: Updated guidance for 2020. *British Journal of Pharmacology* **177**, 3611-3616, doi:10.1111/bph.15178 (2020).
21. Curtis, M. J. *et al.* Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *British Journal of Pharmacology* **175**, 987-993, doi:10.1111/bph.14153 (2018).
22. Rahali, M. A. *et al.* Posttranslational-modifications of human-serum-albumin analysis by a top-down approach validated by a comprehensive bottom-up analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **1224**, 123740, doi:10.1016/j.jchromb.2023.123740 (2023).
23. Qi, J. *et al.* Developing Anticancer Ferric Prodrugs Based on the N-Donor Residues of Human Serum Albumin Carrier IIA Subdomain. *Journal of Medicinal Chemistry* **59**, 7497-7511, doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00509 (2016).
24. Eswar, N. *et al.* Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 5**, Unit-5 6, doi:10.1002/0471250953.bi0506s15 (2006).
25. Curry, S., Brick, P. & Franks, N. P. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim Biophys Acta* **1441**, 131-140, doi:10.1016/s1388-1981(99)00148-1 (1999).

26. Fujiwara, S. & Amisaki, T. Identification of high affinity fatty acid binding sites on human serum albumin by MM-PBSA method. *Biophys J* **94**, 95-103, doi:10.1529/biophysj.107.111377 (2008).
27. Maier, J. A. *et al.* ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation* **11**, 3696-3713, doi:10.1021/acs.jctc.5b00255 (2015).
28. MacKerell, A. D. *et al.* All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B* **102**, 3586-3616, doi:10.1021/jp973084f (1998).
29. Price, D. J. & Brooks, C. L. A modified TIP3P water potential for simulation with Ewald summation. *The Journal of Chemical Physics* **121**, 10096-10103, doi:10.1063/1.1808117 (2004).
30. Joung, I. S. & Cheatham, T. E. Molecular Dynamics Simulations of the Dynamic and Energetic Properties of Alkali and Halide Ions Using Water-Model-Specific Ion Parameters. *The Journal of Physical Chemistry B* **113**, 13279-13290, doi:10.1021/jp902584c (2009).
31. Dickson, C. J. *et al.* Lipid14: The Amber Lipid Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation* **10**, 865-879, doi:10.1021/ct4010307 (2014).
32. Irani, M. *et al.* Amino acid oxidation of *Candida antarctica* lipase B studied by molecular dynamics simulations and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **52**, 1280-1289, doi:10.1021/bi301298m (2013).
33. Roe, D. R. & Cheatham, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *Journal of Chemical Theory and Computation* **9**, 3084-3095, doi:10.1021/ct400341p (2013).
34. Hunter, J. D. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science & Engineering* **9**, 90-95, doi:10.1109/mcse.2007.55 (2007).
35. Rodriguez, A. & Laio, A. Clustering by fast search and find of density peaks. *Science* **344**, 1492-1496, doi:10.1126/science.1242072 (2014).
36. Kang, P. W. *et al.* Calmodulin acts as a state-dependent switch to control a cardiac potassium channel opening. *Science Advances* **6**, doi:10.1126/sciadv.abd6798 (2020).
37. Li, Y., Yan, X. P., Chen, C., Xia, Y. L. & Jiang, Y. Human serum albumin-mercurial species interactions. *J Proteome Res* **6**, 2277-2286, doi:10.1021/pr0700403 (2007).
38. Shen, X. C. *et al.* Studies on the interaction between Ag(+) and human serum albumin. *J Inorg Biochem* **95**, 124-130, doi:10.1016/s0162-0134(03)00094-1 (2003).
39. Sokolowska, M., Wszelaka-Rylik, M., Poznanski, J. & Bal, W. Spectroscopic and thermodynamic determination of three distinct binding sites for Co(II) ions in human serum albumin. *J Inorg Biochem* **103**, 1005-1013, doi:10.1016/j.jinorgbio.2009.04.011 (2009).
40. Moghaddam, A. P., Eggers, J. S. & Calabrese, E. J. Evaluation of sex difference in tissue repair following acute carbon tetrachloride toxicity in male and female Sprague-Dawley rats. *Toxicology* **130**, 95-105, doi:10.1016/s0300-483x(98)00095-x (1998).

41. Mao, S. A., Glorioso, J. M. & Nyberg, S. L. Liver regeneration. *Transl Res* **163**, 352-362, doi:10.1016/j.trsl.2014.01.005 (2014).
42. Weber, L. W., Boll, M. & Stampfl, A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* **33**, 105-136, doi:10.1080/713611034 (2003).

Tables

Table 1: Effect of EtOH on biochemical markers expressed as the median [min-max] (* p < 0,05).

Biomarkers	Controls	D1	D3	D7	D10	D14
ALB (g/L)	14,4 [12,7-17,6]	13,8 [13,2-14,1]	12,4* [11,8-14,2]	12,2* [11,0-13,8]	16,35 [12,4-17,7]	12,9* [10,2-13,5]
AST (UI/L)	70,8 [61-75]	78 [70-85]	80 [52-144]	96* [75-157]	92* [81-157]	90* [85-294]
ALT (UI/L)	57 [46-61]	63 [52-71]	62 [46-123]	69 [52-97]	78* [68-98]	82* [65-104]
PAL (UI/L)	196 [101-325]	232 [153-304]	180 [121-329]	159 [84-263]	172 [100-222]	230 [110-327]
BILID (µM)	0,75 [0,6-1]	0,7 [0,3-1]	0,7 [0,5-1,3]	0,7 [0,4-4,4]	0,8 [0,5-1,1]	0,6 [0,4-0,7]
BILIT (µM)	0,75 [0,4-1,3]	0,8 [0,4-1,6]	0,8 [0,2-1,7]	1,0 [0,2-1,9]	1,0 [0,8-1,6]	0,9 [0,5-1,8]
Histology		2/7 Inflammation	1/6 inflammation	4/7 inflammation	2/8 inflammation	3/9 inflammation

Table 2: Effect of CCl₄ administration on biochemical markers expressed as the median [min-max] (* p < 0,05; ** p < 0,01).

Biomarkers	Controls	D1	D3	D7	D10
ALB (g/L)	14,4 [12,7-17,6]	14,2 [12,9-14,5]	13,0* [11,8-14,2]	12,9* [10,4-14,5]	16,0 [15,9-16,7]
AST (UI/L)	70,8 [61-75]	123* [90-251]	151* [82-214]	232** [168-305]	337** [192-473]
ALT (UI/L)	57 [46-61]	77* [67-181]	90* [78-208]	200** [107-638]	355** [166-538]
PAL (UI/L)	196 [101-325]	232 [192-270]	237 [174-329]	248 [117-341]	205 [149-250]
BILID (µM)	0,75 [0,6-1,0]	1,1 [0,7-1,5]	1,2 [0,3-1,3]	1,6** [1,2-2,0]	2,5** [1,8-2,9]
BILIT (µM)	0,75 [0,4-1,3]	1,4 [0,4-2,0]	1,3 [0,6-3,5]	2,3** [1,8-4,5]	3,5** [2,4-5,3]
Histology			Steatosis 5/5 1/5 fibrosis	Steatosis 6/6	6/6 steatosis 1/6 fibrosis

Figures

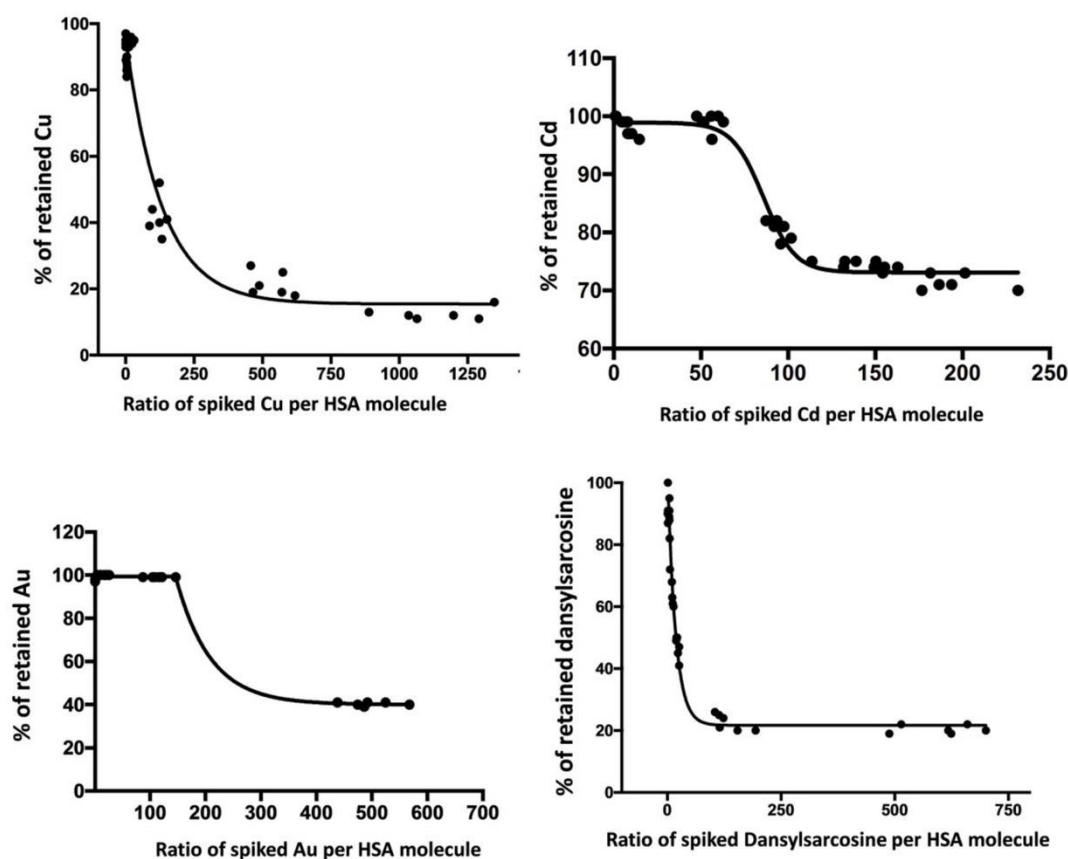


Figure 1

Structural and dynamic variabilities of HSA isoforms. a) Overview of HMA albumin used as reference. Domains I, II and III are colored blue-ish, red-ish and green-ish, respectively, for which each subdomain A and B are stressed out. Residues modified by PTM considered in this work are also located, namely N-terminal Asp1 and Ala2 residues for D^{DA} HMA as well as Cys34 for HNA1 and HNA2. Sudlow's sites 1 and 2 are also shown as well as the two main fatty acid binding sites used in the present models (FA2 and FA5). b) Per-residue Root Mean Squared Fluctuation differences (DRMSF, Å) between PTM HSA isoforms and native HMA. Subdomains are shown as background. c) Representative snapshots of each structural cluster obtained from MD simulations for each HSA isoforms. d) Structural variabilities of bound palmitates to HSA isoform representative snapshots. 300 different palmitate molecules along MD trajectories are displayed for FA2 and FA5. e) Allosteric communication between different sources (Cys34, Asp1 and Ala2) to main albumin binding sites, namely Sudlow's site 1 and 2 and L-thyroxine site 3, 4 and 5, as well as metal binding sites (N-terminal binding site – NTS – and Metal binding site – MBS).

Efficiency of information flow from source to sink are shown from current flow closeness from Allopath tool.

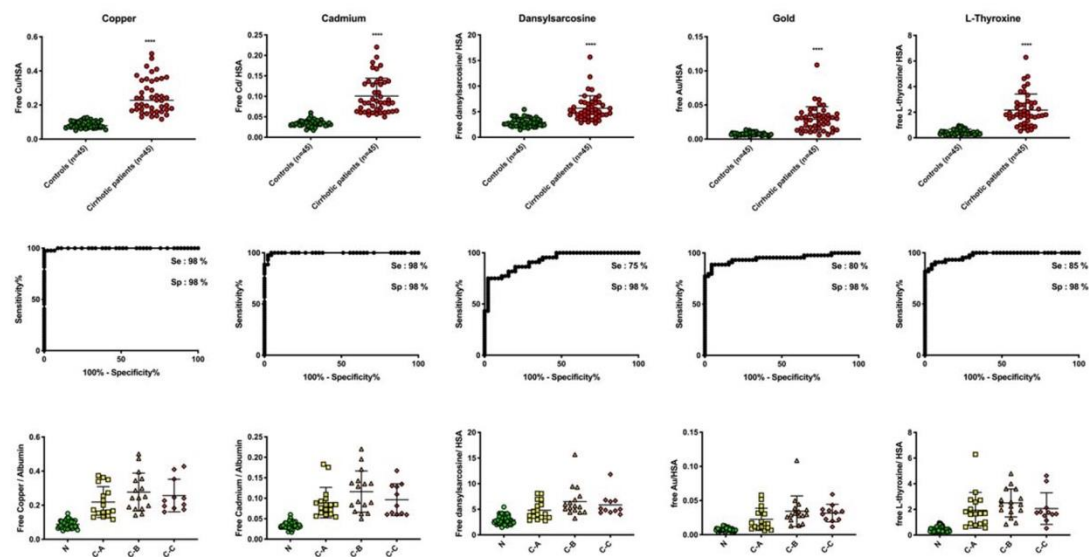


Figure 2

Serum enhanced binding of Cu, Cd, Au and dansylsarcosine.

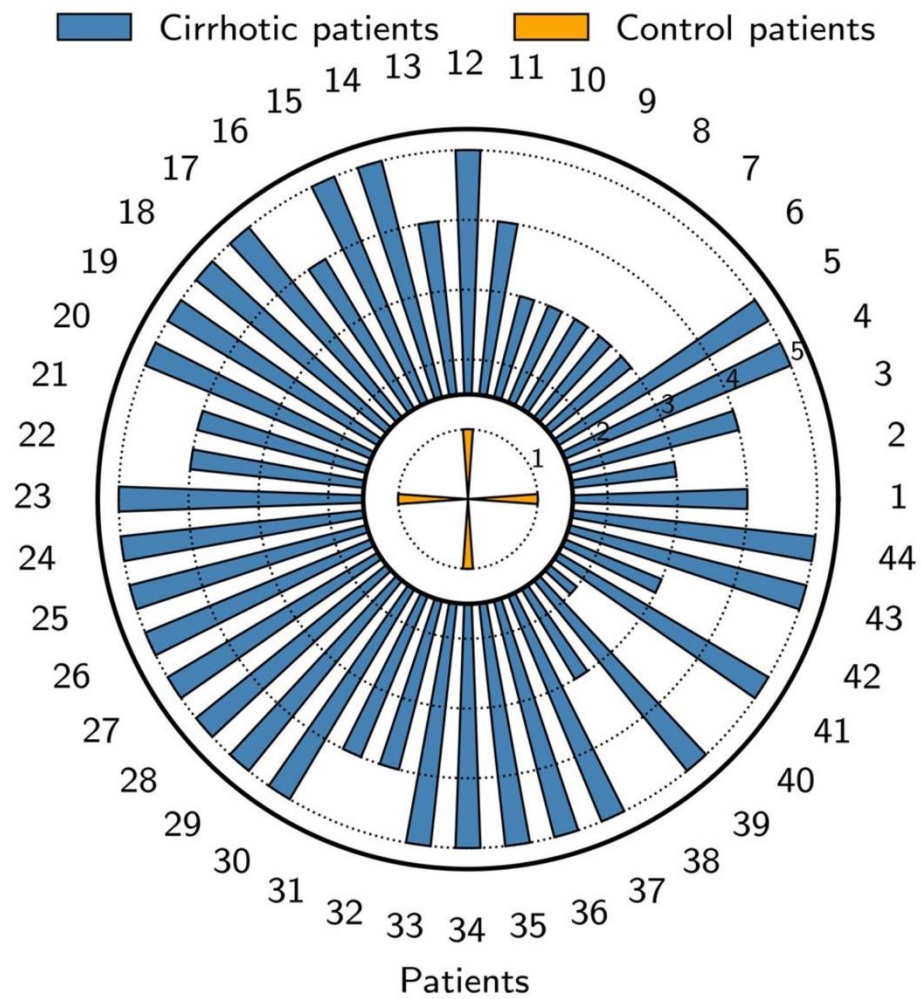


Figure 3

SEB test performance to discriminate cirrhosis patients from control patients.

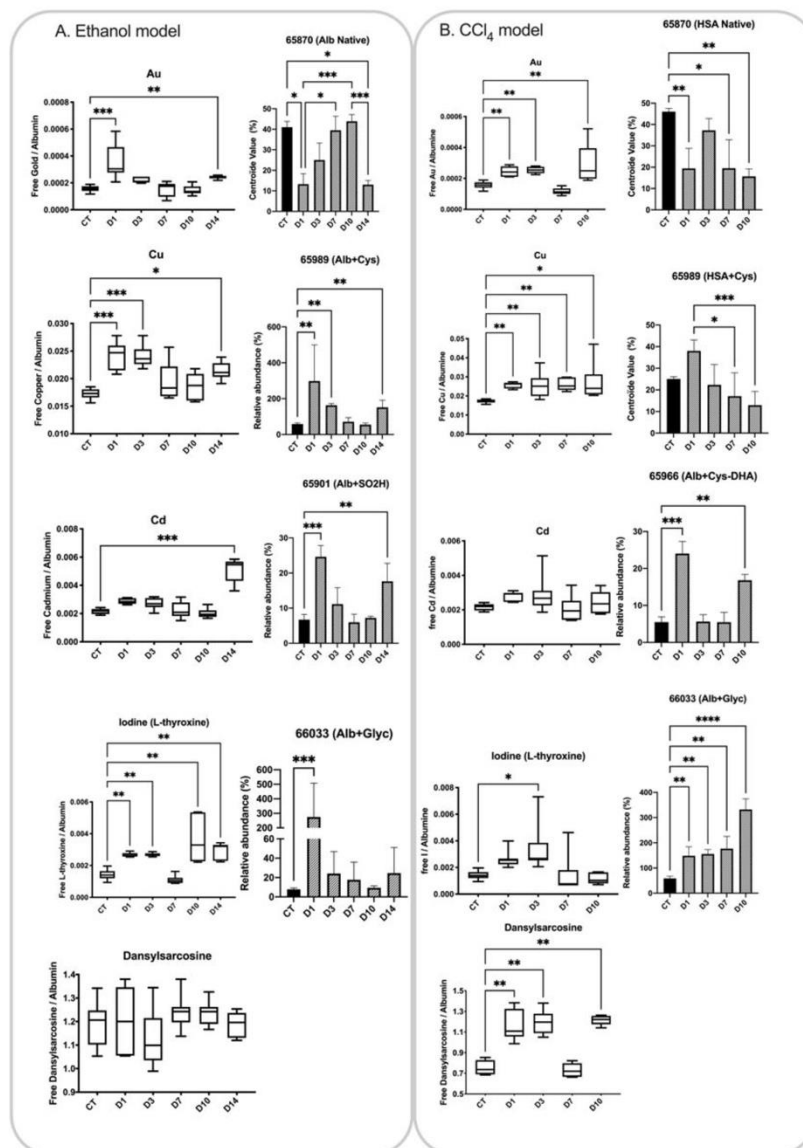


Figure 4

Number of positive ligands of the SEB test for each patient included in the cohort.

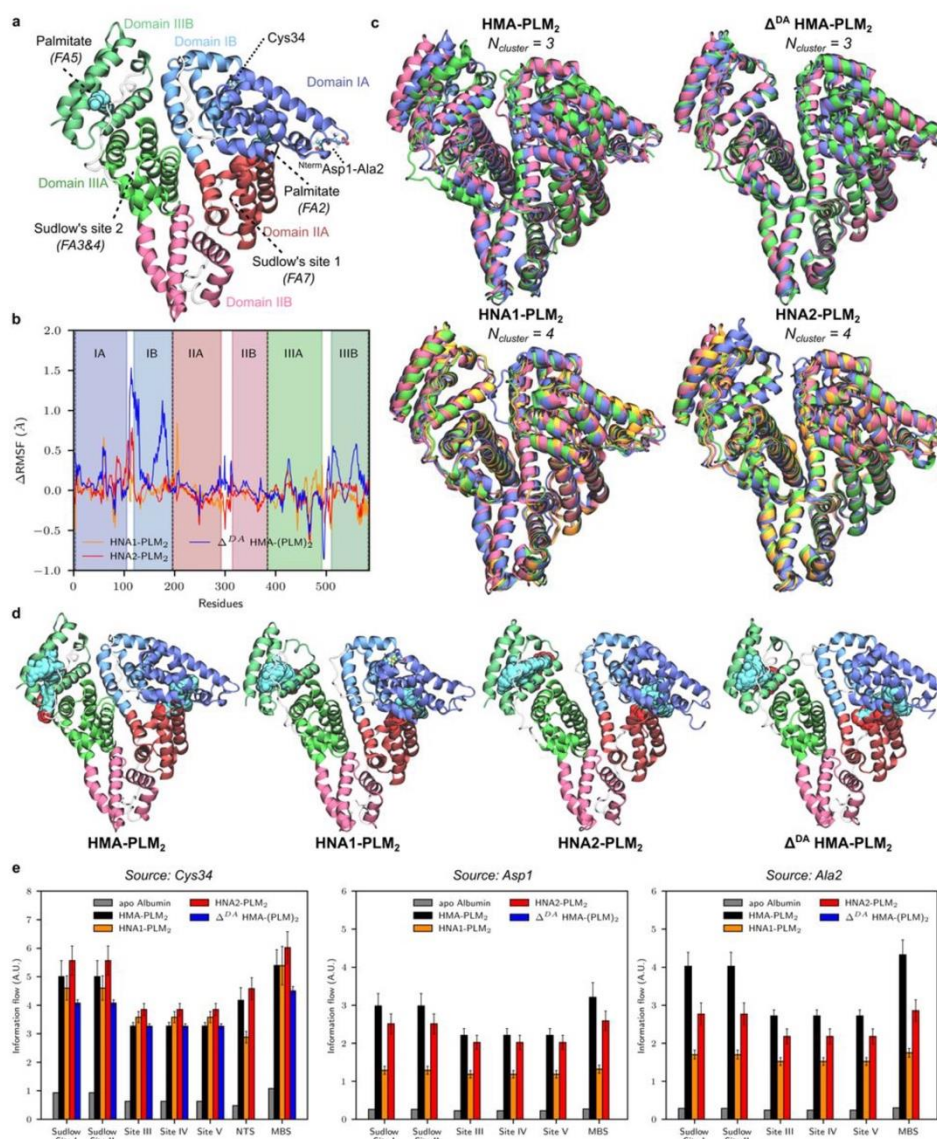


Figure 5

SEB test ligands evolution and albumin isoforms in the rat models. A. Ethanol model. B. CCl₄ model.

Supplementary Files

This is a list of supplementary files associated with this preprint. Click to download.

Page 23/24

- ESISEBtestliverinjuriesVfinal.docx

IV.2.3. Discussion et perspectives

Dans cette étude, nous mettons en évidence l'importance d'un outil de suivi capable de refléter l'état fonctionnel de l'albumine à différents stades de lésions hépatiques. Nous avons cherché à évaluer la capacité de détecter d'une façon précoce les lésions hépatiques en se basant sur les diverses isoformes générées par les modifications post-traductionnelles de l'HSA et sur la capacité de liaison de l'albumine. Pour ce faire, un test fonctionnel multi-éléments des capacités de liaison à l'albumine, le SEB test, a été développé. Nous avons ensuite testé et validé sa fiabilité et sa sensibilité chez des patients et dans des modèles animaux soumis à des lésions hépatiques induites. Après avoir validé l'applicabilité du test, nous avons étudié la dynamique et l'adsorption à la surface de l'albumine en fonction de la présence de PTM à l'aide de la modélisation moléculaire.

Dans cette étude, les modèles animaux utilisés ne reflètent pas l'ensemble des différents types d'atteintes hépatiques. De plus, le choix de solvant utilisé pour diluer les réactifs peut affecter le profil d'albumine. Lorsque le (CCl₄) est dilué avec de l'huile d'olive, les acides gras contenus dans l'huile d'olive ont la capacité d'influencer la structure de l'albumine (230).

Dans le cadre de l'étude de la modélisation moléculaire, les analyses ont été réalisées sur une structure d'HMA dans laquelle seuls deux des sept sites de liaison aux acides gras étaient occupés. Cette absence de diversité dans la prise en compte des divers sites de liaison aux acides gras peut restreindre notre appréhension des multiples aspects dynamiques et d'adsorption de la structure de l'albumine. Une étude de modélisation moléculaire plus avancée sera nécessaire pour analyser la dynamique de l'albumine et les propriétés d'adsorption du ligand en variant les sites de liaison des acides gras occupés, car ils ont le potentiel d'altérer la conformation de la structure du HSA.

Sur la base de cette discussion, plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Pour bien valider l'applicabilité du SEB test et sa capacité à détecter d'une manière précoce les lésions hépatiques, il sera nécessaire de le tester sur une plus grande cohorte de patients.

Quant aux modèles animaux, nous envisageons de développer d'autres modèles expérimentaux d'hépatotoxicité (intoxication au paracétamol, ligature des voies biliaires) afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques observés chez l'homme. De plus, une amélioration des modèles animaux précédents est prévue pour tester d'autres hépatotoxiques et mimer d'autres atteintes hépatiques. A noter que le succès récent des modèles 3D in vitro (tels que les organoïdes et les organes sur puce basés sur la microfluidique), qui imitent mieux la physiologie et l'architecture humaines, a ouvert la voie à des substituts de pointe à la recherche sur les animaux. Il faut d'abord produire une quantité significative d'albumine détectée par spectrométrie de masse pour que les études soient fiables.

En conclusion, le SEB test semble prometteur comme outil de diagnostic rapide en offrant une approche de screening spécifique au patient pour le diagnostic des stades précoces de lésions hépatiques.

Cette étude nous permet de retenir les points clés suivants :

- **Nous avons dévoilé que l'utilisation d'une approche multi-ligands, couvrant l'intégralité de la structure de l'albumine, montre un grand potentiel dans l'analyse de ces modifications post-traductionnelles (PTM).**
- **Nous avons montré que le SEB test est capable de détecter des lésions hépatocytaires précoces avant la variation des biomarqueurs biochimiques actuels chez les patients souffrant de lésions hépatiques.**
- **Le SEB test développé est un outil prometteur et bien adaptée à une application de routine en situations cliniques. Il va servir comme un outil de criblage (screening) chez les patients souffrant d'une atteinte hépatique en révélant précocement les modifications structurelles de l'HSA. Cet outil sera complété par les profilages des isoformes de l'albumine chez les patients plus avancé pour identifier la nature et le degré de leurs atteintes.**

Chapitre V. Application clinique : Quantification des modifications post-traductionnelles chez les patients atteints d'insuffisance hépatique : Implications cliniques et pronostiques

V.1.1. Application clinique

Introduction

Après avoir achevé avec succès le développement et l'évaluation du SEB test en tant qu'outil d'évaluation du potentiel des modifications structurales de l'HSA en tant que biomarqueurs précoces pour le diagnostic et le suivi des patients atteints d'une maladie hépatique, nous avons ensuite entrepris l'application de la méthode de quantification absolue des isoformes d'albumine décrite au chapitre 3, article 2, pour évaluer le potentiel des profils d'isoformes de l'HSA à des fins similaires.

L'un des aspects préoccupants des maladies hépatiques chroniques est qu'elles ne sont souvent pas diagnostiquées jusqu'à ce qu'elles atteignent le stade de la maladie hépatique terminale (ESLD), qui représente environ 30 % des cas. À ce stade, le taux de survie chute brutalement, 50 % seulement des patients survivant au-delà de cinq ans [1,2]. Ce taux de mortalité élevé dans l'ESLD souligne l'importance d'une détection et d'une intervention précoces pour prévenir la progression des maladies hépatiques. Il est donc primordial de diagnostiquer avec précision la fibrose avancée qui peut servir de marqueur prédictif critique pour les événements liés au foie.

Il est bien établi que la cirrhose du foie a un impact négatif sur la production d'albumine, ce qui entraîne une diminution de sa concentration sérique [3,4]. Cela souligne l'interaction complexe entre la cirrhose et les altérations de la structure et de la concentration de l'HSA, et met en lumière l'importance de comprendre cette dynamique pour la prise en charge clinique.

La recherche *in vivo* suggère que les PTM de l'albumine peuvent se manifester à un stade précoce des lésions hépatiques. Les premiers résultats obtenus sur des modèles animaux, présenté au chapitre 4, article 4 étayaient également cette hypothèse. Par exemple, lors d'expériences impliquant des rats exposés à des substances telles que l'éthanol ou le CCl₄ pendant plusieurs jours, il a été observé que des modifications de l'albumine se manifestaient assez rapidement. Cela s'est produit bien avant l'élévation typique des marqueurs biochimiques tels que l'AST, l'ALT, la phosphatase alcaline (PAL) ou la bilirubine, et même avant l'apparition de lésions histologiques visibles.

Nous avons cherché à étendre dans cette étude cette hypothèse à des sujets humains, afin d'établir un lien clair entre les PTM de l'albumine, donc ses isoformes, et les différents stades de progression des maladies hépatiques. Grâce à cette étude, nous souhaitons mettre en lumière l'importance clinique potentielle des profils d'isoformes en tant que biomarqueurs précoces des hépatopathies chroniques.

Patients, matériels et méthodes

Patients

Entre janvier 2021 et janvier 2023, nous avons réalisé une étude prospective monocentrique, incluant des patients présentant différents états de maladies chroniques du foie suivis dans le service d'hépatologie du Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, France. Pour chaque patient recruté dans l'étude, l'âge, le sexe, l'étiologie de la maladie hépatique, le score MELD, le stade de l'encéphalopathie hépatique, le stade de la cirrhose, le stade de la fibrose et la méthode de diagnostic ont été collectés.

Les enquêteurs ont systématiquement sollicité la participation des patients à l'étude dès que leur état clinique le permettait. Après avoir obtenu leur consentement éclairé, les patients ont été soumis à des procédures de recherche, comprenant la collecte de données cliniques, l'évaluation de la rigidité du foie par FibroScan ou par biopsie du foie lorsque cela était possible, ainsi que l'analyse des résultats biologiques des tests de routine. De plus, des analyses spécifiques de l'albumine ont été réalisées sur des échantillons de sang résiduel. Les tubes prélevés sont des tubes "Vacutainer®" en héparinate de lithium (Beckton Dickinson, France) centrifugés (à 3000 rpm, pendant 10 minutes) issus de la routine hospitalière du laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire du CHU de Limoges.

Les critères d'inclusion étaient les suivants : (1) Patients âgés de plus de 18 ans ; (2) diagnostiqué pour une maladie du foie dans le service d'hépatologie ; et (3) ayant eu un test sanguin de routine dans les dernières 24 heures. Ils ont été classés en fonction de leur stade de fibrose (F0/F1, F2, F3, F4). Le stade de fibrose a été déterminé soit par un fibroscan® en 2019 ou ultérieurement, et/ou le score METAVIR si une biopsie hépatique était disponible et/ou par des arguments clinico-biologiques et morphologiques pour les patients cirrhotiques (F4). Ces derniers ont ensuite été classés en trois stades en fonction de leur score de Child Pugh.

Les critères d'exclusion étaient les suivants : Les patients sous dialyse ou ayant subi une transplantation rénale, ou ayant reçu une injection de produit de contraste, une thérapie de chélation, une transfusion, une injection d'un dérivé sanguin ou d'albumine au cours du mois précédent (risque d'interaction). Un groupe d'individus sains ont été inclus lorsque leur diagnostic clinique n'indiquait aucun dysfonctionnement hépatique et que leurs taux de transaminases (AST, ALT), de phosphatases alcalines (ALP), de gamma-glutamyl-transférases (GGT), de bilirubine totale et conjuguée (BILIT, BILID) et de lactate déshydrogénase (LDH) se situaient dans les limites de la normale.

La rigidité du foie a été évaluée par FibroScan® Mini+ 430 (EchoSens, Paris, France) à l'aide de la sonde M. Seuls les patients ayant au moins 10 acquisitions réussies et un écart interquartile/médian <30% ont été inclus. L'interprétation des stades de fibrose a été basée sur les seuils publiés en fonction des étiologies [5–7]. Schématiquement < 7KPa F0F1, entre 7 et 9,5 KPa F2, entre 9,5 et 13 KPa F3, > 13 KPa F4. Les patients cirrhotiques ont été classés en cirrhose A, B ou C en utilisant les scores de Child-Pugh et les recommandations de BAVENO VII [8,9]. Certains patients ont subi une biopsie du foie par ponction transpariétale ou Trans-jugulaire. Le stade de fibrose a été évalué à l'aide du score METAVIR [10].

Le diagnostic de cirrhose, ou plus précisément de fibrose F4, est posé lors d'une consultation, en tenant compte d'un ensemble de critères cliniques, biologiques et

morphologiques. D'un point de vue clinique, l'examen du foie peut révéler un bord net et rigide, parfois accompagné d'une hépatomégalie. La présence d'ascite, de splénomégalie et d'une circulation veineuse collatérale dans l'abdomen indique une hypertension portale. Les signes d'insuffisance hépatocellulaire comprennent les angiomes stellaires, l'érythrose palmaire, l'hippocratisme digital et l'ictère. La présence d'un tremblement de battement suggère une encéphalopathie hépatique. Aucun marqueur biologique spécifique n'est exclusif de la cirrhose. Dans le cas d'une cirrhose compensée, les fonctions synthétiques hépatiques restent intactes et les résultats des analyses de sang peuvent apparaître tout à fait normaux. En cas d'insuffisance hépatocellulaire, le temps de prothrombine et le taux de facteur V diminuent, de même que l'hypoalbuminémie et l'hyperbilirubinémie conjuguée prédominante. En outre, il peut y avoir des signes de cytolyse, principalement une augmentation de l'ASAT (aspartate aminotransférase), ou de cholestase. La thrombocytopénie, parfois accompagnée d'une leuco-neutropénie et d'une anémie, est un indicateur d'hypersplénisme.

Sur les examens d'imagerie, le foie présente des caractéristiques dysmorphiques, notamment des contours irréguliers et un aspect hétérogène. En cas d'hypertension portale, le diamètre de la veine porte est supérieur à 12 mm, avec la présence de shunts porto-systémiques et d'une splénomégalie [11].

Matériels et méthodes

Quantification absolue des isoformes de l'albumine sérique humaine

Les isoformes de l'HSA ont été caractérisés et quantifiés d'une façon absolue et non relative par la méthode décrite au chapitre 3, article 2. En bref, cette méthode est basée sur un système LC-TOF-MS. La méthode consiste en une simple dilution de 20 µL de sérum de patient dans de l'eau (0.9% NaCl) après ajout de myoglobine comme standard interne.

Les informations sur la préparation des échantillons, leurs analyses et le traitement des données sont décrites dans l'article 2. Une information à ajouter à ce qui a été déjà décrit dans l'article 2 de ce manuscrit est la suivante : pour les isoformes avancées de haut poids moléculaire identifiées dans l'échantillon du patient mais non présentes dans la solution commerciale d'albumine utilisée pour créer les courbes d'étalonnage, nous avons fait une estimation basée sur la pente de l'isoforme similaire présente dans la solution commerciale (ex : la pente de HSA+GLYC a été utilisée pour estimer la concentration de HSA+2GLYC). En effet, le comportement de l'isoforme s'est avéré être approximativement identique (Chapitre 3, article 2).

Analyse statistique

Les données quantitatives ont été exprimées sous forme de moyennes et d'erreurs standard de la moyenne (SEM) à l'aide de diagrammes de dispersion. La surface de pic de chaque isoforme a été exprimée en g/L. L'ANOVA suivie du test post hoc de Tukey a été utilisée pour évaluer l'association entre les isoformes HSA et l'étiologie des patients. Tous les tests étaient bilatéraux et $p < 0,05$ était considéré comme statistiquement significatif. Des courbes ROC ont été construites pour évaluer le seuil discriminatoire optimal de certaines isoformes d'albumine afin de distinguer les différents stades des lésions hépatiques. L'analyse multivariée des isoformes d'albumine par analyse en composantes principales (ACP) a été déterminée à l'aide d'un code développé sur R en prenant en considération les données du profil déconvolué complet de l'albumine entre 66000 et 67500 Da. Les données et les figures

ont été analysées et préparées à l'aide de logiciel R et de GraphPad Prism®, version 9 pour Mac OS.

Résultats

La population étudiée

Dans la présente étude, 82 personnes servant de témoins et 172 patients souffrant d'une maladie hépatique chronique ont été recrutés. La majorité des patients étaient des hommes, soit 116 (67 %) du total. L'âge médian au moment de l'inclusion était de 61 ans. La plupart des patients ont subi un FibroScan® (tableau 4). Après leur diagnostic (tableau 4), les patients ont été classés en fonction de leur stade de fibrose : 36 patients ont été classés F0/F1 (21 %), 23 F2 (13 %), 30 F3 (17 %) et 83 F4, dont 37 avec une cirrhose Child Pugh A (22 %), 26 avec une cirrhose Child Pugh B (15 %) et 20 avec une cirrhose Child Pugh C (12 %).

Les deux principales étiologies des maladies du foie étaient la stéatohépatite non alcoolique (NASH) et la consommation chronique d'alcool, individuellement ou en combinaison, représentant plus de la moitié des cas (NASH 36 %, consommation chronique d'alcool 23,2 %, consommation chronique d'alcool et NASH 6,3 %). Les autres étiologies comprenaient le virus de l'hépatite B, le virus de l'hépatite C, l'hépatite auto-immune et d'autres (tableau 5).

Tableau 4: Méthode de diagnostic.

Stade de fibrose	Fibroscan	Biopsie du foie	Fibroscan + biopsie du foie
F0/F1	35 (0.97)	4 (0.11)	3 (0.08)
F2	23 (1)	5 (0.22)	5 (0.22)
F3	28 (0.93)	12 (0.4)	10 (0.33)
F4	32 (0.45)	19 (0.23)	4 (0.05)
Child Pugh A	25 (0.68)	5 (0.13)	2 (0.05)
Child Pugh B	3 (0.11)	6 (0.23)	1 (0.04)
Child Pugh C	4 (0.2)	8 (0.4)	1 (0.05)

L'ascite était présente chez 30 patients cirrhotiques, avec 18 ascites modérées (7 avec Child Pugh B et 11 avec Child Pugh C), et 12 ascites tendues ou réfractaires aux diurétiques (7 Child Pugh B et 5 Child Pugh C). Une encéphalopathie hépatique a été observée chez 18 patients cirrhotiques : 1 avec Child Pugh A présentant une encéphalopathie de stade II, 7 avec Child Pugh B (4 avec encéphalopathie de stade II et 3 avec encéphalopathie de stade III), et 10 avec Child Pugh C (8 avec encéphalopathie de stade II et 2 avec encéphalopathie de stade III).

Tableau 5: Caractéristiques de la population.

NS : Non approprié, NASH : stéatohépatite non alcoolique, AIH : hépatite auto-immune, VHC : virus de l'hépatite C, VHB : virus de l'hépatite B, CBP : cholangite biliaire primitive, CSP : cholangite sclérosante primitive, MELD : modèle d'évaluation des maladies hépatiques en phase terminale.

	F0/F1	F2	F3	Child Pugh A	Child Pugh B	Child Pugh C	Total
Nombre de patients	36(21%)	23(13%)	30(17%)	37(22%)	26(15%)	20(12%)	172
Sexe							
Femme	17	6	12	12	1	8	56
Homme	15	17	18	25	25	12	116
Âge (année)							
Âge moyen	54	61	64	62	64	59	60
Âge médian	53	62	62	62	63	57	61
Étiologie							
NASH	13	13	22	12	3	0	62(36%)
Alcool	1	0	0	9	16	14	40(23,2%)
HBV	10	1	2	2	0	0	15(8,7%)
HCV	2	3	1	5	0	0	11(6,3%)
Hémochromatose	1	0	0	2	0	0	3(1,7%)
Cardiaque	0	0	0	0	1	0	1(0,6%)
AIH	3	2	4	1	0	1	11(6,3%)
Cholangite auto-immune	3	0	0	0	0	0	3(1,7%)
PBC	3	0	0	0	0	0	3(1,7%)
PSC	0	2	0	0	0	0	2(1,1%)
Cryogénie	0	0	1	3	0	0	4(2,3%)
Mixte	0	2	0	3	7	5	17(9,9%)
Étiologie mixte							
Alcool + NASH	0	0	0	2	5	4	11(6,3%)
PBC + NASH	0	2	0	0	0	0	2(1,1%)
Alcool + VHB	0	0	0	0	0	1	1(0,6%)
Alcool + VHC	0	0	0	1	1	0	2(1,1%)
Moyenne MELD	NS	NS	NS	8	15	21	14
Encéphalopathie hépatique							
Tous les stades	NS	NS	NS	1	7	10	18
Modéré	NS	NS	NS	1	4	8	13
Invalidant	NS	NS	NS	0	3	2	5
Ascite							
Tous les stades	NS	NS	NS	0	14	16	30
Abondance moyenne	NS	NS	NS	0	7	11	18
Tendu ou réfractaire	NS	NS	NS	0	7	5	12

Quantification des isoformes HSA

Albumine native

La valeur moyenne de l'isoforme native de l'albumine (HSA native) chez les témoins sains était de 12,2 g/L. L'HSA native était légèrement plus faible chez les patients atteints de fibrose F0F1 (10.6 g/L), F2 (9.9 g/L) et F3 (10.6 g/L), tandis qu'elle était significativement réduite chez les patients diagnostiqués d'une cirrhose F4_A (10.2 g/L), F4_B (4.1 g/L) et F4_C (4.2 g/L) par rapport aux témoins sains (12.2 g/L) (Figure 10.A). Cependant, en mélangeant F2 et F3, nous avons pu observer une discrimination entre F2F3 et le groupe de contrôle, F4_B et F4_C (Figure 10.B). Une différence significative s'est manifestée entre les groupes F4_B/F4_C par rapport aux autres groupes. Il est important de noter que F4_A a été distinguée de F4_B. Toutefois, aucune différence significative n'a été détectée entre F4_B et F4_C.

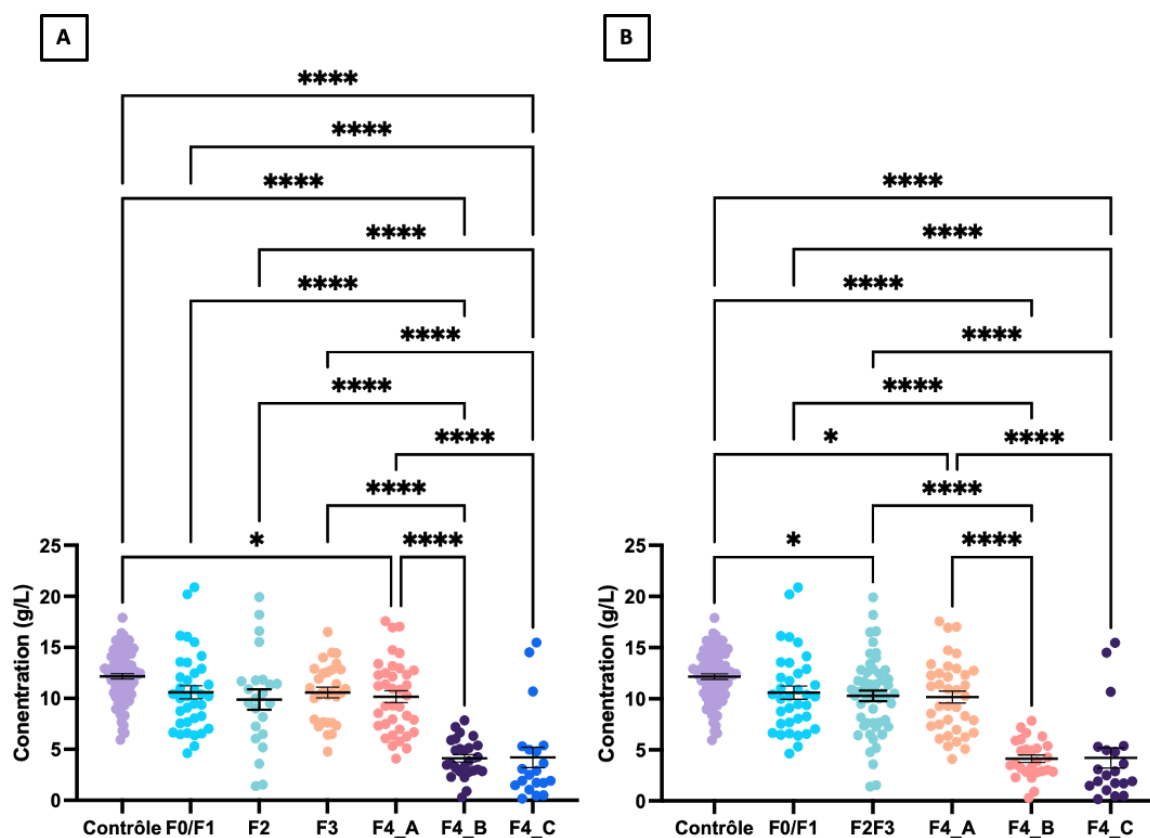


Figure 10: Concentration moyenne d'albumine native (g/L) en fonction du stade de fibrose. (A) Groupe F2 et F3 séparé, (B) Groupe F2/F3 mélangé.

F0/F1: fibrose F0/F1; F2: fibrose F2; F3: fibrose F3; F4_A: Cirrhose Child Pugh A; F4_B: Cirrhose Child Pugh B; F4_C: Cirrhose Child Pugh C. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Autres isoformes d'albumine

Au total, 10 isoformes non natives ont été quantifiés, y compris les isoformes tronqués à l'extrémité N-terminale (HSA-DA) et à l'extrémité C-terminale (HSA-L), la cysteinylé (HSA+Cys), les formes oxydés (HSA+SO₃H), glyqués (HSA+Glyc) ainsi que des combinaison d'isoformes tels que les formes cysteinylés glyquées (HSA+CYS+GLYC) et tronqués cysteinylés (HSA-DA+CYS). Nous avons comparé la concentration moyenne (g/L) de ces isoformes d'albumine en fonction du stade de la cirrhose (Figure 11).

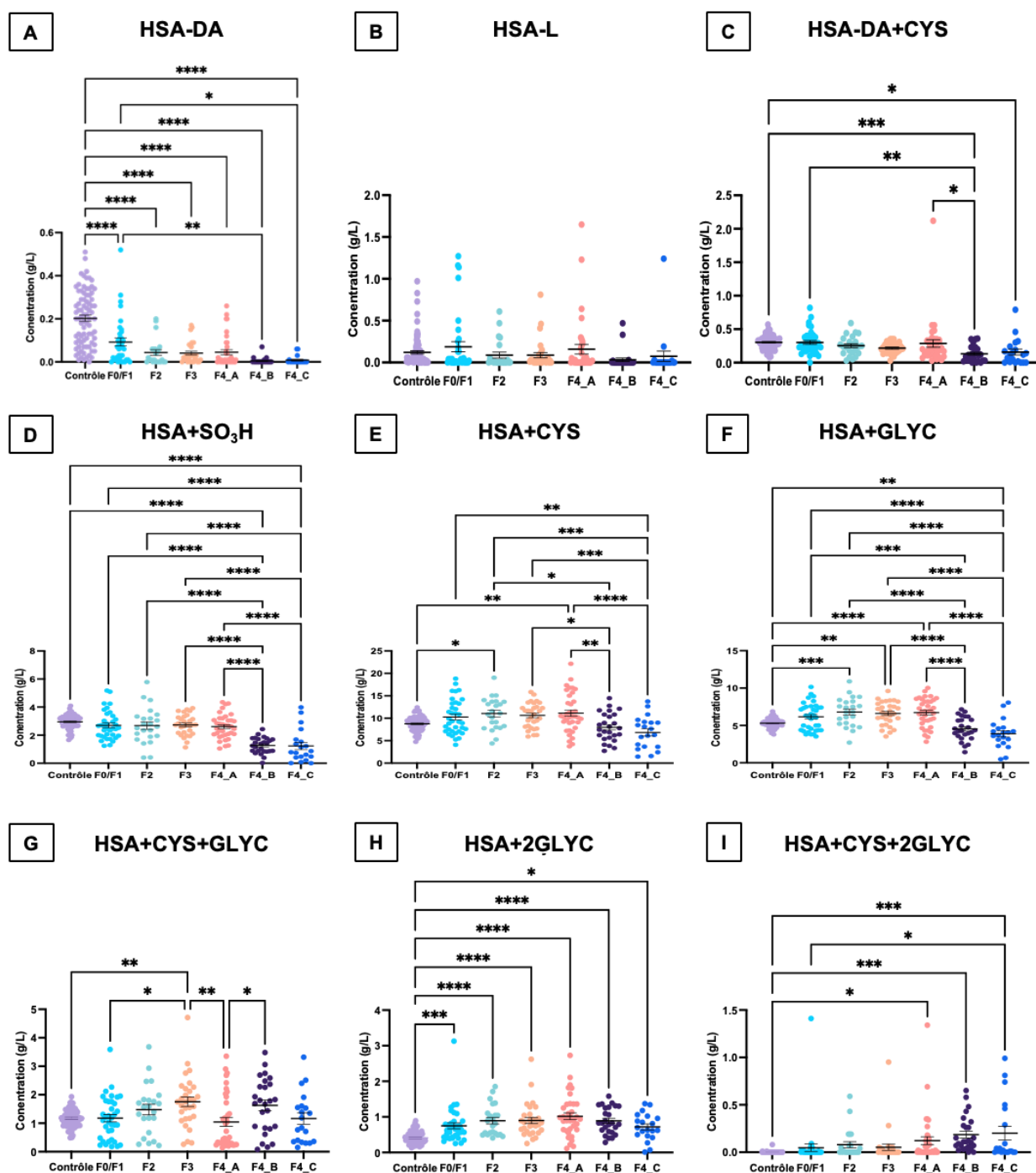


Figure 11: Concentration moyenne des isoformes d'albumine quantifiées (g/L) en fonction du stade de fibrose.

(A) Albumine tronquée à l'extrémité N-terminale (HSA-DA) ; (B) Albumine tronquée à l'extrémité C-terminale (HSA-L) ; (C) Albumine tronquée cysteinylée (HSA-DA+CYS) ; (D) Albumine oxydée (HSA+SO₃H) ; (E) Albumine cysteinylée (HSA+CYS) ; (F) Albumine glyquée ; (G) Albumine cysteinylée glyquée (HSA+CYS+GLYC) ; (H) Albumine doublement glyquée (HSA+2GLYC) ; (I) Albumine cysteinylée doublement glyquée (HSA+CYS+2GLYC). F0/F1: fibrose F0/F1; F2: fibrose F2; F3: fibrose F3; F4_A: Cirrhose Child Pugh A; F4_B: Cirrhose Child Pugh B; F4_C: Cirrhose Child Pugh C. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

La concentration moyenne de l'albumine tronquée en N-terminal (HSA-DA) a été significativement réduite à chaque stade de la fibrose par rapport au groupe témoin (0.2 g/L). Le groupe F0-F1 différait significativement uniquement des groupes de cirrhose décompensée (Figure 11.A).

Aucune variation significative de la concentration de l'isoforme tronquée C-terminale n'a été détectée (Figure 11.B).

En ce qui concerne le HSA-DA+CYS, la concentration était significativement réduite dans les groupes de patients cirrhotiques B et C décompensés par rapport aux témoins et aux F0/F1.

Pour l'isoforme irréversiblement oxydée (HSA+SO₃H), la concentration est diminuée notablement au cours des stades de cirrhose décompensée (F4_B et F4_C). Cette diminution était statistiquement significative par rapport au groupe témoin et à chaque stade de fibrose allant de F0 à F4 CP A (Figure 11.D).

La concentration moyenne d'albumine cystéinylée (HSA+CYS) a montré une augmentation notable, passant de 8,7 g/L à 11,1 g/L, lors du passage du groupe de contrôle à Child Pugh A. En revanche, la concentration de cette isoforme a diminué dans les cirrhoses décompensées B (7,9 g/L) et C (6,8 g/L) (Figure 11.E). Par ailleurs, une différence significative a été remarquée en comparant F4_B avec F2, F3 et F4_A, ainsi que F4_C avec F0/F1, F2, F3 et F4_A.

Concernant l'isoforme glyquée, elle présente le même comportement de variation de concentration que l'isoforme cystéinylée. La disparité de concentration se révèle significative lorsque l'on compare les groupes de contrôle à tous les autres stades de fibrose, à l'exception de F0/F1 (Figure 11.F).

En ce qui concerne l'isoforme cystéinylé glyqué, une augmentation de sa concentration a été constatée dans les groupes F2, F3 et F4_B par rapport aux groupes témoins, tandis que cette augmentation n'a pas été observée dans les groupes F4_A et F4_C. Il est remarquable de noter qu'une distinction significative a été détectée entre les groupes F3 et F4_A (Figure 11.G).

La concentration moyenne de l'isoforme doublement glyqué (HSA+2GLYC) a présenté une augmentation significative, passant de 0,4 g/L à 1 g/L, lors du passage du groupe de contrôle à Child Pugh A. En revanche, la concentration de cette isoforme a diminué dans les cirrhoses décompensées B (0,8 g/L) et C (0,7 g/L) (Figure 11.E) à des valeurs comparables aux stades F2/F3 et F0/F1 respectivement. Par ailleurs, une différence significative a été remarquée en comparant le groupe contrôle avec F0/F1 (Figure 11.H).

La concentration moyenne de l'isoforme cystéinylée et doublement glycosylée (HSA+CYS+GLYCx2) était nettement plus élevée dans les stades de cirrhose A (0,12 g/L), B (0,18 g/L) et C (0,2 g/L) que chez les témoins (Figure 11.I).

Comportement discriminatoire des isoformes HSA

Pour mieux comprendre le comportement discriminant des isoformes de HSA, nous avons normalisé la concentration moyenne de quelques isoformes cliniquement significatives isoformes notamment l'isoforme cystéinylé, glyqué et cyteinylé glyqué par rapport à celle de l'albumine native, nous avons constaté une augmentation significative du ratio de concentration de ces isoformes chez les patients atteints de cirrhose B et C décompensée, alors que la concentration restait comparable dans les stades fibrotiques plus précoces (Figure 12.A).

L'isoforme glyqué était la seule capable de discriminer entre le groupe de contrôle et F2. (Figure 12.A.2). De plus, l'isoforme GLYC et CYS+GLYC étaient capables de faire la distinction entre F2 et F4_B (Figure 12.A.2 et 12.A.3), ce qui n'était pas le cas avec l'isoforme cystéinylé (Figure 12.A.1).

En ce qui concerne les courbes ROC, nous avons choisi d'analyser le potentiel discriminant de ces isoformes spécifiques entre le groupe contrôle (82 patients) et les différents stades fibrotiques. Pour l'isoforme cystéinylée, une discrimination avec une sensibilité de 65 % et une spécificité de 98,78 % entre le groupe F4_C de 20 patients et le groupe témoin, a été observé.

Pour l'isoforme glyqué et cystéinylé glyqué, une meilleure discrimination du groupe F4_B de 26 patients par rapport à F4_C a été observé. Pour l'isoforme GLYC, une sensibilité de 84,62 % et une spécificité de 100 % a été observé pour F4_B contre une sensibilité de 70 % et une spécificité de 98,78 % pour F4_C. Pour l'isoforme CYS+GLYC, une sensibilité de 76,92 % et une spécificité de 98,78 % a été observé pour F4_B contre une sensibilité de 70 % et une spécificité de 98,78 % pour F4_C

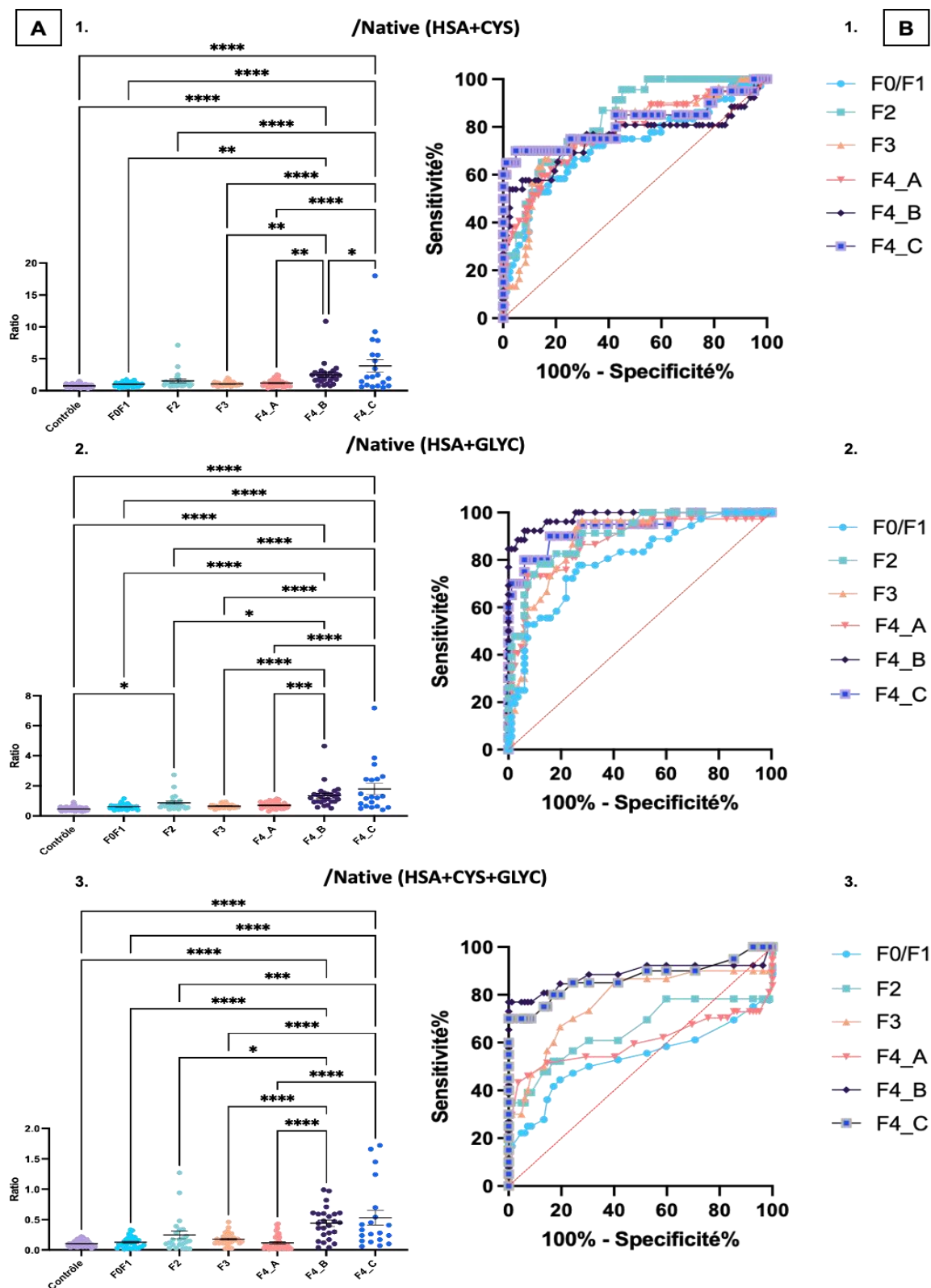


Figure 12: Aperçu du comportement discriminatoire des isoformes HSA.

(A) Ratio de concentration des isoformes spécifiques (Cys, Glyc et CYS+GLYC) de l'albumine normalisée par rapport à l'isoforme native en fonction du stade de fibrose ; (B) Courbe ROC représentant la sensibilité en fonction de la spécificité des isoformes spécifiques (Cys, Glyc et CYS+GLYC) de l'albumine normalisées par rapport à l'isoforme native dans différents groupes de fibrose par rapport au groupe de contrôle.

Après nous être concentrés sur des isoformes spécifiques ayant une pertinence clinique pour distinguer les patients témoins de ceux atteints d'une maladie hépatique, nous avons effectué une analyse en composantes principales (ACP) sur l'ensemble du profil d'albumine déconvolué entre 66 000 et 67 500 pour ces deux groupes de patients afin d'extraire le plus large éventail d'informations possible. L'ACP a montré une séparation entre le groupe contrôle et les différents stades de fibrose. Cependant, à chaque stade, la distinction n'est pas nette pour tous les patients (Figure 13).

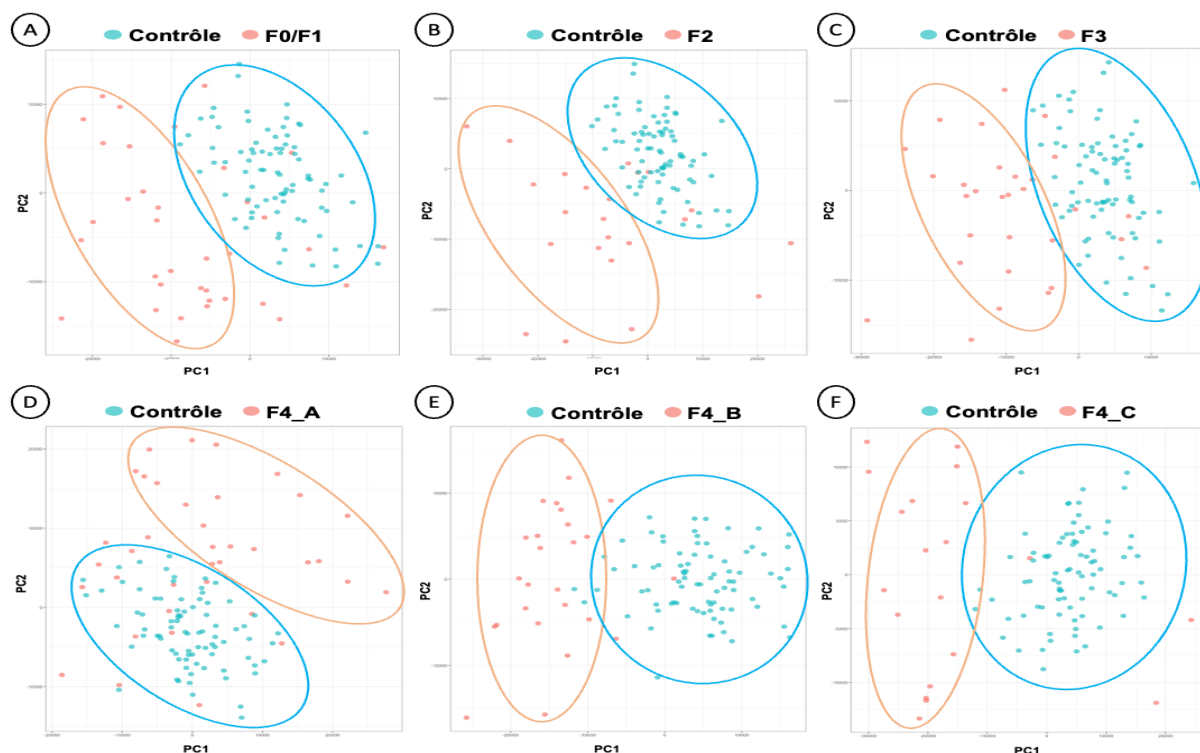


Figure 13: Analyse en composantes principales (ACP).

Données représentatives du profil des isoformes d'albumine entre 66000-67500 Da entre le groupe témoin et les différents stades de fibrose : (A) F0-F1 ; (B) F2 ; (C) F3 ; (D) Child-Pugh A ; (E) Child-Pugh B ; (F) Child-Pugh C.

A la suite des analyses ACP et pour découvrir de plus les relations entre les différents isoformes de l'albumine et leur pouvoir discriminant, un tableau de contingence a été générés par le biais de "machine learning". Ce tableau montre une discrimination assez significative entre le groupe de patients témoins (81/82 sujets correctement prédits) et le groupe de patients atteints. Pour les autres groupes, nous avons obtenu les résultats de prédiction suivants : 17/36 pour F0F1, 0/23 pour F2, 11/30 patients pour F3 et 61/83 patients pour F4 (Figure 14).

Prediction	F0/F1 -	17	4	12	10	0
	F2 -	2	0	1	2	0
	F3 -	7	6	11	8	0
	F4 -	8	12	5	61	1
	Témoin -	2	1	1	2	81
		F0/F1	F2	F3	F4	Témoin
		Truth				

Figure 14: Tableau de contingence pour évaluer le pouvoir discriminatif des isoformes d'albumine.

Discussion

La nouveauté de cette étude réside dans sa description pionnière de la distribution des isoformes d'albumine à différents stades de la maladie hépatique, y compris les phases initiales de la fibrose hépatique. Pour la plupart des isoformes identifiées, nous avons visuellement démontré des différences dans leur distribution entre les sujets témoins et les patients atteints. En outre, nous avons démontré l'importance de prendre en compte l'information globale fournie par les isoformes pour une prédiction potentielle des différentes lésions hépatiques. Ces travaux ont été rendu possible par la méthode de quantification non invasive mise en place par notre équipe et qui fournit des résultats d'une façon assez rapides (20 min). Les échantillons analysés peuvent être obtenue par des procédures de prélèvement sanguin standard.

Les taux d'albumine native peuvent servir de biomarqueur fiable pour détecter la cirrhose B et C, conformément aux résultats récents de Baldassare et al, qui ont démontré son importance principalement en tant que biomarqueur pour les maladies hépatiques avancées [12]. Néanmoins, il est important de noter que son utilité pour diagnostiquer les stades initiaux de la fibrose est susceptible d'avoir une sensibilité et une spécificité limitées.

Après quantification, les concentrations moyennes de chaque isoforme ont été visualisées et analysées à l'aide de diagrammes de dispersion. Les concentrations moyennes des isoformes HSA-DA, HSA+2GLYC étaient significativement différentes à tous les stades de la fibrose par rapport aux patients témoins. Il est à noter que la concentration des isoformes HSA+SO3H, HSA+CYS, HSA+GLYC et HSA+2GLYC était clairement affectée par la décompensation de la cirrhose et était plus faible qu'à tous les autres stades de la maladie. En revanche, l'isoforme HSA+CYS+2GLYC moyenne augmentait dans les stades de cirrhose

décompensée. Cependant, malgré l'observation d'une tendance corrélant la sévérité de la fibrose avec la concentration des isoformes, les différences n'étaient pas significatives entre tous les sous-groupes pour chaque isoforme, comme le montre la figure 11.

Après normalisation de certaines isoformes cliniquement pertinentes, notamment les isoformes cystéinylées, glyquées et cystéinylées glyquées par rapport à l'isoforme native, d'autres informations ont été déduites. Une augmentation significative du ratio de ces isoformes a été observée chez les patients souffrant d'insuffisance hépatique, ce qui peut sembler contradictoire par rapport aux concentrations moyennes indiquées dans la figure 11. En effet, les isoformes d'albumine soumises au stress oxydatif ont tendance à augmenter avec la progression de la maladie hépatique, et de façon encore plus marquée dans les formes décompensées. Cependant, dans le même temps, l'albumine totale (y compris l'albumine native) diminue également, probablement dans une plus large mesure, ce qui peut expliquer la contradiction apparente observée entre les valeurs normalisées et non normalisées.

En outre, les courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) des données normalisées pour ces isoformes spécifiques ont révélé leur capacité individuelle à différencier plus ou moins efficacement les divers stades de la fibrose chez les patients. Cette capacité de discrimination était particulièrement marquée pour les stades B et C de la cirrhose décompensée. L'isoforme cystéinylée se révélait plus performante pour distinguer les stades F4_C des cas témoins que les isoformes glyquées et cystéinylées. En revanche, les isoformes glyquées et cystéinylées glyquées étaient plus efficaces pour discriminer le stade B de la cirrhose que l'isoforme cystéinylée.

Sur la base de ces observations, il est prévisible que l'utilisation d'une seule isoforme ne sera pas suffisante pour discriminer les différents stades de l'atteinte hépatique chez les patients. En outre, les isoformes de l'HSA sont interdépendantes. Si la présence d'isoformes spécifiques est influencée par l'environnement chimique des hépatocytes, les changements de concentration d'une isoforme peuvent avoir un impact sur les niveaux des autres. Il est donc impératif de prendre en compte toutes les isoformes HSA pour chaque patient.

L'analyse en composantes principales (ACP) (Figure 4) et l'utilisation de machine learning pour générer une matrice de contingence (figure 5) nous ont permis d'évaluer les effets cumulatifs de toutes les isoformes. Les deux analyses ont clairement révélé une distinction globale entre les sujets témoins et les patients atteints de lésions hépatiques, bien que certaines fluctuations aient été observées chez quelques patients. Nos résultats confirment donc que l'albumine doit être considérée comme un réseau d'isoformes et qu'il ne suffit pas de se fier à la concentration de chaque isoforme individuelle pour prédire avec précision les différents stades de la fibrose.

En outre, nos résultats sont conformes aux recherches antérieures et les isoformes d'albumine représentent donc une voie prometteuse, bien que nos résultats en soient encore aux stades préliminaires de la recherche. Il est important de noter que notre étude ne s'est pas spécifiquement concentrée sur la prédiction du pronostic, mais nous prévoyons d'évaluer cet aspect dans une future étude de cohorte (Malhabar - Modifications de l'ALbumine dans les Atteintes Hépatiques - un nouveau BiomARqueur).

Notre étude présente plusieurs limites. Premièrement, notre étude préliminaire manque de puissance en raison de l'inclusion d'un nombre relativement faible de patients (172 patients). Deuxièmement, Il existe un biais d'inclusion possible lié à une mauvaise classification de la fibrose chez certains patients. Cette hypothèse est étayée par la grande dispersion de la concentration d'albumine native dans le groupe F2 (Figure 1.A). En combinant les groupes F2 et F3 (Figure 1.B), on observe une différence significative de la concentration en albumine native entre le groupe contrôle et les groupes F2/F3. Ce résultat est cohérent avec les données des analyses en composantes principales, qui montrent une distinction claire entre le groupe de contrôle et les différents stades de fibrose. Cependant, au sein de chaque groupe, certains patients semblent mal classés. Cela peut être lié à la méthode diagnostique de référence utilisée pour déterminer les stades de fibrose. Pour évaluer ces scores, l'élastométrie hépatique (FibroScan) complétée par des données cliniques et biologiques ont été utilisées. Le FibroScan a une bonne valeur prédictive positive pour les stades F3 et F4 mais est moins précis pour distinguer les fibroses F2 et F0/F1 [13]. Si la biopsie hépatique reste l'étalon-or, elle est invasive, comporte des risques et n'est généralement recommandée que lorsqu'elle est indispensable à la prise de décisions thérapeutiques. En outre, la biopsie hépatique présente des imperfections, notamment l'hétérogénéité des lésions dans le foie, les limites de la taille de la biopsie et la variabilité de l'interprétation entre les observateurs [14]. Troisièmement, un biais de sélection parmi les patients de notre étude existe. Les deux principales étiologies observées dans notre population sont la NASH et la consommation chronique d'alcool, ce qui correspond aux données typiques des pays occidentaux (Tableau 2) [15,16]. La consommation chronique d'alcool est plus fréquente chez les patients les plus graves, alors que dans les stades précoces, les patients présentent principalement une NASH. Diverses autres étiologies sont également représentées.

Conclusion

Notre étude était une preuve de concept, basée sur les modifications de l'HSA dans le cadre de la progression des maladies du foie. Nos résultats suggèrent que l'utilisation des isoformes de l'HSA de manière individuelle pour le diagnostic de la fibrose hépatique n'est pas suffisante, car les isoformes de l'HSA sont interdépendantes. Les isoformes de l'HSA devraient être considérées comme un réseau et exploitées par le biais d'une approche de cartographie de ces isoformes. Cela permettra de corréliser l'association des isoformes HSA en fonction des différents stades de fibrose.

Des études supplémentaires sont nécessaires, avec des critères de sélection plus sélectifs, afin d'affiner le rôle pronostique des isoformes d'albumine. Actuellement, un programme de recherche clinique en milieu hospitalier (PHRC) impliquant une population de patients plus large et plus diversifiée avec des étiologies variées est débutée. L'objectif principal de cette recherche est de prédire le pronostic des lésions hépatiques à 3 ans chez les patients atteints d'une maladie hépatique avancée, tout en abordant les défis associés à l'interprétation des tests de fibrose non invasifs.

Références

- [1] R. Williams, R. Aspinall, M. Bellis, G. Camps-Walsh, M. Cramp, A. Dhawan, J. Ferguson, D. Forton, G. Foster, S.I. Gilmore, M. Hickman, M. Hudson, D. Kelly, A. Langford, M. Lombard, L. Longworth, N. Martin, K. Moriarty, P. Newsome, J. O'Grady, R. Pryke, H. Rutter, S. Ryder, N. Sheron, T. Smith, Addressing liver disease in the UK: a blueprint for attaining excellence in health care and reducing premature mortality from lifestyle issues of excess consumption of alcohol, obesity, and viral hepatitis, *The Lancet*. 384 (2014) 1953–1997. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61838-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61838-9).
- [2] N. Ganne-Carrié, [Epidemiology of liver cirrhosis], *Rev. Prat.* 67 (2017) 726–730.
- [3] R. Jalan, K. Schnurr, R.P. Mookerjee, S. Sen, L. Cheshire, S. Hodges, V. Muravsky, R. Williams, G. Matthes, N.A. Davies, Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality, *Hepatology*. 50 (2009) 555–564. <https://doi.org/10.1002/hep.22913>.
- [4] M. Baldassarre, M. Domenicali, M. Naldi, M. Laggetta, F.A. Giannone, M. Biselli, D. Patrono, C. Bertucci, M. Bernardi, P. Caraceni, Albumin Homodimers in Patients with Cirrhosis: Clinical and Prognostic Relevance of a Novel Identified Structural Alteration of the Molecule, *Sci. Rep.* 6 (2016) 35987. <https://doi.org/10.1038/srep35987>.
- [5] E.A. Tsochatzis, K.S. Gurusamy, S. Ntaoula, E. Cholongitas, B.R. Davidson, A.K. Burroughs, Elastography for the diagnosis of severity of fibrosis in chronic liver disease: A meta-analysis of diagnostic accuracy, *J. Hepatol.* 54 (2011) 650–659. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.07.033>.
- [6] V.W.-S. Wong, J. Vergniol, G.L.-H. Wong, J. Foucher, H.L.-Y. Chan, B. Le Bail, P.C.-L. Choi, M. Kowo, A.W.-H. Chan, W. Merrouche, J.J.-Y. Sung, V. De Lédinghen, Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology*. 51 (2010) 454–462. <https://doi.org/10.1002/hep.23312>.
- [7] E. Nguyen-Khac, M. Thiele, C. Voican, P. Nahon, C. Moreno, J. Boursier, S. Mueller, V. De Lédinghen, P. Stärkel, S. Gyune Kim, M. Fernandez, B. Madsen, S. Naveau, A. Krag, G. Perlemuter, M. Ziol, D. Chatelain, M. Diouf, Non-invasive diagnosis of liver fibrosis in patients with alcohol-related liver disease by transient elastography: an individual patient data meta-analysis, *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 3 (2018) 614–625. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30124-9](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30124-9).
- [8] R. De Franchis, J. Bosch, G. Garcia-Tsao, T. Reiberger, C. Ripoll, J.G. Abraldes, A. Albillos, A. Baiges, J. Bajaj, R. Bañares, M. Barrufet, L. Benajiba, A. Berzigotti, C. Bureau, V. Calvaruso, A. Cardenas, G. D'Amico, A. De Gottardi, A. Dell'Era, A. Escorsell, J. Fallowfield, H. Ferral, S. Francque, R. Gaba, J.C. Garcia-Pagàn, J. Genescà, S.G. Rodrigues, J. Gracia-Sancho, G. Han, V. Hernandez-Gea, J. Jia, J.J. Kiladjian, A. Krag, W. Laleman, V. La Mura, S. Lens, X. Luo, M. Mandorfer, S.D. Murad, V. Paradis, D. Patch, S. Piano, M. Pinzani, A. Plessier, M. Primignani, B. Procopet, P.E. Rautou, M. Rudler, S.K. Sarin, F. Schepis, M. Senzolo, V. Shah, A. Shukla, P. Tandon, L. Tellez, D. Thabut, M. Thiele, J. Trebicka, D. Tripathi, E. Tsochatzis, L. Turco, F. Turon, D. Valla, C. Villanueva, I. Wanless, H. Yoshiji, Baveno VII – Renewing consensus in portal hypertension, *J. Hepatol.* 76 (2022) 959–974. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.12.022>.
- [9] Y. Peng, X. Qi, X. Guo, Child–Pugh Versus MELD Score for the Assessment of Prognosis in Liver Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies, *Medicine (Baltimore)*. 95 (2016) e2877. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002877>.
- [10] P. Bedossa, T. Poinard, An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C, *Hepatology*. 24 (1996) 289–293. <https://doi.org/10.1002/hep.510240201>.
- [11] J.J. Heidelbaugh, M. Bruderly, Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation, *Am. Fam. Physician*. 74 (2006) 756–762.
- [12] M. Baldassarre, M. Naldi, G. Zaccherini, M. Bartoletti, A. Antognoli, M. Laggetta, M. Gagliardi, M. Tufoni, M. Domenicali, K. Waterstradt, P. Paterini, A. Baldan, S. Leoni, M. Bartolini, P. Viale, F. Trevisani, M. Bernardi, P. Caraceni, Determination of Effective Albumin in Patients With Decompensated Cirrhosis: Clinical and Prognostic Implications, *Hepatology*. 74 (2021) 2058–2073. <https://doi.org/10.1002/hep.31798>.
- [13] C. Dietrich, J. Bamber, A. Berzigotti, S. Bota, V. Cantisani, L. Castera, D. Cosgrove, G. Ferraioli, M. Friedrich-Rust, O. Gilja, R. Goertz, T. Karlas, R. De Knegt, V. De Lédinghen, F. Piscaglia, B. Procopet, A. Saftoiu, P. Sidhu, I. Sporea, M. Thiele, EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Liver Ultrasound Elastography, Update 2017 (Long Version), *Ultraschall Med. - Eur. J. Ultrasound*. 38 (2017) e16–e47. <https://doi.org/10.1055/s-0043-103952>.
- [14] G. Sebastiani, Non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic liver diseases: Implementation in clinical practice and decisional algorithms, *World J. Gastroenterol.* 15 (2009) 2190. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.2190>.
- [15] C.D. Byrne, G. Targher, NAFLD: A multisystem disease, *J. Hepatol.* 62 (2015) S47–S64. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.012>.
- [16] J.A. Flemming, M. Djerboua, P.A. Groome, C.M. Booth, N.A. Terrault, NAFLD and Alcohol-Associated Liver Disease Will Be Responsible for Almost All New Diagnoses of Cirrhosis in Canada by 2040, *Hepatology*. 74 (2021) 3330–3344. <https://doi.org/10.1002/hep.32032>.

Discussion et perspective générale

Ce travail de thèse à visé applicatif et exploratoire avait pour but d'étudier les modifications post-traductionnelles de l'albumine sérique humain comme biomarqueurs précoces des hépatopathies chroniques. Pour relever ces défis, nous avons choisi une approche translationnelle basée sur le développement analytique, les études in vitro, les expérimentations animales, les études cliniques observationnelles, la modélisation moléculaire et l'utilisation de machine learning.

Dans notre revue de la littérature, nous avons souligné le manque de biomarqueurs capables de prédire le développement de lésions hépatiques précoces chez les patients. Bien que le microARN-122 soit le biomarqueur le plus prometteur à ce jour, son utilisation clinique est limitée par des variations biologiques. L'albumine effective a été récemment démontré comme un biomarqueur de stades avancées des hépatopathies chroniques (14). Néanmoins, il est important de noter que son utilité pour diagnostiquer les stades initiaux de la fibrose est susceptible d'avoir une sensibilité et une spécificité limitées. L'étude des données générées par la quantification des isoformes dans l'étude clinique nous a fourni des informations importantes. Alors que l'utilisation de certaines isoformes individuelles nous a donné un pouvoir discriminant pour les stades avancés de la cirrhose, d'autres étaient insignifiantes alors que leur présence pouvait être importante, d'autant plus que les isoformes sont interdépendantes. Afin de ne manquer aucune information, nous avons pris en compte toutes les isoformes dans le spectre d'albumine. L'effets cumulatifs de toutes les isoformes a révélé une distinction globale entre les sujets témoins et les patients atteints de lésions hépatiques. Des biais d'analyses ont apparait due à certaines limites, notamment à un biais d'inclusion lié à une mauvaise classification des stades de fibrose ainsi que d'étiologie pour certains patients. Nous proposons maintenant des perspectives pour compléter notre travail, contourner les limitations et établir de manière plus concrète l'utilisation des modifications post-traductionnelles de l'albumine comme biomarqueurs précoces des hépatopathies chroniques.

Dans la section consacrée au développement analytique, nous avons présenté trois approches protéomiques différentes, dont l'une (chapitre 3; article 2) se distingue par sa plus grande adaptabilité dans un contexte clinique en ce qui concerne la détection et la quantification des isoformes d'albumine chez les patients (231). Une stratégie à appliquer est qu'une fois que nous avons confirmé la présence d'une isoforme HSA précédemment non découverte par l'approche bottom-up, nous pouvons directement opter pour l'approche top-down pour son identification et sa quantification dans de nouveaux échantillons, sans qu'il soit nécessaire de procéder à une digestion protéolytique préalable. De même, si nous soupçonnons la présence d'une nouvelle isoforme au cours de notre analyse top-down, une digestion protéolytique sera nécessaire pour la confirmer.

En ce qui concerne l'approche top-down, nous avons trouvé des variations de masse de 1 à 5 Da (226) et identifié une compétition d'ionisation lors de l'introduction d'un standard interne pour résoudre le problème de la déviation de masse lors de l'injection directe dans le spectromètre de masse, ce qui n'est pas optimal en termes de spécificité dans un contexte clinique. En conséquence, nous avons optimisé la méthode en ajoutant une colonne chromatographique pour mieux séparer l'albumine de l'étalon interne, améliorant ainsi la spécificité de la méthode, ce qui nous a permis de l'utiliser dans un contexte clinique. Après avoir affiné la spécificité de la méthode en réduisant au minimum le décalage de masse entre

les pics, nous avons encore repéré des décalages pour certains d'entre eux. Cela suscite des interrogations quant à l'existence potentielle d'isoformes non identifiées ou à des éventuelles imperfections dans l'algorithme de déconvolution. Par exemple, une isoforme glyquée devrait présenter une variation de masse de +162 Da par rapport à l'isoforme native, mais dans certains échantillons, cette différence de masse s'élève à +164 Da, alors que seules des erreurs absolues moyennes inférieures à 3 ppm (< 1 Da) ont été tolérées.

Dans la section consacrée aux modifications post-traductionnelles de l'albumine, une approche différente a été utilisée pour souligner l'utilité de l'étude de la structure de l'albumine. Nous démontrons la possibilité d'utiliser l'une de ses propriétés les plus importantes, sa capacité à lier des molécules, pour évaluer le potentiel des PTM en tant que biomarqueurs précoces des maladies hépatiques chroniques. Des isoformes semi-synthétiques produites nous a servi pour améliorer notre compréhension de la structure de l'albumine (232). Malgré le fait que les solutions d'isoformes enrichies n'étaient pas totalement pures, en raison de la pureté de la solution d'albumine de départ, nous avons pu obtenir un pourcentage assez élevé des isoformes cibles dans chaque solution. Des effets discriminants contre une série de ligands de SEB test ont été observés. La capacité de fixation de l'albumine a varié en fonction du type de PTM, donc de l'isoforme produite. Pour rappel, ces mêmes isoformes étaient insensibles aux méthodes de dosage biochimique, dont l'immunoturbidimétrie, (chapitre 4 ; article 3). Les modifications structurelles n'ont pas affecté la capacité de cette méthode à doser l'albumine avec précision, confirmant nos travaux sur l'analyse de la structure de l'albumine comme biomarqueur précoce des lésions hépatiques.

Afin de valider d'avantage notre hypothèse, des modèles animaux mimant des lésions hépatiques ainsi qu'une étude *in silico* ont été utilisés. Le SEB test nous a permis d'évaluer précocement l'état fonctionnel de l'albumine à différents stades de lésions hépatiques. Bien que les modèles animaux d'hépatotoxicité soient limités dans notre étude et que les études *in silico* manquent de diversité, les informations que nous avons obtenues nous ont donné un aperçu de la capacité discriminatoire des isoformes résultant des modifications post-traductionnelles de l'HSA. De plus, l'examen des aspects dynamiques et d'adsorption de la structure de l'albumine a révélé qu'elle est capable de se lier à plus d'atomes que ce qui avait été précédemment signalé, principalement en raison des liaisons non spécifiques.

Développement analytique

Grâce à l'ajout d'un étalon interne dans notre protocole de quantification des isoformes d'albumine, nous avons pu réduire le décalage de masse entre les isoformes d'albumine dans un spectre déconvolué. Après cette optimisation et pour affiner d'avantage la méthode de quantification, l'automatisation du code R utilisé pour l'intégration des pics sera nécessaire pour réduire la subjectivité et l'erreur humaine lors de l'intégration des pics, ce qui à son tour favorisera la cohérence des données spectrales. Ce travail est déjà en cours, ou plusieurs paramètres, y compris le seuil d'intensité, le seuil de différence de masse, le seuil d'asymétrie ainsi que le rapport des pics d'intensité maximale/minimale sont en cours d'être testés dans le code R pour trouver les meilleures conditions d'intégration. En ce qui concerne la résolution des pics déconvolués, qui diffèrent souvent des pics chromatographiques habituellement bien résolus, des investigations futures seront menées pour déterminer si la qualité de la résolution obtenue est imputable à des limitations techniques liées aux instruments et à l'algorithme de

déconvolution, ou si elle relève simplement d'une caractéristique propre au signal de l'albumine.

Expérimentation animale

Une étude *in vivo* sur des modèles animaux expérimentaux à insuffisance hépatocellulaire est à considérer. Elle pourra être inspirée des travaux précédents effectués dans notre unité et de la littérature pour développer d'autres modèles. Le protocole envisagé nécessite l'induction des lésions hépatiques à partir de l'administration par voie orale des substances chimiques spécifiques d'une façon quotidienne selon un plan défini. L'objectif sera de mimer des modèles d'insuffisance hépatocellulaire dans un contexte de maladie hépatique afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques observés chez l'homme.

Ici, nous avons développé deux protocoles utilisant deux modèles différents (éthanol et tétrachlorométhane) pour induire une cirrhose. D'autres modèles pourraient être envisagés en utilisant des produits chimiques différents, comme l'intoxication au paracétamol ou la ligature des voies biliaires avec de l'acide désoxycholique (DCA). Pour améliorer la puissance statistique lors de l'analyse des résultats, nous prévoyons d'utiliser un plus grand nombre de rats dans cette étude. En ce qui concerne les protocoles expérimentaux, nous suivrons le même schéma expérimental, où les substances seront administrées par voie orale sur une base quotidienne sur une plus longue durée.

Étude clinique

Les travaux de cette thèse ont permis la promotion d'une étude clinique impliquant cinq hôpitaux universitaires est envisagée. Il est prévu d'impliquer une population de patients plus large et plus diversifiée. L'objectif principal de cette recherche est de prédire le pronostic des lésions hépatiques à 3 ans chez les patients atteints d'une maladie hépatique avancée, tout en abordant les défis associés à l'interprétation des tests de fibrose non invasifs.

L'essai clinique ALBoM a manqué de puissance, étant donné le nombre relativement faible de patients dans les sous-groupes, le biais dans la classification et l'inclusion des patients, et leur suivi partiellement court. Pour surmonter les limites durant notre prochaine étude clinique, il est prévu de recruter un plus grand nombre de patients, environ 700, avec des profils plus divers et des étiologies variées. Ces patients seront suivis régulièrement lors de visites de routine à l'hôpital pendant au moins trois ans afin d'évaluer les capacités prédictives des isoformes de l'HSA et du SEB test. Cette évaluation sera basée sur des échantillons de sang veineux prélevés en routine dans les laboratoires cliniques. Dans le but de réduire la nécessité de procédures invasives telles que les biopsies, et de minimiser les risques associés, nous comparerons nos biomarqueurs avec des scores couramment utilisés et efficaces en France, notamment le fibromètre®, le fibrotest®, le fibrospect®, le steatotest®, le nashtest® et l'ashttest®. Cette étude permettra de recueillir les données nécessaires pour évaluer les critères d'évaluation suivants : la valeur prédictive positive des modifications post-traductionnelles de l'albumine et du SEB test vis-à-vis de l'évolution des lésions hépatiques, la sensibilité et la spécificité du SEB test et de chaque isoforme d'albumine pour différencier les patients en fonction de la cause de leur lésion hépatique initiale et la capacité de l'algorithme développé à classer les patients en fonction du type de lésion hépatique et de leur risque d'évolution.

Modélisation moléculaire

De même, des études *in silico* plus approfondies sont à considérer. Elle s'agira d'une continuation des travaux antérieurs *in silico* qui nous ont permis d'évaluer l'impact des modifications de l'HSA sur la liaison d'une série de ligands prototypiques. L'objectif sera d'optimiser un outil *in silico* robuste et prédictif permettant d'évaluer, sur demande, toute interaction entre des composés endogènes ou des médicaments et les isoformes de l'HSA.

Cette étude actuelle a utilisé des modèles *in silico* réalistes de l'HSA, notamment l'HSA native, l'HSA tronquée au niveau N-terminal et l'HSA oxydée, pour évaluer les modifications structurales dans chaque modèle et leur impact sur la liaison des ligands du SEB test. Dans ces modèles, seuls deux des sept sites de liaison aux acides gras étaient occupés. Il serait envisageable de développer d'autres modèles où différents sites de liaison aux acides gras pourraient être occupés, afin d'explorer de manière plus approfondie les divers aspects dynamiques de l'albumine, sans imposer de restrictions. De plus, de nouveaux modèles d'HSA pourraient être envisagés, tels que l'HSA nitrosylée ou nitrée, ainsi que l'HSA glyquée. Cependant, l'utilisation de systèmes de modélisation plus puissants sera nécessaire pour cela. Enfin, les données générées seront comparées aux mesures *in vitro* et *in vivo* afin d'affiner l'algorithme d'interprétation.

Machine learning

Dans cette section, nous prévoyons d'optimiser l'algorithme de machine learning en utilisant une combinaison de méthodes d'apprentissage automatique, sur la base d'une grande cohorte de patients qui généreront des données sur les proportions des différentes isoformes HSA et/ou le pourcentage de liaison des différents ligands de SEB test. Notre objectif est d'optimiser et de raffiner cet outil sophistiqué de diagnostic et de pronostic. Il devra être en mesure d'identifier l'origine ou le type de l'atteinte, ainsi que sa gravité, en tenant compte de l'ensemble des isoformes d'albumine qui composent une "signature" spécifique à chaque type d'atteinte.

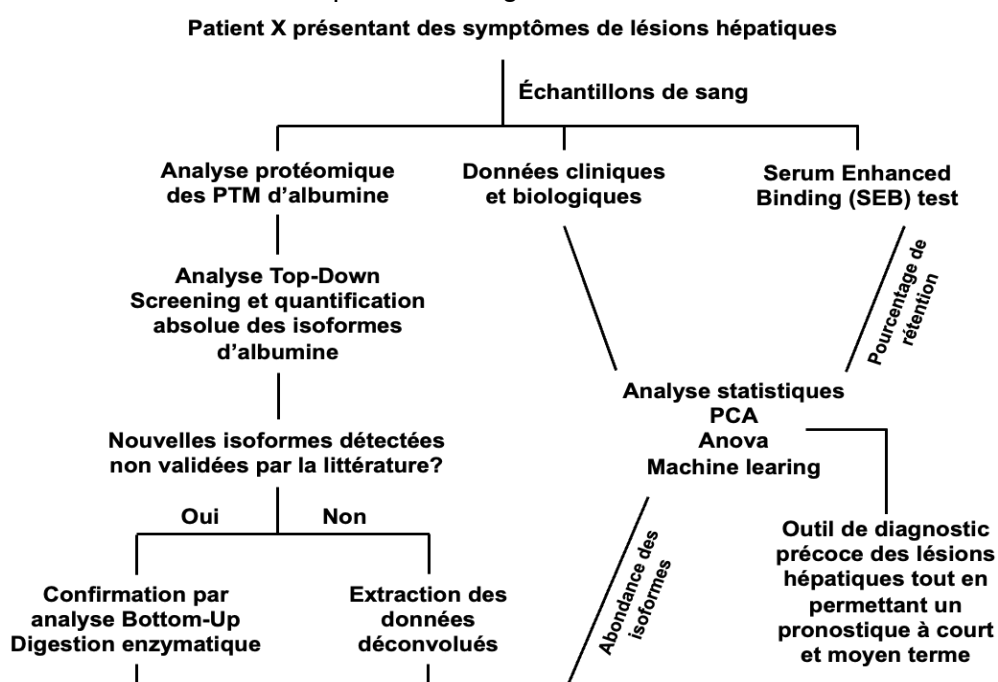
Dans cette étude, nous avons amélioré l'algorithme en nous basant sur une petite cohorte de patients du projet "ALBoM". Prochainement, avec le projet MALAH-BAR, l'objectif principal sera de former l'algorithme d'apprentissage automatique à prédire le pronostic des lésions hépatiques chez les patients atteints de maladies hépatiques, tout en abordant les défis liés à l'interprétation des tests de fibrose non invasifs. Nous envisageons également de calculer diverses mesures de précision dans l'ensemble de données de test et de valider les modèles à l'aide d'un ensemble de données de validation externe.

Conclusion

Nos travaux de thèse en matière de biomarqueurs consistaient à intégrer de nombreux modèles et divers disciplines omiques afin d'atteindre nos objectifs scientifiques focalisé sur l'albuminomique. L'objectif est de valider l'utilisation des modifications post traductionnelles de l'albumine comme biomarqueur précoce des hépatopathies chroniques.

Nous avons évoqué précédemment l'aspect préoccupant des maladies hépatiques chroniques est qu'elles ne sont souvent pas diagnostiquées jusqu'à ce qu'elles atteignent des stades avancés où le taux de survie chute brutalement. De plus, il est important de reconnaître que les outils non invasifs disponibles aujourd'hui dédié pour l'évaluation de la fibrose hépatique ont encore leurs limites, notamment en ce qui concerne l'interprétation des résultats et la précision du diagnostic. Nous visons, en utilisant un mélange distinctif d'expériences analytiques, expérimentation animale, in silico, machine learning et études cliniques, à acquérir une compréhension plus complète, y compris une perspective mécaniste, des liens entre les modifications de l'HSA et les lésions du foie.

L'utilisation des modifications de l'albumine et des profils des isoformes comme biomarqueurs de diagnostic et de suivi des patients hépatiques répond à des besoins insuffisamment satisfaits actuellement. De plus, la richesse d'information pouvant être tirée de ses modifications, que nous commençons tout juste à déchiffrer, conduira dans un avenir assez proche à des outils informatifs, puissants et suffisamment polyvalents (Figure 15) pour permettre de prédire l'évolution des lésions hépatiques et de stratifier d'une manière précise les risques et les causes des atteintes hépatiques des patients. Nos outils auront le potentiel d'offrir un diagnostic précoce des lésions hépatiques tout en permettant un pronostique à court et moyen terme. Ceci permettra d'optimiser le parcours de soins avec des implications sur la prise en charge thérapeutique, y compris sur le plan de l'éducation thérapeutique, et conduira à une meilleure individualisation de la prise en charge et à des économies de soins.



Références bibliographiques

1. Baldassarre M, Domenicali M, Naldi M, Laggetta M, Giannone FA, Biselli M, et al. Albumin Homodimers in Patients with Cirrhosis: Clinical and Prognostic Relevance of a Novel Identified Structural Alteration of the Molecule. *Sci Rep.* déc 2016;6(1):35987.
2. Das S, Maras JS, Hussain MdS, Sharma S, David P, Sukriti S, et al. Hyperoxidized albumin modulates neutrophils to induce oxidative stress and inflammation in severe alcoholic hepatitis. *Hepatology.* févr 2017;65(2):631-46.
3. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *The Lancet.* mai 2014;383(9930):1749-61.
4. Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology.* juin 2005;41(6):1211-9.
5. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: From bench to bedside. *Mol Aspects Med.* juin 2012;33(3):209-90.
6. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia—a preliminary report. *J Emerg Med.* nov 2000;19(4):311-5.
7. Lin B, Ma Y, Wu S, Liu Y, Liu L, Wu L. Novel Serum Biomarkers for Noninvasive Diagnosis and Screening of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-Related Hepatic Fibrosis. *OMICS J Integr Biol.* avr 2019;23(4):181-9.
8. Domenicali M, Baldassarre M, Giannone FA, Naldi M, Mastroroberto M, Biselli M, et al. Posttranscriptional changes of serum albumin: Clinical and prognostic significance in hospitalized patients with cirrhosis. *Hepatology.* déc 2014;60(6):1851-60.
9. Jalan R, Schnurr K, Mookerjee RP, Sen S, Cheshire L, Hodges S, et al. Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality. *Hepatology.* août 2009;50(2):555-64.
10. Kawakami A, Kubota K, Yamada N, Tagami U, Takehana K, Sonaka I, et al. Identification and characterization of oxidized human serum albumin.: A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions. *FEBS J.* juill 2006;273(14):3346-57.
11. Naldi M, Baldassarre M, Nati M, Laggetta M, Giannone FA, Domenicali M, et al. Mass spectrometric characterization of human serum albumin dimer: A new potential biomarker in chronic liver diseases. *J Pharm Biomed Anal.* août 2015;112:169-75.
12. Oetl K, Birner-Gruenberger R, Spindelboeck W, Stueger HP, Dorn L, Stadlbauer V, et al. Oxidative albumin damage in chronic liver failure: Relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. *J Hepatol.* nov 2013;59(5):978-83.
13. Stauber RE, Spindelboeck W, Haas J, Putz-Bankuti C, Stadlbauer V, Lackner C, et al. Human Nonmercaptalbumin-2: A Novel Prognostic Marker in Chronic Liver Failure: HNA2 in Chronic Liver Failure. *Ther Apher Dial.* févr 2014;18(1):74-8.
14. Baldassarre M, Naldi M, Zaccherini G, Bartoletti M, Antognoli A, Laggetta M, et al. Determination of Effective Albumin in Patients With Decompensated Cirrhosis: Clinical and Prognostic Implications. *Hepatology.* oct 2021;74(4):2058-73.
15. Sgro C, Clinard F, Ouazir K, Chanay H, Allard C, Guilleminet C, et al. Incidence of drug-induced hepatic injuries: A French population-based study: Incidence of drug-induced hepatic injuries: A French population-based study. *Hepatology.* août 2002;36(2):451-5.
16. Koehler EM, Plompen EPC, Schouten JNL, Hansen BE, Darwish Murad S, Taimr P, et al. Presence of diabetes mellitus and steatosis is associated with liver stiffness in a general population: The Rotterdam study. *Hepatology.* janv 2016;63(1):138-47.
17. Roulot D, Costes JL, Buyck JF, Warzocha U, Gambier N, Czernichow S, et al. Transient elastography as a screening tool for liver fibrosis and cirrhosis in a community-based population aged

over 45 years. *Gut*. 1 juill 2011;60(7):977-84.

18. Caballería L, Pera G, Arteaga I, Rodríguez L, Alumà A, Morillas RM, et al. High Prevalence of Liver Fibrosis Among European Adults With Unknown Liver Disease: A Population-Based Study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. juill 2018;16(7):1138-1145.e5.
19. Poynard T, Lebray P, Ingiliz P, Varaut A, Varsat B, Ngo Y, et al. RPerseearvchaalrteicnle ce of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest). 2010;
20. Pennisi G, Enea M, Romero-Gomez M, Viganò M, Bugianesi E, Wong VW -S., et al. Liver-related and extrahepatic events in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a retrospective competing risks analysis. *Aliment Pharmacol Ther*. mars 2022;55(5):604-15.
21. Ganne-Carrié N. [Epidemiology of liver cirrhosis]. *Rev Prat*. sept 2017;67(7):726-30.
22. Navarro VJ, Senior JR. Drug-Related Hepatotoxicity. *N Engl J Med*. 16 févr 2006;354(7):731-9.
23. Amathieu R, Nahon P, Triba M, Bouchemal N, Trinchet JC, Beaugrand M, et al. Metabolomic Approach by ¹ H NMR Spectroscopy of Serum for the Assessment of Chronic Liver Failure in Patients with Cirrhosis. *J Proteome Res*. 1 juill 2011;10(7):3239-45.
24. Megarbane B, Deye N, Baud F. Foie toxique : mécanismes lésionnels et thérapeutiques pharmacologiques spécifiques. *Réanimation*. nov 2007;16(7-8):632-42.
25. Tilg H, Day CP. Management strategies in alcoholic liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. janv 2007;4(1):24-34.
26. Friedman SL. Liver fibrosis – from bench to bedside. *J Hepatol*. janv 2003;38:38-53.
27. MacSween RNM, éditeur. Pathology of the liver. 3. ed., reprinted. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. 816 p.
28. Sawadogo A, Dib N, Cales P. Physiopathologie de la cirrhose et de ses complications. *Réanimation*. nov 2007;16(7-8):557-62.
29. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. juill 2017;14(7):397-411.
30. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 1 févr 2005;115(2):209-18.
31. Marrero JA, Fontana RJ, Barrat A, Askari F, Conjeevaram HS, Su GL, et al. Prognosis of hepatocellular carcinoma: Comparison of 7 staging systems in an American cohort. *Hepatology*. avr 2005;41(4):707-15.
32. Turcotte JG, Child CG. Portal Hypertension: Pathogenesis, Management and Prognosis. *Postgrad Med*. janv 1967;41(1):93-102.
33. Pugh RNH, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*. 7 déc 2005;60(8):646-9.
34. Infante-Rivard C, Esnaola S, Villeneuve JP. Clinical and statistical validity of conventional prognostic factors in predicting short-term survival among cirrhotics. *Hepatology*. juill 1987;7(4):660-4.
35. Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, Ter Borg PCJ. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology*. avr 2000;31(4):864-71.
36. Kamath P. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. févr 2001;33(2):464-70.
37. Kim WR, Mannalithara A, Heimbach JK, Kamath PS, Asrani SK, Biggins SW, et al. MELD 3.0: The Model for End-Stage Liver Disease Updated for the Modern Era. *Gastroenterology*. déc 2021;161(6):1887-1895.e4.
38. Merion RM, Schaubel DE, Dykstra DM, Freeman RB, Port FK, Wolfe RA. The Survival Benefit of Liver Transplantation. *Am J Transplant*. févr 2005;5(2):307-13.

39. Bernards S, Lee E, Leung N, Akan M, Gan K, Zhao H, et al. Awarding additional MELD points to the shortest waitlist candidates improves sex disparity in access to liver transplant in the United States. *Am J Transplant.* déc 2022;22(12):2912-20.
40. Ge J, Kim WR, Lai JC, Kwong AJ. “Beyond MELD” – Emerging strategies and technologies for improving mortality prediction, organ allocation and outcomes in liver transplantation. *J Hepatol.* juin 2022;76(6):1318-29.
41. Johnson PJ, Berhane S, Kagebayashi C, Satomura S, Teng M, Reeves HL, et al. Assessment of Liver Function in Patients With Hepatocellular Carcinoma: A New Evidence-Based Approach—The ALBI Grade. *J Clin Oncol.* 20 févr 2015;33(6):550-8.
42. Deng M, Ng SWY, Cheung ST, Chong CCN. Clinical application of Albumin-Bilirubin (ALBI) score: The current status. *The Surgeon.* juin 2020;18(3):178-86.
43. Zhao S, Zhang T, Li H, Wang M, Xu K, Zheng D, et al. Comparison of albumin-bilirubin grade versus Child-Pugh score in predicting the outcome of transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma using time-dependent ROC. *Ann Transl Med.* avr 2020;8(8):538-538.
44. D’Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *J Hepatol.* janv 2006;44(1):217-31.
45. Angeli P, Bernardi M, Villanueva C, Francoz C, Mookerjee RP, Trebicka J, et al. EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *J Hepatol.* août 2018;69(2):406-60.
46. Wong VWS, Adams LA, de Lédinghen V, Wong GLH, Sookoian S. Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH — current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* août 2018;15(8):461-78.
47. Singhal R, Harrill AH, Menguy-Vacheron F, Jayyosi Z, Benzerdjeb H, Watkins PB. Benign elevations in serum aminotransferases and biomarkers of hepatotoxicity in healthy volunteers treated with cholestyramine. *BMC Pharmacol Toxicol.* déc 2014;15(1):42.
48. Schmidt ES, Schmidt FW. Glutamate dehydrogenase: biochemical and clinical aspects of an interesting enzyme. *Clin Chim Acta.* mars 1988;173(1):43-55.
49. Schomaker S, Warner R, Bock J, Johnson K, Potter D, Van Winkle J, et al. Assessment of Emerging Biomarkers of Liver Injury in Human Subjects. *Toxicol Sci.* avr 2013;132(2):276-83.
50. Harrill AH, Roach J, Fier I, Eaddy JS, Kurtz CL, Antoine DJ, et al. The Effects of Heparins on the Liver: Application of Mechanistic Serum Biomarkers in a Randomized Study in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* août 2012;92(2):214-20.
51. Wong WM, Wu PC, Yuen MF, Cheng CC, Yew WW, Wong PC, et al. Antituberculosis drug-related liver dysfunction in chronic hepatitis B infection. *Hepatology.* janv 2000;31(1):201-6.
52. Thulin P, Nordahl G, Gry M, Yimer G, Aklillu E, Makonnen E, et al. Keratin-18 and microRNA-122 complement alanine aminotransferase as novel safety biomarkers for drug-induced liver injury in two human cohorts. *Liver Int.* mars 2014;34(3):367-78.
53. Koelink PJ, Lamers CB, Hommes DW, Verspaget HW. Circulating cell death products predict clinical outcome of colorectal cancer patients. *BMC Cancer.* déc 2009;9(1):88.
54. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* janv 2012;19(1):107-20.
55. Joka D, Wahl K, Moeller S, Schlue J, Vaske B, Bahr MJ, et al. Prospective biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* févr 2012;55(2):455-64.
56. Chu LC, Goggins MG, Fishman EK. Diagnosis and Detection of Pancreatic Cancer. *Cancer J.* nov 2017;23(6):333-42.
57. Wei F, Wu Y, Tang L, Xiong F, Guo C, Li X, et al. Trend analysis of cancer incidence and

mortality in China. *Sci China Life Sci.* nov 2017;60(11):1271-5.

58. Sugimoto K, Moriyasu F, Oshiro H, Takeuchi H, Yoshimasu Y, Kasai Y, et al. Viscoelasticity Measurement in Rat Livers Using Shear-Wave US Elastography. *Ultrasound Med Biol.* sept 2018;44(9):2018-24.

59. Asada M, Galambos JT. Sorbitol Dehydrogenase and Hepatocellular Injury: An Experimental and Clinical Study. *Gastroenterology.* mai 1963;44(5):578-87.

60. Hodgen GD, Sherins RJ. Enzymes as Markers of Testicular Growth and Development in the Rat. *Endocrinology.* oct 1973;93(4):985-9.

61. Yamamoto K, Yamada N. Identification of a diazinon-metabolizing glutathione S-transferase in the silkworm, *Bombyx mori*. *Sci Rep.* 21 juill 2016;6(1):30073.

62. Zhang J, Jin Z, Hu XX, Meng HM, Li J, Zhang XB, et al. Efficient Two-Photon Fluorescent Probe for Glutathione S-Transferase Detection and Imaging in Drug-Induced Liver Injury Sample. *Anal Chem.* 1 août 2017;89(15):8097-103.

63. Giffen PS, Pick CR, Price MA, Williams A, York MJ. Alpha-Glutathione S-Transferase in the Assessment of Hepatotoxicity—Its Diagnostic Utility in Comparison with Other Recognized Markers in the Wistar Han Rat. *Toxicol Pathol.* avr 2002;30(3):365-72.

64. Qiu X, Zhang Y, Liu T, Shen H, Xiao Y, Bourner MJ, et al. Disruption of BSEP Function in HepaRG Cells Alters Bile Acid Disposition and Is a Susceptive Factor to Drug-Induced Cholestatic Injury. *Mol Pharm.* 4 avr 2016;13(4):1206-16.

65. Serlin DM, Kuang PP, Subramanian M, O'Regan A, Li X, Berman JS, et al. Interleukin-1 β induces osteopontin expression in pulmonary fibroblasts. *J Cell Biochem.* 15 févr 2006;97(3):519-29.

66. Kahles F, Findeisen HM, Bruemmer D. Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Mol Metab.* juill 2014;3(4):384-93.

67. He C yan, Liang B bei, Fan X yu, Cao L, Chen R, Guo Y jun, et al. The dual role of osteopontin in acetaminophen hepatotoxicity. *Acta Pharmacol Sin.* août 2012;33(8):1004-12.

68. Arai M, Yokosuka O, Kanda T, Fukai K, Imazeki F, Muramatsu M, et al. Serum osteopontin levels in patients with acute liver dysfunction. *Scand J Gastroenterol.* janv 2006;41(1):102-10.

69. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.* oct 2002;3(10):995-1001.

70. Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentini B, Catalanotti F, Giazzone M, et al. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep.* août 2004;5(8):825-30.

71. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood.* 1 avr 2003;101(7):2652-60.

72. Palumbo R, Sampaioles M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, et al. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol.* 2 févr 2004;164(3):441-9.

73. Venereau E, Casalgrandi M, Schiraldi M, Antoine DJ, Cattaneo A, De Marchis F, et al. Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J Exp Med.* 27 août 2012;209(9):1519-28.

74. Venereau E, De Leo F, Mezzapelle R, Careccia G, Musco G, Bianchi ME. HMGB1 as biomarker and drug target. *Pharmacol Res.* sept 2016;111:534-44.

75. Mikus M, Drobin K, Gry M, Bachmann J, Lindberg J, Yimer G, et al. Elevated levels of circulating CDH5 and FABP1 in association with human drug-induced liver injury. *Liver Int.* janv 2017;37(1):132-40.

76. Bass NM. The Cellular Fatty Acid Binding Proteins: Aspects of Structure, Regulation, and

- Function. In: International Review of Cytology [Internet]. Elsevier; 1988 [cité 10 août 2023]. p. 143-84. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074769608617337>
77. Wu Y li, Peng X e, Zhu Y bing, Yan X li, Chen W nan, Lin X. Hepatitis B Virus X Protein Induces Hepatic Steatosis by Enhancing the Expression of Liver Fatty Acid Binding Protein. Sandri-Goldin RM, éditeur. J Virol. 15 févr 2016;90(4):1729-40.
 78. Wu Y li, Zhu YB, Huang R dong, Peng X e, Lin X. Multiple MicroRNAs Ameliorate Hepatocyte Steatosis and Injury by Suppressing FABP1 Expression. Cell Physiol Biochem. 2017;44(6):2243-55.
 79. Starckx S, Batheja A, Verheyen GR, Jonghe SD, Steemans K, Dijck BV, et al. Evaluation of miR-122 and Other Biomarkers in Distinct Acute Liver Injury in Rats. Toxicol Pathol. juill 2013;41(5):795-804.
 80. Fu S, Wu D, Jiang W, Li J, Long J, Jia C, et al. Molecular Biomarkers in Drug-Induced Liver Injury: Challenges and Future Perspectives. Front Pharmacol. 30 janv 2020;10:1667.
 81. Arroyo V, García-Martínez R, Salvatella X. Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis. J Hepatol. août 2014;61(2):396-407.
 82. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. Protein Eng Des Sel. juin 1999;12(6):439-46.
 83. Ferrer ML, Duchowicz R, Carrasco B, De La Torre JG, Acuña AU. The Conformation of Serum Albumin in Solution: A Combined Phosphorescence Depolarization-Hydrodynamic Modeling Study. Biophys J. mai 2001;80(5):2422-30.
 84. Ascenzi P, Fasano M. Allosteric in a monomeric protein: The case of human serum albumin. Biophys Chem. mai 2010;148(1-3):16-22.
 85. Curry S. Lessons from the Crystallographic Analysis of Small Molecule Binding to Human Serum Albumin. Drug Metab Pharmacokinet. 2009;24(4):342-57.
 86. Varshney A, Sen P, Ahmad E, Rehan Mohd, Subbarao N, Khan RH. Ligand binding strategies of human serum albumin: How can the cargo be utilized? Chirality. janv 2010;22(1):77-87.
 87. Curry S, Mandelkow H, Brick P, Franks N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. Nat Struct Biol. sept 1998;5(9):827-35.
 88. Van Der Vusse GJ. Albumin as Fatty Acid Transporter. Drug Metab Pharmacokinet. 2009;24(4):300-7.
 89. Evans TW. Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure: REVIEW: ALBUMIN AS A DRUG. Aliment Pharmacol Ther. déc 2002;16:6-11.
 90. M H, Azzazy E, Christenson RH. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. Theodore Peters, Jr. San Diego, CA: Academic Press, 1996, 432 pp, \$85.00. ISBN 0-12-552110-3. Clin Chem. 1 oct 1997;43(10):2014a-2015.
 91. Figge J, Rossing TH, Fencel V. The role of serum proteins in acid-base equilibria. J Lab Clin Med. juin 1991;117(6):453-67.
 92. Margaron MP, Soni N. Serum albumin: touchstone or totem?: Serum albumin. Anaesthesia. août 1998;53(8):789-803.
 93. Bolli A, Marino M, Rimbach G, Fanali G, Fasano M, Ascenzi P. Flavonoid binding to human serum albumin. Biochem Biophys Res Commun. juill 2010;398(3):444-9.
 94. Minamiyama Y, Takemura S, Inoue M. Albumin Is an Important Vascular Tonus Regulator as a Reservoir of Nitric Oxide. Biochem Biophys Res Commun. août 1996;225(1):112-5.
 95. Kratz F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. J Controlled Release. déc 2008;132(3):171-83.
 96. Gutteridge JMC. Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid

arthritis. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol.* janv 1986;869(2):119-27.

97. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 11 juin 2008;582(13):1783-7.

98. Rondeau P, Bourdon E. The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Biochimie.* avr 2011;93(4):645-58.

99. Medina-Navarro R, Durán-Reyes G, Díaz-Flores M, Vilar-Rojas C. Protein Antioxidant Response to the Stress and the Relationship between Molecular Structure and Antioxidant Function. Hofmann A, éditeur. *PLoS ONE.* 29 janv 2010;5(1):e8971.

100. Lipinski B. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2011;2011:1-9.

101. Candiano G, Petretto A, Bruschi M, Santucci L, Dimuccio V, Prunotto M, et al. The oxido-redox potential of albumin. *J Proteomics.* déc 2009;73(2):188-95.

102. Arroyo V, García-Martínez R, Salvatella X. Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis. *J Hepatol.* août 2014;61(2):396-407.

103. Duff, Jr. MR, Kumar CV. The metallomics approach: use of Fe(ii) and Cu(ii) footprinting to examine metal binding sites on serum albumins. *Metallomics.* 2009;1(6):518.

104. Sokołowska M, Wszelaka-Rylik M, Poznański J, Bal W. Spectroscopic and thermodynamic determination of three distinct binding sites for Co(II) ions in human serum albumin☆. *J Inorg Biochem.* juill 2009;103(7):1005-13.

105. Balkhi SE, Poupon J, Trocello JM, Massicot F, Woimant F, Laprévote O. Human Plasma Copper Proteins Speciation by Size Exclusion Chromatography Coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Solutions for Columns Calibration by Sulfur Detection. *Anal Chem.* 15 août 2010;82(16):6904-10.

106. Sadler PJ, Tucker A, Viles JH. Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni²⁺ and Cu²⁺ binding site of serum albumins. Comparison with Co²⁺, Cd²⁺ and Al³⁺. *Eur J Biochem.* févr 1994;220(1):193-200.

107. Shaw CF. The Protein Chemistry of Antiarthritic Gold(I) Thiolates and Related Complexes. *Comments Inorg Chem.* mai 1989;8(6):233-67.

108. Li Y, Yan XP, Chen, Xia YL, Jiang Y. Human Serum Albumin–Mercurial Species Interactions. *J Proteome Res.* 1 juin 2007;6(6):2277-86.

109. Shen XC, Liang H, Guo JH, Song C, He XW, Yuan YZ. Studies on the interaction between Ag⁺ and human serum albumin. *J Inorg Biochem.* juin 2003;95(2-3):124-30.

110. Blindauer CA, Harvey I, Bunyan KE, Stewart AJ, Sleep D, Harrison DJ, et al. Structure, Properties, and Engineering of the Major Zinc Binding Site on Human Albumin. *J Biol Chem.* août 2009;284(34):23116-24.

111. Stewart AJ, Blindauer CA, Berezenko S, Sleep D, Tooth D, Sadler PJ. Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin: Redox activity of albumin Cys34. *FEBS J.* janv 2005;272(2):353-62.

112. Mothes E, Faller P. Evidence that the Principal Co^{II}-Binding Site in Human Serum Albumin Is Not at the N-Terminus: Implication on the Albumin Cobalt Binding Test for Detecting Myocardial Ischemia. *Biochemistry.* 1 févr 2007;46(8):2267-74.

113. Stewart AJ, Blindauer CA, Berezenko S, Sleep D, Sadler PJ. Interdomain zinc site on human albumin. *Proc Natl Acad Sci.* avr 2003;100(7):3701-6.

114. Lu J, Stewart AJ, Sadler PJ, Pinheiro TJT, Blindauer CA. Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site. *Biochem Soc Trans.* 1 déc 2008;36(6):1317-21.

115. Appleton DW, Sarkar B. The Absence of Specific Copper(II)-binding Site in Dog Albumin. *J Biol Chem.* août 1971;246(16):5040-6.

116. Rózga M, Sokołowska M, Protas AM, Bal W. Human serum albumin coordinates Cu(II) at its

- N-terminal binding site with 1 pM affinity. *JBIC J Biol Inorg Chem*. 26 juill 2007;12(6):913-8.
117. Zgirski A, Frieden E. Binding of Cu(II) to non-prosthetic sites in ceruloplasmin and bovine serum albumin. *J Inorg Biochem*. juin 1990;39(2):137-48.
 118. Bal W, Christodoulou J, Sadler PJ, Tucker A. Multi-metal binding site of serum albumin. *J Inorg Biochem*. avr 1998;70(1):33-9.
 119. Sokołowska M, Pawlas K, Bal W. Effect of Common Buffers and Heterocyclic Ligands on the Binding of Cu(II) at the Multimetal Binding Site in Human Serum Albumin. *Bioinorg Chem Appl*. 2010;2010:1-7.
 120. Martins EO, Drakenberg T. Cadmium(II), zinc(II), and copper(II) ions binding to bovine serum albumin. A ¹¹³Cd NMR study. *Inorganica Chim Acta*. janv 1982;67:71-4.
 121. Ni Dhubbghaill OM, Sadler PJ, Tucker A. Drug-induced reactions of bovine serum albumin: proton NMR studies of gold binding and cysteine release. *J Am Chem Soc*. janv 1992;114(3):1118-20.
 122. Christodoulou J, Sadler PJ, Tucker A. A New Structural Transition of Serum Albumin Dependent on the State of Cys34. Detection by ¹H-NMR Spectroscopy. *Eur J Biochem*. oct 1994;225(1):363-8.
 123. Messori L, Balerna A, Ascone I, Castellano C, Gabbiani C, Casini A, et al. X-ray absorption spectroscopy studies of the adducts formed between cytotoxic gold compounds and two major serum proteins. *JBIC J Biol Inorg Chem*. mars 2011;16(3):491-9.
 124. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol*. nov 1976;12(6):1052-61.
 125. Klammt S, Mitzner S, Stange J, Brinkmann B, Drewelow B, Emmrich J, et al. Albumin-binding function is reduced in patients with decompensated cirrhosis and correlates inversely with severity of liver disease assessed by model for end-stage liver disease: *Eur J Gastroenterol Hepatol*. mars 2007;19(3):257-63.
 126. Petipras I, Petersen CE, Ha CE, Bhattacharya AA, Zunszain PA, Ghuman J, et al. Structural basis of albumin–thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. *Proc Natl Acad Sci*. 27 mai 2003;100(11):6440-5.
 127. Xu X, Hu J, Xue H, Hu Y, Liu Y nan, Lin G, et al. Applications of human and bovine serum albumins in biomedical engineering: A review. *Int J Biol Macromol*. déc 2023;253:126914.
 128. Smith LM, Kelleher NL. Proteoforms as the next proteomics currency. *Science*. 9 mars 2018;359(6380):1106-7.
 129. Monacelli F, Storace D, D'Arrigo C, Sanguineti R, Borghi R, Pacini D, et al. Structural Alterations of Human Serum Albumin Caused by Glycative and Oxidative Stressors Revealed by Circular Dichroism Analysis. *Int J Mol Sci*. 23 mai 2013;14(6):10694-709.
 130. Alvarez B, Carballal S, Turell L, Radi R. Formation and Reactions of Sulfenic Acid in Human Serum Albumin. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2010 [cité 11 août 2023]. p. 117-36. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687910730056>
 131. Naldi M, Baldassarre M, Domenicali M, Giannone FA, Bossi M, Montomoli J, et al. Mass spectrometry characterization of circulating human serum albumin microheterogeneity in patients with alcoholic hepatitis. *J Pharm Biomed Anal*. avr 2016;122:141-7.
 132. Temple A, Yen TY, Gronert S. Identification of specific protein carbonylation sites in model oxidations of human serum albumin. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1 août 2006;17(8):1172-80.
 133. Stewart AJ, Blindauer CA, Berezenko S, Sleep D, Tooth D, Sadler PJ. Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin: Redox activity of albumin Cys34. *FEBS J*. janv 2005;272(2):353-62.
 134. Ashraf JM, Rabbani G, Ahmad S, Hasan Q, Khan RH, Alam K, et al. Glycation of H1 Histone by 3-Deoxyglucosone: Effects on Protein Structure and Generation of Different Advanced Glycation End Products. *Uversky VN, éditeur. PLOS ONE*. 29 juin 2015;10(6):e0130630.

135. Brownlee M. The pathological implications of protein glycation. *Clin Investig Med Med Clin Exp.* août 1995;18(4):275-81.
136. Rabbani G, Ahn SN. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo. *Int J Biol Macromol.* févr 2019;123:979-90.
137. Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Howell SK, Beisswenger PJ, Thornalley PJ. Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes. *Diabetologia.* août 2005;48(8):1590-603.
138. Sakata N, Moh A, Takebayashi S. Contribution of superoxide to reduced antioxidant activity of glycoxidative serum albumin. *Heart Vessels.* 1 nov 2002;17(1):22-9.
139. Bourdon E, Loreau N, Blache D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J.* févr 1999;13(2):233-44.
140. Van Campenhout A, Van Campenhout C, Lagrou AR, Moorkens G, De Block C, Manuel-y-Keenoy B. Iron-binding antioxidant capacity is impaired in diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med.* mai 2006;40(10):1749-55.
141. Kumari N, Bandyopadhyay D, Kumar V, Venkatesh DB, Prasad S, Prakash S, et al. Glycation of albumin and its implication in Diabetes: A comprehensive analysis using mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* sept 2021;520:108-17.
142. Barzegar A, Moosavi-Movahedi A, Sattarahmady N, Hosseinpour-Faizi M, Aminbakhsh M, Ahmad F, et al. Spectroscopic Studies of the Effects of Glycation of Human Serum Albumin on L-Trp Binding. *Protein Pept Lett.* 1 janv 2007;14(1):13-8.
143. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation.* 8 août 2006;114(6):597-605.
144. Mera K, Nagai M, Brock JWC, Fujiwara Y, Murata T, Maruyama T, et al. Glutaraldehyde is an effective cross-linker for production of antibodies against advanced glycation end-products. *J Immunol Methods.* mai 2008;334(1-2):82-90.
145. Liyasova MS, Schopfer LM, Lockridge O. Reaction of human albumin with aspirin in vitro: Mass spectrometric identification of acetylated lysines 199, 402, 519, and 545. *Biochem Pharmacol.* mars 2010;79(5):784-91.
146. Meyer JG, D'Souza AK, Sorensen DJ, Rardin MJ, Wolfe AJ, Gibson BW, et al. Quantification of Lysine Acetylation and Succinylation Stoichiometry in Proteins Using Mass Spectrometric Data-Independent Acquisitions (SWATH). *J Am Soc Mass Spectrom.* 1 nov 2016;27(11):1758-71.
147. Taguchi K, Giam Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M. Pharmaceutical Aspects of the Recombinant Human Serum Albumin Dimer: Structural Characteristics, Biological Properties, and Medical Applications. *J Pharm Sci.* sept 2012;101(9):3033-46.
148. Matsushita S, Chuang VTG, Kanazawa M, Tanase S, Kawai K, Maruyama T, et al. Recombinant Human Serum Albumin Dimer has High Blood Circulation Activity and Low Vascular Permeability in Comparison with Native Human Serum Albumin. *Pharm Res.* mai 2006;23(5):882-91.
149. Ascenzi P, Salvati L, Bolognesi M, Colasanti M, Polticelli F, Venturini G. Inhibition of Cysteine Protease Activity by NO-donors. *Curr Protein Pept Sci.* 1 juin 2001;2(2):137-53.
150. Ishima Y, Narisoko T, Kragh-Hansen U, Kotani S, Nakajima M, Otagiri M, et al. Nitration of indoxyl sulfate facilitates its cytotoxicity in human renal proximal tubular cells via expression of heme oxygenase-1. *Biochem Biophys Res Commun.* sept 2015;465(3):481-7.
151. Harohalli K, Petersen CE, Ha CE, Feix JB, Bhagavan NV. Site-directed mutagenesis studies of human serum albumin define tryptophan at amino acid position 214 as the principal site for nitrosation. *J Biomed Sci.* janv 2002;9(1):47-58.
152. Yamakura F, Ikeda K. Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitrogen species. *Nitric Oxide.* mars 2006;14(2):152-61.

153. Khan HA. N-nitro-L-arginine, a nitric oxide synthase inhibitor, aggravates iminodipropionitrile-induced neurobehavioral and vestibular toxicities in rats. *Exp Toxicol Pathol.* nov 2012;64(7-8):791-6.
154. Kashiba-Iwatsuki M, Miyamoto M, Inoue M. Effect of Nitric Oxide on the Ligand-Binding Activity of Albumin. *Arch Biochem Biophys.* sept 1997;345(2):237-42.
155. Alvarez B, Radi R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids.* déc 2003;25(3-4):295-311.
156. Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association? *J Clin Invest.* 15 janv 2003;111(2):163-9.
157. Bregere C, Rebrin I, Sohal RS. Detection and Characterization of In Vivo Nitration and Oxidation of Tryptophan Residues in Proteins. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2008 [cité 13 août 2023]. p. 339-49. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687908012196>
158. Bar-Or D, Rael LT, Bar-Or R, Slone DS, Craun ML. The formation and rapid clearance of a truncated albumin species in a critically ill patient. *Clin Chim Acta.* mars 2006;365(1-2):346-9.
159. Naldi M, Giannone FA, Baldassarre M, Domenicali M, Caraceni P, Bernardi M, et al. A Fast and Validated Mass Spectrometry Method for the Evaluation of Human Serum Albumin Structural Modifications in the Clinical Field. *Eur J Mass Spectrom.* déc 2013;19(6):491-6.
160. Taverna M, Marie AL, Mira JP, Guidet B. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann Intensive Care.* 2013;3(1):4.
161. Gundry RL, Fu Q, Jelinek CA, Van Eyk JE, Cotter RJ. Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome. *PROTEOMICS – Clin Appl.* janv 2007;1(1):73-88.
162. Sbarouni E, Georgiadou P, Voudris V. Ischemia modified albumin changes – review and clinical implications. *cclm.* 1 févr 2011;49(2):177-84.
163. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A. Correlation of Glucose Regulation and Hemoglobin A_{1c} in Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 19 août 1976;295(8):417-20.
164. Bunn HF, Gabbay KH, Gallop PM. The Glycosylation of Hemoglobin: Relevance to Diabetes Mellitus. *Science.* 7 avr 1978;200(4337):21-7.
165. Koga M, Saito H, Mukai M, Otsuki M, Kasayama S. Serum glycated albumin levels are influenced by smoking status, independent of plasma glucose levels. *Acta Diabetol.* juin 2009;46(2):141-4.
166. Koga M, Kasayama S, Kanehara H, Bando Y. CLD (chronic liver diseases)-HbA_{1c} as a suitable indicator for estimation of mean plasma glucose in patients with chronic liver diseases. *Diabetes Res Clin Pract.* août 2008;81(2):258-62.
167. Bando Y, Kanehara H, Toya D, Tanaka N, Kasayama S, Koga M. Association of serum glycated albumin to haemoglobin A_{1c} ratio with hepatic function tests in patients with chronic liver disease. *Ann Clin Biochem Int J Lab Med.* sept 2009;46(5):368-72.
168. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature.* mars 2003;422(6928):193-7.
169. Altelaar AFM, Munoz J, Heck AJR. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet.* janv 2013;14(1):35-48.
170. Masson GR, Burke JE, Ahn NG, Anand GS, Borchers C, Brier S, et al. Recommendations for performing, interpreting and reporting hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) experiments. *Nat Methods.* juill 2019;16(7):595-602.
171. Zheng J, Strutzenberg T, Pascal BD, Griffin PR. Protein dynamics and conformational changes explored by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Curr Opin Struct Biol.* oct 2019;58:305-13.
172. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science.* 6 oct 1989;246(4926):64-71.

173. Griffiths IW, J. J. Thomson — the Centenary of His Discovery of the Electron and of His Invention of Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 15 janv 1997;11(1):2-16.
174. Dempster AJ. Positive Ray Analysis of Lithium and Magnesium. *Phys Rev.* 1 déc 1921;18(6):415-22.
175. Munson MSB, Field FH. Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction. *J Am Chem Soc.* juin 1966;88(12):2621-30.
176. Devienne FM, Roustan JC. 'Fast atom bombardment'—A rediscovered method for mass spectrometry. *Org Mass Spectrom.* avr 1982;17(4):173-81.
177. Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Process.* sept 1987;78:53-68.
178. Karas Michael, Hillenkamp Franz. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 15 oct 1988;60(20):2299-301.
179. Yamashita M, Fenn JB. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem.* sept 1984;88(20):4451-9.
180. Byrdwell WC. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids.* avr 2001;36(4):327-46.
181. El-Aneed A, Cohen A, Banoub J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Appl Spectrosc Rev.* avr 2009;44(3):210-30.
182. Haag AM. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. In: Mirzaei H, Carrasco M, éditeurs. *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cité 18 août 2023]. p. 157-69. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 919). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-41448-5_7
183. Gerardi AR, Lubbeck JL, Colyer CL. Dimethylditetradecylammonium bromide (2C14DAB) as a self-assembled surfactant coating for detection of protein–dye complexes by CE-LIF. *J Solid State Electrochem.* avr 2009;13(4):633-8.
184. Bigler L. Mass spectrometry - recent applications in chemistry, pharmacology and biology. avr 2009 [cité 23 sept 2023]; Disponible sur: <https://www.zora.uzh.ch/id/eprint/20797>
185. Savaryn JP, Toby TK, Kelleher NL. A researcher's guide to mass spectrometry-based proteomics. *PROTEOMICS.* sept 2016;16(18):2435-43.
186. Kalli A, Smith GT, Sweredoski MJ, Hess S. Evaluation and Optimization of Mass Spectrometric Settings during Data-dependent Acquisition Mode: Focus on LTQ-Orbitrap Mass Analyzers. *J Proteome Res.* 5 juill 2013;12(7):3071-86.
187. Ludwig C, Gillet L, Rosenberger G, Amon S, Collins BC, Aebersold R. Data-independent acquisition-based SWATH - MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol.* août 2018;14(8):e8126.
188. Duong VA, Park JM, Lee H. Review of Three-Dimensional Liquid Chromatography Platforms for Bottom-Up Proteomics. *Int J Mol Sci.* 23 févr 2020;21(4):1524.
189. Zhang Z, Wu S, Stenoien DL, Paša-Tolić L. High-Throughput Proteomics. *Annu Rev Anal Chem.* 12 juin 2014;7(1):427-54.
190. Zhang J, Guy MJ, Norman HS, Chen YC, Xu Q, Dong X, et al. Top-Down Quantitative Proteomics Identified Phosphorylation of Cardiac Troponin I as a Candidate Biomarker for Chronic Heart Failure. *J Proteome Res.* 2 sept 2011;10(9):4054-65.
191. Peng Y, Gregorich ZR, Valeja SG, Zhang H, Cai W, Chen YC, et al. Top-down Proteomics Reveals Concerted Reductions in Myofilament and Z-disc Protein Phosphorylation after Acute Myocardial Infarction. *Mol Cell Proteomics.* oct 2014;13(10):2752-64.
192. Roth MJ, Plymire DA, Chang AN, Kim J, Maresh EM, Larson SE, et al. Sensitive and Reproducible Intact Mass Analysis of Complex Protein Mixtures with Superficially Porous Capillary

Reversed-Phase Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 15 déc 2011;83(24):9586-92.

193. Shi Y, Xiang R, Horvath C, Wilkins J. The role of liquid chromatography in proteomics. *J Chromatogr A.* 22 oct 2004;1053(1-2):27-36.
194. Carroll J, Fearnley IM, Walker JE. Definition of the mitochondrial proteome by measurement of molecular masses of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 31 oct 2006;103(44):16170-5.
195. Muneeruddin K, Thomas JJ, Salinas PA, Kaltashov IA. Characterization of Small Protein Aggregates and Oligomers Using Size Exclusion Chromatography with Online Detection by Native Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 4 nov 2014;86(21):10692-9.
196. Queiroz JA, Tomaz CT, Cabral JMS. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J Biotechnol.* mai 2001;87(2):143-59.
197. Muneeruddin K, Nazzaro M, Kaltashov IA. Characterization of Intact Protein Conjugates and Biopharmaceuticals Using Ion-Exchange Chromatography with Online Detection by Native Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Top-Down Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 6 oct 2015;87(19):10138-45.
198. Ganem B, Li YT, Henion JD. Observation of noncovalent enzyme-substrate and enzyme-product complexes by ion-spray mass spectrometry. *J Am Chem Soc.* sept 1991;113(20):7818-9.
199. Katta V, Chait BT. Observation of the heme-globin complex in native myoglobin by electrospray-ionization mass spectrometry. *J Am Chem Soc.* oct 1991;113(22):8534-5.
200. Leney AC, Heck AJR. Native Mass Spectrometry: What is in the Name? *J Am Soc Mass Spectrom.* 1 janv 2017;28(1):5-13.
201. Heuvel RHVD, Heck AJ. Native protein mass spectrometry: from intact oligomers to functional machineries. *Curr Opin Chem Biol.* oct 2004;8(5):519-26.
202. Heck AJR. Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology. *Nat Methods.* nov 2008;5(11):927-33.
203. Sharon M, Witt S, Glasmacher E, Baumeister W, Robinson CV. Mass Spectrometry Reveals the Missing Links in the Assembly Pathway of the Bacterial 20 S Proteasome. *J Biol Chem.* juin 2007;282(25):18448-57.
204. Bakhtiari M, Konermann L. Protein Ions Generated by Native Electrospray Ionization: Comparison of Gas Phase, Solution, and Crystal Structures. *J Phys Chem B.* 28 févr 2019;123(8):1784-96.
205. Robinson CV. Mass spectrometry: From plasma proteins to mitochondrial membranes. *Proc Natl Acad Sci.* 19 févr 2019;116(8):2814-20.
206. Gault J, Donlan JAC, Liko I, Hopper JTS, Gupta K, Housden NG, et al. High-resolution mass spectrometry of small molecules bound to membrane proteins. *Nat Methods.* avr 2016;13(4):333-6.
207. Lössl P, Snijder J, Heck AJR. Boundaries of Mass Resolution in Native Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1 juin 2014;25(6):906-17.
208. Tamara S, Den Boer MA, Heck AJR. High-Resolution Native Mass Spectrometry. *Chem Rev.* 27 avr 2022;122(8):7269-326.
209. Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates JR. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chem Rev.* 10 avr 2013;113(4):2343-94.
210. Tholey A, Becker A. Top-down proteomics for the analysis of proteolytic events - Methods, applications and perspectives. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* nov 2017;1864(11):2191-9.
211. Tsiatsiani L, Heck AJR. Proteomics beyond trypsin. *FEBS J.* juill 2015;282(14):2612-26.
212. Cornelis R. Handbook of elemental speciation: techniques and methodology. Chichester, West Sussex, England: Wiley; 2003.
213. Szpunar J. Trace element speciation analysis of biomaterials by high-performance liquid

- chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection. *TrAC Trends Anal Chem.* mars 2000;19(2-3):127-37.
214. Nearing MM, Koch I, Reimer KJ. Complementary arsenic speciation methods: A review. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* sept 2014;99:150-62.
 215. Haraguchi H. Metallomics: Integrated Biometal Science. In: Ogra Y, Hirata T, éditeurs. *Metallomics* [Internet]. Tokyo: Springer Japan; 2017 [cité 21 août 2023]. p. 3-39. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-56463-8_1
 216. Shi W, Chance MR. Metallomics and metalloproteomics. *Cell Mol Life Sci.* oct 2008;65(19):3040-8.
 217. Cabrera A, Alonzo E, Sauble E, Chu YL, Nguyen D, Linder MC, et al. Copper binding components of blood plasma and organs, and their responses to influx of large doses of ⁶⁵Cu, in the mouse. *BioMetals.* oct 2008;21(5):525-43.
 218. Lopez-Avila V, Sharpe O, Robinson WH. Determination of ceruloplasmin in human serum by SEC-ICPMS. *Anal Bioanal Chem.* sept 2006;386(1):180-7.
 219. Sviridov D, Meilinger B, Drake SK, Hoehn GT, Hortin GL. Coelution of Other Proteins with Albumin during Size-Exclusion HPLC: Implications for Analysis of Urinary Albumin. *Clin Chem.* 1 mars 2006;52(3):389-97.
 220. Lobinski R, Moulin C, Ortega R. Imaging and speciation of trace elements in biological environment. *Biochimie.* nov 2006;88(11):1591-604.
 221. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VTG, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, et al. Cys34-Cysteinylated Human Serum Albumin Is a Sensitive Plasma Marker in Oxidative Stress-Related Chronic Diseases. Khan RH, éditeur. *PLoS ONE.* 8 janv 2014;9(1):e85216.
 222. Alcaraz-Quiles J, Casulleras M, Oetl K, Titos E, Flores-Costa R, Duran-Güell M, et al. Oxidized Albumin Triggers a Cytokine Storm in Leukocytes Through P38 Mitogen-Activated Protein Kinase: Role in Systemic Inflammation in Decompensated Cirrhosis. *Hepatology.* nov 2018;68(5):1937-52.
 223. Sharma N, Pandey S, Yadav M, Mathew B, Bindal V, Sharma N, et al. Biomolecular map of albumin identifies signatures of severity and early mortality in acute liver failure. *J Hepatol.* sept 2023;79(3):677-91.
 224. Jalan R, Schnurr K, Mookerjee RP, Sen S, Cheshire L, Hodges S, et al. Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality. *Hepatology.* août 2009;50(2):555-64.
 225. Lefebvre D, Fenaille F, Merda D, Blanco-Valle K, Feraudet-Tarisse C, Simon S, et al. Top-Down Mass Spectrometry for Trace Level Quantification of Staphylococcal Enterotoxin A Variants. *J Proteome Res.* 4 févr 2022;21(2):547-56.
 226. Tabata F, Wada Y, Kawakami S, Miyaji K. Serum Albumin Redox States: More Than Oxidative Stress Biomarker. *Antioxidants.* 24 mars 2021;10(4):503.
 227. Jin W, Burton L, Moore I. LC-HRMS quantitation of intact antibody drug conjugate trastuzumab emtansine from rat plasma. *Bioanalysis.* 1 juin 2018;10(11):851-62.
 228. Takahashi T, Terada T, Arikawa H, Kizaki K, Terawaki H, Imai H, et al. Quantitation of Oxidative Modifications of Commercial Human Albumin for Clinical Use: Thiol Oxidation and Carbonylation. *Biol Pharm Bull.* 2016;39(3):8.
 229. Bar-Or D, Bar-Or R, Rael LT, Gardner DK, Slone DS, Craun ML. Heterogeneity and oxidation status of commercial human albumin preparations in clinical use*: *Crit Care Med.* juill 2005;33(7):1638-41.
 230. Amal T, Kasim AA, Khaled N, Lucia M, Ioan S. Effect of different concentrations of olive oil and oleic acid on the mechanical properties of albumen (egg white) edible films. *Afr J Biotechnol.* 5 oct 2011;10(60):12963-72.

231. Rahali MA, Lakis R, Sauvage FL, Pinault E, Marquet P, Saint-Marcoux F, et al. Posttranslational-modifications of human-serum-albumin analysis by a top-down approach validated by a comprehensive bottom-up analysis. *J Chromatogr B*. mai 2023;1224:123740.
232. Lakis R, Sauvage FL, Pinault E, Marquet P, Saint-Marcoux F, El Balkhi S. Semi-synthetic human albumin isoforms: Production, structure, binding capacities and influence on a routine laboratory test. *Int J Biol Macromol*. oct 2023;250:126239.

Annexes

Annexe 1. Contenu supplémentaire de l'article expérimentale 1	169
Annexe 2. Contenu supplémentaire de l'article expérimentale 2	180
Annexe 3. Contenu supplémentaire de l'article expérimentale 3	182
Annexe 4. Contenu supplémentaire de l'article expérimentale 4	188

SUPPLEMENTARY DATA

Material and Methods

1. Materials and reagents

Acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), trifluoroacetic acid (TFA) and formic acid (FA) were obtained from Fisher Scientific (LC-MS grade, Illkirch, France). Dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAA), ammonium formate and ammonium bicarbonate were purchased from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France), sequencing grade trypsin from Promega (Charbonnières, France). Oasis® HLB (3cc, 60mg) cartridges were purchased from Waters (Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

2. Top-down approach

Sample preparation

20 µL of serum were diluted with 980 µL of an aqueous 20mM ammonium formate solution containing 0.1% FA. After vortex-mixing, the mixture was centrifuged at 10°C and 14,000 g and then 300 µL of the supernatant were passed through a 0.22 µm cellulose acetate filter before injection.

Liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

The chromatographic separation was performed using a Nexera LC40 system (Shimadzu Corporation, Noisiel, France) equipped with a thermostated column compartment and a thermostated autosampler with a six-port switching valve. Samples were analyzed in the flow injection analysis mode (FIA) at 50 µL/min under isocratic conditions in 3 min using a mixture of 50% phase A (2mM ammonium formate, 0.1% FA) and 50% phase B (0.1 % FA in ACN: mobile phase A, 90:10, by volume).

Mass spectrometric detection was performed using a Q-TOF mass spectrometer (TripleTOF® 5600+, Sciex, Concord, Canada) equipped with a DuoSpray™ ion source and operated in the positive ionization mode. A calibration solution was injected each hour in order to recalibrate the mass analyzer. The source conditions were as follows: temperature, 200 °C; declustering potential (DP), 250 V; curtain gas (CUR), 40 units; ion source gas (GS1, GS2), respectively 70 and 10 units; and ion-spray voltage floating, 5.5 kV. All MS parameters were controlled by Analyst® TF 1.7 (Sciex). *m/z* ratios were scanned using a TOF MS scan from *m/z* 900 and 1,800 with an accumulation time of 500 ms.

Spectrum deconvolution and relative intensity of the signals

The LC-MS data were processed using PeakView® 2.2 software and its Bio Tool Kit 2.2.0 feature (Sciex). The input MS spectrum selected from 1,300 to 1,600 was deconvoluted between *m/z* 1,000 to 200,000 at low resolution (5,000). The reconstructed spectra were then centroided and exported as text files to be imported in R software. The relative intensity was calculated by dividing the peak area of the identified isoform by the sum of the peak areas of all isoforms in the mass range chosen.

2. Bottom-up approach

Tryptic digestion

A volume equivalent to 100 µg of proteins was either alkylated in 10 mM IAA (to maintain albumin integrity), or reduced in 5 mM DTT and alkylated in 10 mM IAA (to reduced disulfide bonds). Digestion was performed overnight at 37 °C using 0.1 µg of trypsin. The peptide samples were then purified on a 3cc 60 mg HLB cartridge as follows: conditioning with 3 mL MeOH, equilibration with 3mL of 0.5% FA in water, loading of sample diluted with 3 mL of 0.5% FA in water, 2 washes with 3mL of 0.5% FA in water and elution with 3 mL MeOH. After evaporation under nitrogen, the digests were resolubilized at 1 µg/µl in 100 µL of the loading solvent (2% ACN, 0.05% TFA). The extracts were kept at -80°C until analysis.

Library generation for SWATH analysis

The resulting peptides were analyzed by microLC-MS/MS using a nanoLC 425 system (Eksigent, Dublin, CA) in the micro-flow mode, coupled with a TripleTOF 5600+ (Sciex) operating with a resolution of 30,000 in MS spectrum and 22,000 in MS/MS spectrum. Reverse-phase LC was performed in a trap-and-elute configuration using a trap column (C18 Pepmap100 cartridge, 0.3 mm i.d. × 5 mm, 5µm; Thermo Scientific) and an analytical column (ChromXP C18 column, 150 × 0.3 mm i.d., 120Å, 3 µm; Sciex) with the following mobile phases: above mentioned loading solvent, solvent A (0.1% FA in water) and solvent B (95% ACN, 0.1% FA). All samples were loaded, trapped and desalted using a flowrate of 10 µL/min with the loading solvent for 5 minutes. The chromatographic separation was performed at a flow rate of 3 µL/min as follows: initial, 5% B, increased to 35% in 63 min, then increased to 95% B in 3 min, maintained at 95% for 7 min, and finally, decreased to 5% B for reequilibration.

1µg of each sample was subjected to data-dependent acquisition (DDA) to generate the SWATH-MS spectral library. MS and MS/MS data were continuously recorded with up to 40 precursors selected for fragmentation from each MS survey scan, giving a total cycle time of 4.25 s. Precursor selection was based upon ion intensity and whether or not the precursor has been previously selected for fragmentation (dynamic exclusion). Ions were fragmented using the rolling collision energy mode.

All DDA mass spectrometer files were searched using ProteinPilot software v.5.0.1 (Sciex) and the Paragon algorithm. Searching parameters were set up as follows: cysteine alkylation with iodoacetamide, digestion by trypsin and presence of potential biological modifications. The search was conducted using a thorough identification effort against an in-house database containing the HSA sequence after processing (Albumin Chain from 25 to 609 of Uniprot P02768 sequence) and known truncated variants (N-terminal truncation with DA loss and C-terminal truncation with L loss). The output of this search was a group file containing all the identified peptides, which were manually checked to assess the existence of the proposed sequence. The result of this search led to the creation of a reference spectral library containing all the validated peptides carrying or not PTMs. One example of MS/MS spectrum for each PTM is available in **Supplementary Figure 1**.

SWATH analysis and data processing

One µg of each sample was then subjected to cyclic DIA of mass spectra using 60 variable swath windows over the 300-1,250 m/z range using the same chromatographic method as for the DDA analysis. Variable windows were manually defined in a way that the unchanged and modified isoforms of the same peptide cannot be found in the same window to avoid false assignments. For these experiments, the mass spectrometer was operated to obtain a 50-ms survey scan (TOF-MS), followed by MS/MS analyses of all precursors using an accumulation time of 75 ms per swath window, giving a total cycle time of 4.55 s. Ions were fragmented using the rolling collision energy mode adapted to the swath window m/z range.

Spectral alignment and targeted data extraction from DIA spectra were made using MultiQuant Software 3.0.1 (Sciex), considering the four to six most abundant fragments for each peptide with a resolution of 40,000. The list of validated peptides with the corresponding SWATH window number, predicted retention time and fragments (in bold, those carrying the PTM) are presented in **Supplemental Table III**.

Mass peak areas were collected for all fragments for each peptide and listed in **Supplemental Figure 1**. For the peptide 21-41 carrying the cysteinylolation on Cys34, an estimated relative abundance between the unchanged peptide (represented by the carbamidomethylated isoform) and the cysteinylated isoform was calculated by dividing the isoform area by the sum of all the peptide isoforms.

Supplemental Table I. Clinical characteristics of patients without and with hepatic disorders.

	Controls		Patients with hepatic dysfunction			
Sample identification	1	2	3	4	5	6
Characteristics						
Age, years	74	75	55	53	64	67
Gender (M/F)	F	M	M	M	F	M
Etiology of hepatic disorders	-	-	MI	OH	MI	OH
Biochemical parameters						
Serum bilirubin, UI/L	4.7	14.2	30.7	34.7	85.3	28.8
Serum albumin, g/L	42.6	45.7	31.7	29.2	27.7	34.6
Serum creatinine, µM	57	90	89	99	70	171
ASAT, UI/L	17	19	56	46	45	54
ALAT, UI/L	15	27	27	29	24	41
INR	0.94	1.12	1.70	1.36	1.68	1.38
Sodium, mM	140	141	145	134	129	128
Clinical parameters						
Ascites	-	-	Slight	Moderate	Slight	Moderate
Encephalopathy grade	-	-	0	4	0	3
Prognostic scores of cirrhosis						
Child-Pugh class (A/B/C) and score	-	-	B8	C11	C10	C10
MELD score	-	-	15	17	18.5	25

INR: International Normalized Ratio; MELD: Model of End-Stage Liver Disease; OH: alcoholic cirrhosis; MI: mixed cirrhosis

Supplemental Table II: Quantification of HSA isoforms by relative intensity in the top-down approach (MD : mass difference ; PA : peak area; RI : relative intensity)

		Control (1)				Control (2)				Cirrhosis B (3)				
	Isoforms	Mass (Da)	MD	PA	RI (%)	Mass (Da)	MD	PA	RI (%)	Mass (Da)	MD	PA	RI (%)	
A	HSA-DA	66250.5	-186	0.41	1.63	66253.0	-185	0.01	0.03	66252.8	-183	0.04	0.17	
B	HSA-L	66321.8	-115	1.51	6.06	66326.3	-112	0.01	0.06	66321.3	-115	0.62	2.48	
C	HSA+Cys-DA	66363.8	-73	0.12	0.5	66367.8	-70	0.01	0.03	66367.3	-69	0.06	0.22	
D	HSA Native	66436.5	0	10.09	40.35	66437.8	0	6.13	24.54	66435.8	0	8.00	32.02	
E	HSA+NO	66465.3	29	1.06	4.24			0.00	0.00	66465.3	30	0.69	2.76	
F	HSA+3Ox	66487.8	51	1.5	6.01	66494.8	57	0.3	1.2	66483.8	48	0.67	2.66	
G	HSA+2(3Ox)	66531.0	95	0.3	1.21	66538.8	101	0.29	1.16	66535.5	100	0.22	0.89	
H	HSA+Cys	66555.3	119	4.99	19.97	66557.3	120	5.9	23.61	66554.5	119	7.41	29.65	
I	HSA+Cys+1Ox	66574.0	138	0.65	2.61	66579.0	141	1.00	3.99	66575.0	139	1.02	4.1	
J	HSA+Glyc	66600.8	164	2.44	9.75	66599.5	162	4.38	17.52	66600.0	164	3.29	13.16	
K	HSA+Glyc+Ox1	66618.5	182	0.41	1.66	66625.8	188	0.57	2.28	66619.3	184	0.33	1.32	
L	HSA+Glyc+3Ox	66644.8	208	0.19	0.75	66638.5	201	0.35	1.42	66646.5	211	0.15	0.62	
M	HSA+Cys+Glyc	66718.0	282	0.47	1.86	66718.5	281	2.2	8.79	66717.3	282	1.64	6.56	
N	HSA+GSH	66734.8	298	0.07	0.3	66741.0	303	0.37	1.46	66735.3	300	0.38	1.5	
O	HSA+2Glyc	66755.3	319	0.05	0.21	66764.8	327	1.36	5.46	66765.0	329	0.34	1.34	
P	HSA+Cys+2Glyc													
Total spectrum					25	100			25	100			25	100
Total isoforms					24	97			23	92			25	99

		Cirrhosis C (4)				Cirrhosis C (5)				Cirrhosis C (6)				
	Isoforms	Mass (Da)	MD	PA	RI (%)	Mass (Da)	MD	AUC	RI (%)	Mass (Da)	MD	PA	RI (%)	
A	HSA-DA	66255.8	-181	0.00	0.02	66260.0	-178	0.00	0.01	66252.5	-186	0.00	0.02	
B	HSA-L													
C	HSA+Cys-DA	66368.0	-69	0.43	1.71	66367.5	-70	0.01	0.05	66368.0	-70	0.45	1.82	
D	HSA Native	66437.0	0	1.89	7.54	66437.8	0	1.39	5.57	66438.0	0	1.42	5.67	
E	HSA+NO	66463.0	26	0.07	0.28					66467.8	30	1.09	4.38	
F	HSA+3Ox	66486.0	49	0.03	0.12									
G	HSA+2(3Ox)	66534.8	98	0.46	1.86	66538.5	101	0.26	1.02	66533.0	95	0.85	3.4	
H	HSA+Cys	66555.0	118	14.11	56.46	66557.8	120	11.84	47.37	66557.3	119	8.06	32.24	
I	HSA+Cys+1Ox	66573.5	137	1.85	7.4	66581.8	144	1.72	6.87	66578.3	140	1.74	6.98	
J	HSA+Glyc	66606.8	170	0.94	3.77	66602.8	165	1.73	6.93	66603.3	165	2.2	8.81	
K	HSA+Glyc+Ox1	66622.0	185	0.27	1.07	66618.8	181	0.91	3.62	66625.8	188	0.74	2.95	
L	HSA+Glyc+3Ox	66648.0	211	0.07	0.26	66640.8	203	0.37	1.47	66640.8	203	0.71	2.83	
M	HSA+Cys+Glyc	66715.8	279	2.91	11.64	66721.3	284	3.98	15.93	66720.8	283	4.47	17.88	
N	HSA+GSH	66739.0	302	0.33	1.33	66742.3	305	0.87	3.47	66741.8	304	0.59	2.34	
O	HSA+2Glyc	66761.8	325	0.16	0.66	66766.3	329	0.84	3.35	66762.8	325	0.48	1.94	
P	HSA+Cys+2Glyc	66877.8	441	0.15	0.62	66879.8	442	0.34	1.34	66880.3	442	1.13	4.52	
Total spectrum					25	100			25	100			25	100
Total isoforms					24	95			24	97			24	96

Supplemental Table III: SWATH-MS library of HSA.

Amino acids #	Peptide sequence	theoretical m/z	z	SWATH Experiment	SWATH Window	RT	Fragments for MRM reconstruction (fragments carrying PTM in bold)				
start - end											
11-20	FKDLGEEFNK	409.5399	3	14	408.4-420.5	22.2	519.2562	408.2242	666.3093	723.3308	
11-20	FK[CRM]DLGEEFNK	635.3091	2	38	634.7-637.4	34.2	951.4418	723.3308	836.4149	484.2034	
13-20	DLGEEFNK	476.2245	2	20	470.4-481.1	21.2	723.3308	519.2562	408.2242	666.3093	
21-41	ALVLIAFAQYLQQ[CAM]PFEDHVK	830.7665	3	55	829.5-847.3	59.0	284.1969	871.4308	1031.4726	397.2809	1400.6627 1563.726
21-41	ALVLIAFAQYLQQ[SCC]PFEDHVK	638.8224	4	39	637.656.7	55.8	284.1969	871.4308	1093.4441	397.2809	1349.5613 1462.6454
42-51	LVNVETEFAK	575.3111	2	33	565.4-575.7	28.5	937.4625	595.3086	694.377	1036.531	
42-51	LVN[Dea]EVTFAK	575.8032	2	34	575.5-581.6	27.9	938.4489	595.3086	694.377	1037.515	
42-51	LVN[Dea]EVTFAK	575.8032	2	34	575.5-581.6	30.35	938.4489	595.3086	694.377	1037.515	
42-51	LVNVETFE[oxi]AK	583.3086	2	35	580.6-598.4	28.8	953.4575	611.3035	710.3719	1052.5259	
65-73	SLHTLFGDK	339.8503	3	6	339.1-349.1	26.0	466.2296	319.1612	262.1397	680.3614	
65-81	SLHTLFGDKL[CAM]TVATLR	483.7647	4	22	481.4-492.1	37.4	460.2878	389.2507	338.1823	871.4308	
65-81	SLHTLFGDKL[CAM]TVATLR	644.6839	3	39	637.656.7	37.4	820.4346	660.4039	933.5186	460.2878	
74-81	LCTVATLR	438.7522	2	16	430.5-442	28.6	460.2878	660.4039	763.4131	559.3562	
74-81	LC[CAM]TVATLR	467.2629	2	19	462.4-471.4	21.8	660.4039	460.2878	559.3562	820.4346	
74-81	LC[Dea]TVATLR	421.7584	2	15	419.5-431.5	24.3	729.4254	460.2878	559.3562	660.4039	
74-81	LC[oxi]TVATLR	462.7446	2	18	451.463.4	27.0	460.2878	559.3562	660.4039	265.0853	
82-93	EYTGEMAD[CAM]C[CAM]IAK	717.7703	2	47	716.1-722.6	17.5	855.3158	1041.3798	724.2753	538.2112	378.1806
94-106	QI[GG]EPEPNECC[CAM]FLQHK	566.5949	3	33	565.4-575.7	20.0	284.1717	729.3513	672.3828	241.0819	
94-114	QEPEPNECC[CAM]FLQHKDDNPMLPR	659.8122	4	40	655.7-665	19.4	596.3515	710.3944	940.4483	258.1084	
94-114	QI[GG]EPEPNECC[CAM]FLQHKDDNPMLPR	565.5556	4	39	637.656.7	23.0	596.3515	499.2987	272.1717	241.0819	
99-106	NEC[CAM]FLQHK	359.1712	3	9	357.5-368	15.0	416.7103	284.1717	481.2316	525.3144	
99-114	NEC[CAM]FLQHKDDNPMLPR	499.9878	4	24	496.501.1	20.6	499.2987	272.1717	596.3515	385.2558	
107-114	DDNPMLPR	470.7278	2	20	470.4-481.1	15.0	596.3515	272.1717	499.2987	710.3944	
115-136	LVRPEVDVMC[CAM]TAFHDNEETFLK	663.3215	2	40	655.7-665	41.0	809.4516	908.52	595.3562	995.468	871.8793
115-136	LVRPEVDVM[oxi]C[CAM]TAFHDNEETFLK	667.3202	4	41	664.669.5	34.5	809.4516	595.3562	908.52	995.468	879.8767
115-137	LVRPEVDVM[oxi]C[CAM]TAFHDNEETFLKK	559.6766	5	32	549.566.4	31.35	809.4516	595.3562	275.2078	1008.536	
137-144	KYLVEIAR	528.2978	2	29	525.5-539.6	24.1	927.4934	764.4301	651.3461	129.1022	
138-144	YLVEIAR	464.2504	2	19	462.4-471.4	27.7	651.3461	488.2827	277.1547	764.4301	
138-144	YL[oxi]VEIAR	472.2478	2	20	470.4-481.1	27.9	651.3461	488.2827	764.4301	293.1496	249.1609
138-144	YL[YNn]VEIAR	472.2478	2	20	470.4-481.1	27.9	667.341	488.2827	780.425	277.1547	265.156
138-144	YL[YNn]VEIAR	486.7429	2	22	481.4-492.1	35.0	696.3311	809.4152	249.1598	277.1547	
145-159	RHPFYAPELLFFAK	633.6699	3	37	615.3-635.7	48.57	701.3518	964.5502	554.2834	935.4522	
146-159	RHPFYAPELLFFAK	581.6362	3	35	580.6-598.4	52.8	779.3511	964.5502	545.2507	512.2867	
163-174	AAFTTEC[CAM]C[CAM]QAADK	686.287	2	44	682.3-686.6	16.0	852.3339	1082.4241	981.3764	692.3032	532.2726
163-174	AAFTTEC[CAM]C[CAM]Q[Dea]QAADK	686.779	2	45	686.4-693.5	16.63	1083.4081	853.3179	982.3605	533.2566	
163-174	AAFTTEC[DHA]C[2ox]QAADK	628.2666	2	37	615.3-635.7	22.67	966.3833	865.3356	736.293	667.2716	532.2726
163-174	AAFTTEC[DHA]CQAADKouAAFTTECC[DHA]QAADK	612.2717	2	36	597.4-616.3	17.37	833.3458	934.3935	704.3032	635.2817	601.294
175-181	AAC[CAM]LLPK	386.7229	2	11	377.5-389	22.0	630.3643	244.1656	470.3337	701.4015	
175-181	AAC[DHA]LLPK	341.2183	2	6	339.1-349.1	23.26	539.3552	244.1656	143.0815	610.3923	
175-181	AAC[SCC]LLPK	417.7142	2	14	408.4-420.5	17.99	692.347	244.1656	357.2496	763.3841	
182-186	IDELR	323.1819	2	4	319.7-330.7	14.5	532.7276	417.2456	288.203	229.1183	
182-190	LDLRDEGK	358.8524	3	9	357.5-368	12.3	481.2329	423.7194	359.1981	204.1343	
198-205	LK[L]Ac[CAM]ASLQK	495.2761	2	23	491.9-497	15.6	706.3552	284.1969	876.4608		
200-205	C[CAM]ASLQK	353.6813	2	7	348.1-354	7.09	475.2875	546.3246	232.075	319.1071	275.1714
200-205	C[CAM]ASLQ[Dea]K	354.1733	2	8	353.8-358.5	8.01	476.2715	547.3086	232.075	319.1071	276.1554
213-218	AWAVAR	337.1926	2	5	329.7-340.1	19.5	416.2616	258.1237	345.2245	602.3409	
213-218	AW[2ox]AVAR	353.1876	2	7	348.1-354	9.97	416.2616	290.1135	345.2245	616.3202	
213-218	AW[2ox]AVAR	353.1876	2	7	348.1-354	10.86	416.2616	290.1135	345.2245	616.3202	
213-218	AW[2ox]AVAR	353.1876	2	7	348.1-354	15.86	416.2616	290.1135	345.2245	634.3307	
213-218	AW[2ox]AVAR	353.1876	2	7	348.1-354	18.9	416.2616	290.1135	345.2245	616.3202	
213-218	AW[oxi]AVAR	345.1901	2	6	339.1-349.1	19.54	416.2616	345.2245	274.1186		
226-233	AEFAEVSK	440.7242	2	16	430.5-442	17.07	680.3614	533.293	201.087	348.1554	
226-233	AEFI[oxi]AEVSK	448.7216	2	17	441.452	16.61	696.3563	533.293	201.087	364.1503	
226-240	AEFAEVSK[Hex]LVTDLTK	604.9874	3	36	597.4-616.3	48.71	201.087	348.1554	577.3192	789.4716	
234-240	LVTDLTK	395.2395	2	12	388.998.9	19.6	577.3192	676.3876	213.1598	361.2445	
241-257	VHTECC[CAM]C[CAM]HGDLLCC[CAM]ADDR	522.4648	4	28	513.4-526.5	19.4	290.1459	636.2406	476.21	605.2424	765.2832
241-262	VHTECC[CAM]C[CAM]HGDLLCC[CAM]ADDRADLAK	647.0349	4	39	637.656.7	23.19	237.1346	1134.5208	218.1499		
263-274	YIC[CAM]ENQDISISK	722.3247	2	47	716.1-722.6	15.8	1167.4946	321.1769	878.4214	1007.464	
263-274	YIC[CAM]ENQ[Dea]DISISK	722.8167	2	48	722.4-751.2	17.4	1168.4787	321.1769	1008.448	879.4054	
275-286	LKEC[CAM]C[CAM]EKPLLEK	387.4546	4	11	377.5-389	15.22	599.3763	276.1554	820.3328	948.4278	
275-286	LKEC[DHA]C[2ox]EKPLLEK	358.4444	4	8	353.8-358.5	18.86	599.3763	389.2395	832.3869	530.7708	496.2601
277-286	EC[CAM]C[CAM]EKPLLEK	435.8774	3	16	430.5-442	15.49	599.3763	502.3235	899.375	290.0805	
277-286	EC[CAM]C[CAM]EKPLLEK	653.3125	2	39	637.656.7	15.49	599.3763	290.0805	1016.5445	727.4713	
277-286	EC[DHA]C[2ox]EKPLLEK	397.1972	3	12	388.998.9	19.1	599.3763	389.2395	670.2501	783.3342	
282-286	PLLEK	300.1918	2	2	299.5-310.7	15.6	502.3235	389.2395	324.2282	453.2708	
287-313	SHC[CAM]IAEVENDM[oxi]PADPLSLAADFVSK	997.4513	3	60	987.1089.8	47.07	1163.5943	385.1289	698.2926	797.3611	
318-323	NYAEAK	348.1716	2	6	339.1-349.1	6.79	418.2296	347.1925	218.1499	789.1135	
324-336	DVFLGMLFYEYAR	812.3974	2	51	794.8-815	60.0	1149.5397	1092.5183	961.4778	1262.6238	
324-336	DVFLGML[oxi]FYEYAR	820.3949	2	52	814.820.7	54.7	1165.5347	1108.5132	961.4778	701.3253	
337-348	RHPDYSVLLLR	489.9525	3	22	481.4-492.1	36.4	613.4396	514.3711	401.2871	756.3424	
337-348	RH[AAS]PDYSVLLLR	498.6244	3	24	496.501.1	40.6	613.4242	514.3583	401.277	782.3385	
337-348	RHPDY[oxi]SVLLLR	495.2842	3	23	491.9-497	35.8	613.4396	514.3711	978.5982	772.3733	
338-348	HPDYSVLLLR	656.3746	2	40	655.7-665	40.5	1174.683	1077.6303	962.6033	235.119	
338-348	HPDYSVLLLR	437.9188	3	16	430.5-442	40.5	514.3711	401.2871	613.4396	699.3097	
352-359	TYETLEK	492.7478	2	23	491.9-497	16.5	720.3774	591.3348	883.4407	265.1183	
360-372	C[CAM]C[CAM]AAADPHCC[CAM]YAK	518.2041	3	28	513.4-526.5	11.05	670.2865	392.1057	807.3454	904.3982	
373-378	VDFEFK	392.6974	2	12	388.998.9	26.5	685.3192	538.2508	294.1812	423.2238	
373-389	VDFEFKPLVEEPQNLK	682.37	3	43	672.682	43.72	712.4352	1279.7256	899.9829	1069.5888	
373-389	VDFEFKPLVEEPQ[Dea]NLK	682.698	3	44	682.3-686.6	45.15	1280.7096	713.4192	900.4749	616.3665	487.3239
373-389	VDFEFKPLVEEPQ[Dea]NLK	682.698	3	44	682.3-686.6	44.5	1280.7096	713.4192	900.4749	616.3665	488.3079
379-389	PLVEEPQNLK	640.3665	2	39	637.656.7	32.9	211.1441	1069.5888	712.4352	970.5204	
390-402	QNC[CAM]ELFQLEGEYK	829.38	2	54	822.829.7	39.8	1013.4938	496.2402	866.4254	1126.5779	
390-402	QI[GG]N[CAM]ELFQLEGEYK	820.8667	2	53	820.5-823	46.65	1013.4938	532.182	496.2402	866.4254	
390-402	QNC[CAM]ELFQ[Dea]LEGEYK	829.872	2	55	829.5-847.3	41.9	1014.4779	609.3243	738.3668	310.1761	
390-402	QNC[DHA]ELFQLEGEYK	783.8754	2	50	756.5-795.3	39.23	1324.642	101			

Supplemental Table III (end):

Amino acids #		Peptide sequence	theoretical m/z		z	SWATH		SWATH		RT	Fragments for MRM reconstruction (fragments carrying PTM in bold)			
start	- end					Experiment	Window							
485-500		RPC[CAM]FS[-2H]ALEVDETYVPK	636.9769	3	38		634.7-637.4	33.3			959.4404	717.3137	244.1656	830.3978
485-500		RPC[DHA]FSALEVDETYVPK	607.3123	3	36		597.4-616.3	37.4			870.4468	628.3202	244.1656	741.4042
485-500		RPC[3On]FSALEVDETYVPK	951.4511	2	57		908.2-953	38.7			254.1612	552.2235	1350.6787	1648.7411
485-500		R[CRM]RPC[CAM]FSALEVDETYVPK	977.4724	2	59		959-988	40.0			244.1656	1004.4618	1218.5572	762.3352
501-519		EFNAETFTFHADIC[CAM]TLSEK	754.0124	3	49		750.2-756.7	41.4			1036.4979	835.3982	587.2821	737.3498
501-521		EFNAETFTFHADIC[CAM]TLSEKER	637.0471	4	38		634.7-637.4	38.6			648.3311	373.1506	761.4152	1250.6045
525-534		KQ[Dea]TALVELVK	376.9044	3	10		367-378.5	26.0			542.3297	488.3079	587.3763	429.2456
525-534		KQ[Dea]TALVELVK	565.345	2	32		549-566.4	27.99			872.5451	1001.5877	771.4975	488.3079
525-534		K[Hex]Q[Dea]TALVELVK	430.922	3	16		430.5-442	25.7			700.4604	587.3763	488.3079	520.2613
525-534		K[CRM]Q[Dea]TALVELVK	586.3609	2	35		580.6-598.4	32.8			872.5451	771.4975	700.4604	172.1081
525-534		K[1Ac]Q[Dea]TALVELVK	585.8583	2	35		580.6-598.4	33.7			872.5452	299.1714	771.4975	700.4604
526-534		Q[Dea]TALVELVK	500.8055	2	24		496-501.1	32.1			587.3763	488.3079	771.4975	624.3352
526-534		Q[Dea]TALVELVK	501.2975	2	25		500.9-503.4	34.31			587.3763	488.3079	771.4975	397.2082
526-534		Q[PGQ]TALVELVK	492.2922	2	23		491.9-497	33.8			587.3763	488.3079	266.1135	379.1976
526-534		Q[PGQ]T[1Ac]TALVELVK	513.2975	2	27		507.4-514.4	48.63			587.3763	700.4604	237.087	308.1241
526-534		Q[T[Dh]]TALVELVK	491.8002	2	22		481.4-492.1	32.07			624.3352	737.4192	396.2241	836.4876
546-557		AVNDD[Dea]FAAFVEK	671.821	2	42		669.4-673	44.6			1172.5292	1041.4888	926.4618	664.3665
546-557		AVN[2Qx]DDFAAFVEK	687.8159	2	45		686.4-693.5	39.4			1204.5191	1041.4888	811.4349	664.3665
546-557		AVN[2Qx]DDFAAFVEK	679.8185	2	43		672-682.5	38.1			1041.4888	1188.5242	664.3665	811.4349
561-573		ADDKETC[CAM]FAEEGK	500.5488	3	24		496-501.1	13.8			533.2566	680.325	462.2195	1070.4459
561-574		ADDKETC[CAM]FAEEGKK	543.2471	3	30		538.6-547.5	5.7			661.3515	590.3144	808.4199	820.3142
565-574		ETC[CAM]FAEEGK	400.1851	3	13		397.9-409.4	5.8			590.3144	661.3515	461.2718	332.2292
574-585		KLVAASQAALGL	571.3506	2	33		565.4-575.7	32.8			840.4938	769.4567	953.5778	698.4196
575-584		LVAASQAALG	450.7611	2	17		441-452	23.54			641.3617	712.3988	570.3246	213.1598
575-585		LVAASQAALGL	507.3031	2	26		502.4-507.6	37.9			189.1234	712.3988	641.3617	132.1019
575-585		LVAASQ[Dea]AALGL	507.7951	2	27		507.4-514.4	39.9			189.1234	713.3828	132.1019	642.3457
575-585		LVAASQ[Dea]AALGL	1014.583	1	60		987-1089.8	39.9			713.3828	642.3457	826.4669	883.4884

Supplementary Figure 1: Representative MS/MS spectra of 6 peptides carrying different HSA PTMs

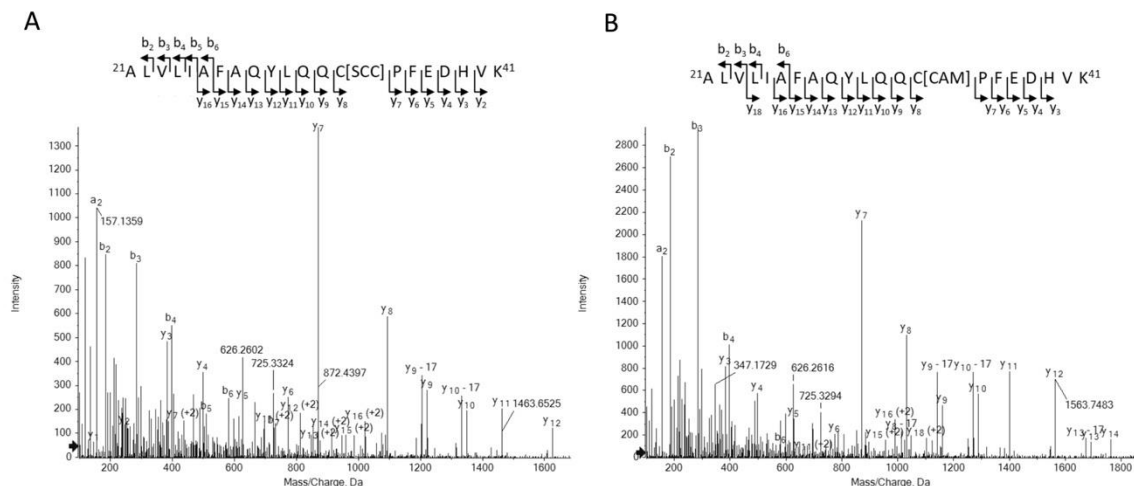


Figure S1: Representative MS/MS spectra of the $^{21}\text{ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK}^{41}$ peptide: carbamidomethylated [CAM] isoform corresponding to the non-modified isoform (A) or cysteinylated [SCC] isoform (B) on Cys34. The b/y fragments detected and annotated on each spectrum confirm the identified peptidic sequence. A minimum of 4 fragments among the most intense were used to create the SWATH library. When present, at least one fragment carrying the modification was added.

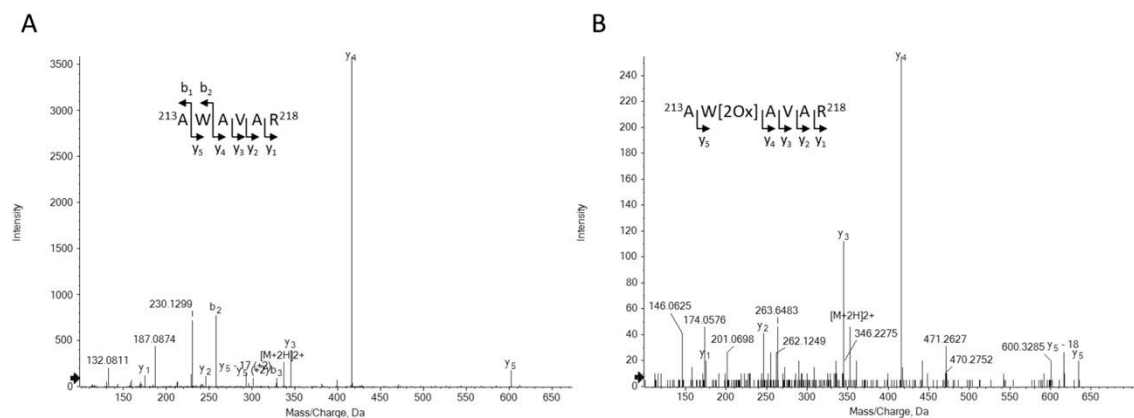


Figure S2: Representative MS/MS spectra of the $^{213}\text{AWAVAR}^{218}$ peptide: non-modified isoform (A) and isoform di-oxidized [2Ox] (B) on Trp214. The b/y fragments detected and annotated on each spectrum confirm the identified peptidic sequence. A minimum of 4 fragments among the most intense were used to create the SWATH library. When present, at least one fragment carrying the modification was added.

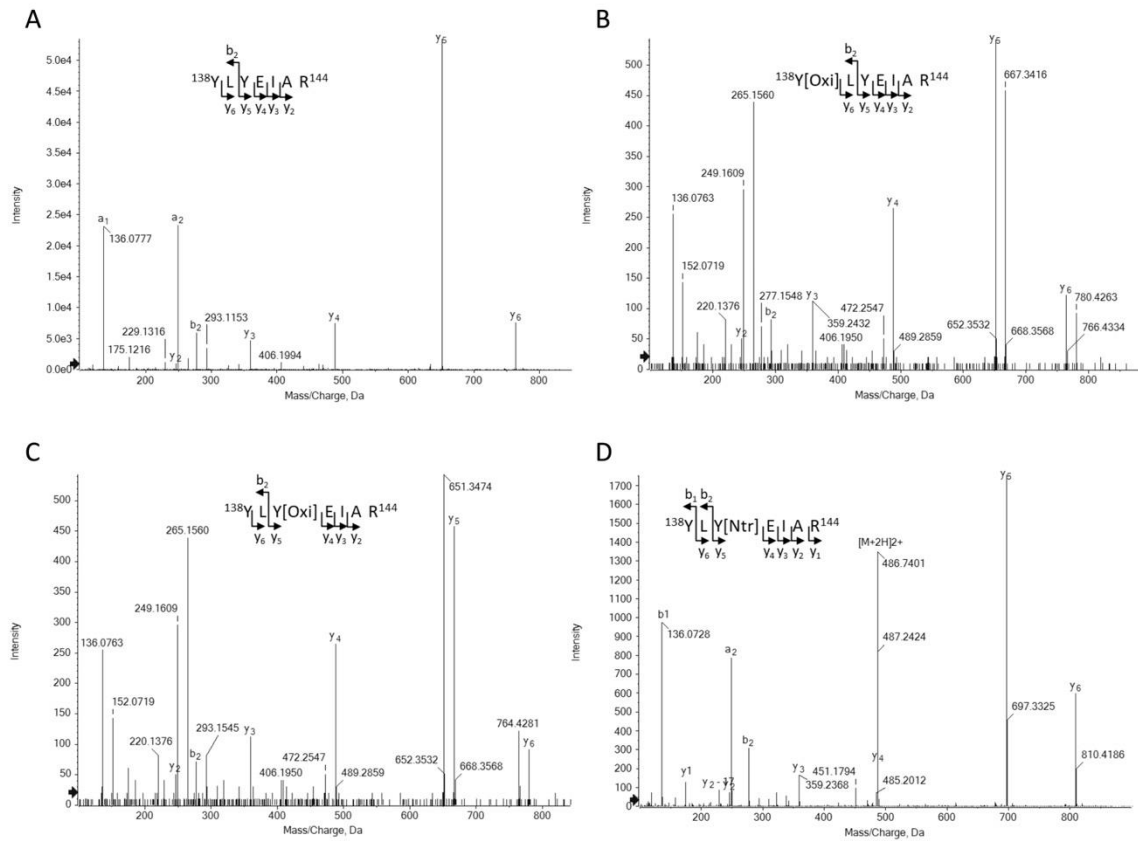


Figure S3: Representative MS/MS spectra of the $^{138}\text{YL YEIAR}^{144}$ peptide: non-modified isoform (A), isoforms oxidized [Oxi] on Tyr138 (B), oxidized (C) or nitrated [Ntr] (D) on Tyr140. MS/MS spectra for oxidation on Trp138 and Trp140 are superimposed due to coelution. The b/y fragments detected and annotated on each spectrum confirm the identified peptidic sequence. A minimum of 4 fragments among the most intense were used to create the SWATH library. When present, at least one fragment carrying the modification was added.

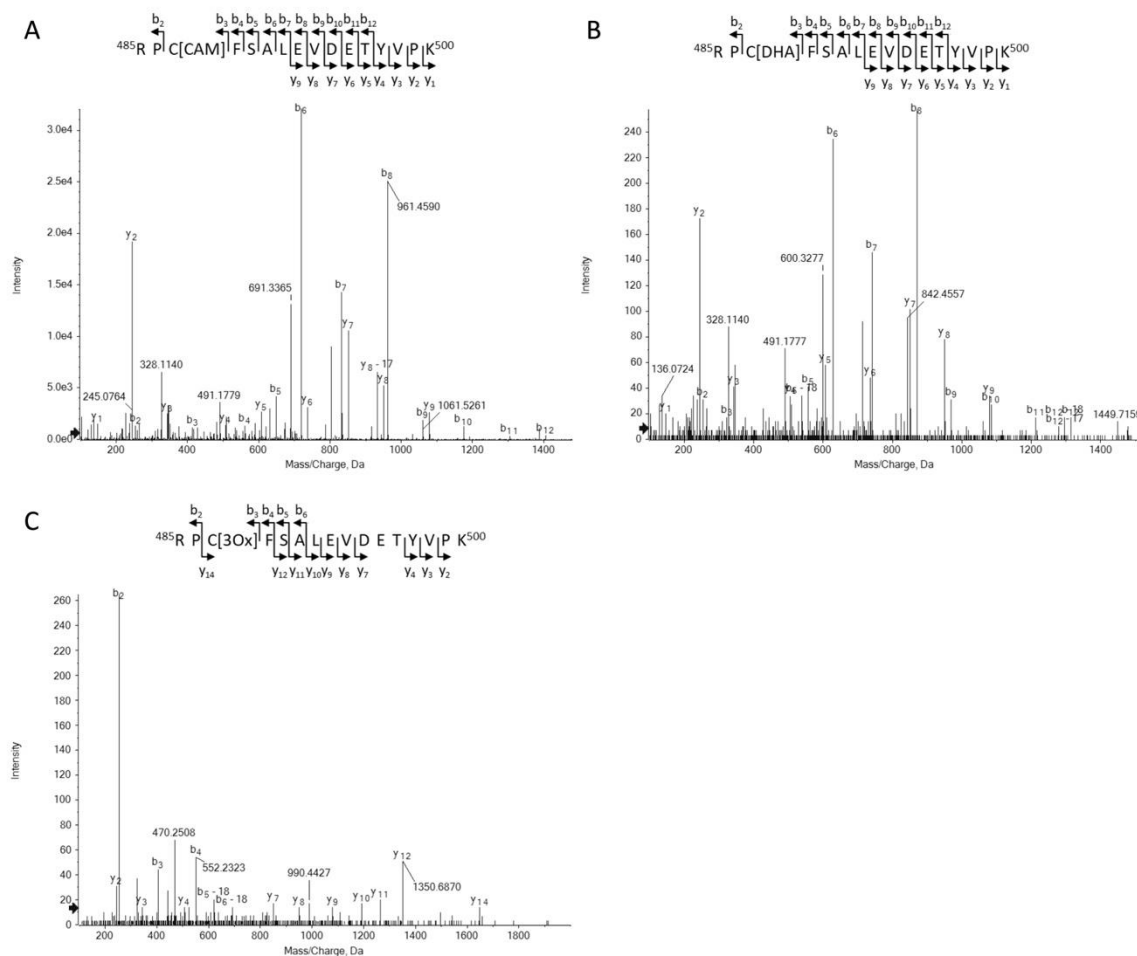


Figure S4: Representative MS/MS spectra of the ⁴⁸⁵RPCFSALEVDETYVPK⁵⁰⁰ peptide: carbamidomethylated [CAM] albumin corresponding to the non-modified isoform (A), isoforms carrying a dehydroalanine [DHA] (B) or a tri-oxidation [3Ox] (C) on Cys487. The b/y fragments detected and annotated on each spectrum confirm the identified peptidic sequence. A minimum of 4 fragments among the most intense were used to create the SWATH library. When present, at least one fragment carrying the modification was added.

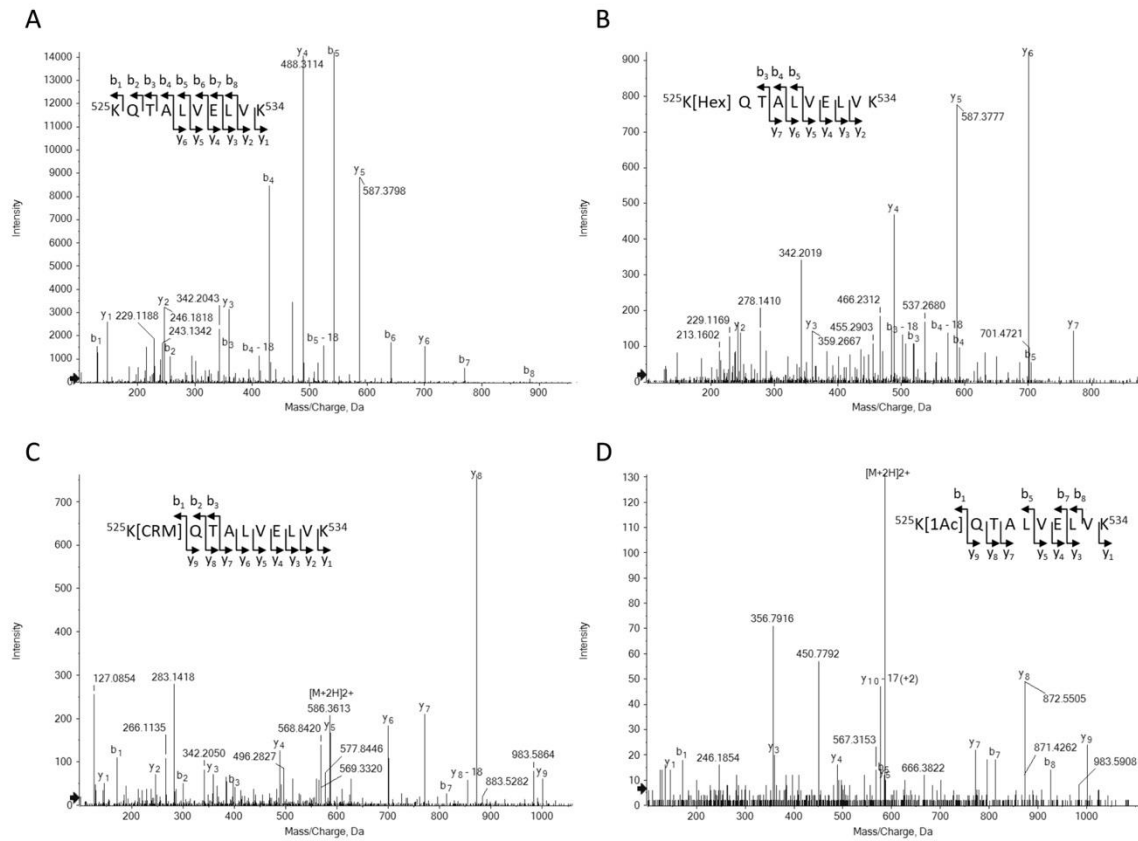


Figure S5: Representative MS/MS spectra of the ⁵²⁵KQTALVELVK⁵³⁴ peptide: non-modified isoform (A), isoforms glycated [HEX] (B), carbamylated [CRM] (C) or acetylated [1Ac] (D) on Lys525. The b/y fragments detected and annotated on each spectrum confirm the identified peptidic sequence. A minimum of 4 fragments among the most intense were used to create the SWATH library. When present, at least one fragment carrying the modification was added.

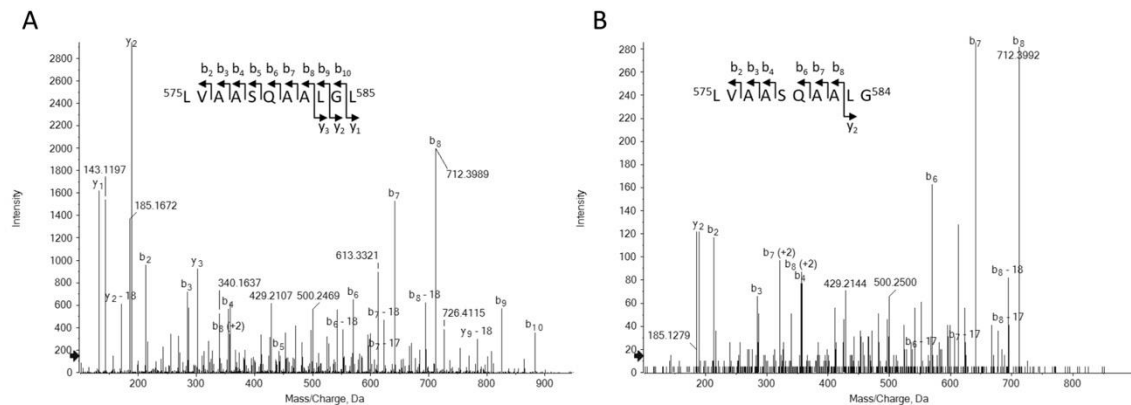


Figure S6: Representative MS/MS spectra of the native C-terminal peptide (A) or the truncated C-terminal peptide (B). The b/y fragments detected and annotated on each spectrum confirm the identified peptidic sequence. A minimum of 4 fragments among the most intense were used to create the SWATH library. When present, at least one fragment carrying the modification was added.

SUPPLEMENTARY DATA

Materials and Methods

Quantification of HSA isoforms

Supplementary Table:

Table S1: Identity, formula, molecular weight and theoretical mass of the different charge states of the isoforms of albumin considered for the quantification using the sum of extracted ion chromatograms (XIC)

	49+	50+	51+	52+	53+	Molecular weight (Da)	Formula	Identity
	1353.082 92	1326.041 41	1300.060 35	1275.078 56	1251.039 48	66251.70 61	$C_{2929}H_{4580}N_{784}O_{885}S_{41}$	HSA -DA
	1354.572 31	1327.501 01	1301.491 33	1276.482 02	1252.416 46	66324.68 61	$C_{2930}H_{4579}N_{785}O_{888}S_{41}$	HSA -L
	1355.511 57	1328.421 49	1302.393 76	1277.367 09	1253.284 83	66370.70 99	$C_{2932}H_{4585}N_{785}O_{887}S_{42}$	HSA + Cys-DA
	1356.880 15	1329.762 69	1303.708 67	1278.656 72	1254.550 12	66437.77 03	$C_{2936}H_{4590}N_{786}O_{889}S_{41}$	Native HSA
	1359.308 8	1332.142 77	1306.042 07	1280.945 25	1256.795 48	66556.77 04	$C_{2939}H_{4595}N_{787}O_{891}S_{42}$	HSA + Cys
	1360.187 35	1333.003 75	1306.886 17	1281.773 12	1257.607 72	66599.82 32	$C_{2942}H_{4600}N_{786}O_{894}S_{41}$	HSA + Glyc
	1362.616	1335.383 83	1309.219 58	1284.061 65	1259.853 08	66718.82 69	$C_{2945}H_{4605}N_{787}O_{896}S_{42}$	HSA + Cys + Glyc

41+	42+	43+	44+	45+	46+	47+	48+
1616.902 56	1578.428 86	1541.744 64	1506.727 88	1473.267 43	1441.261 77	1410.618 06	1381.251 17
1618.682 56	1580.166 48	1543.441 85	1508.386 52	1474.889 2	1442.848 29	1411.170 82	1382.771 58
1619.805 09	1581.262 29	1544.512 17	1509.432 51	1475.911 95	1443.848 81	1413.150 05	1383.730 41
1621.440 71	1582.858 96	1546.071 71	1510.956 61	1477.402 18	1445.306 64	1414.576 87	1385.127 5
1624.343 24	1585.692 39	1548.839 24	1513.661 24	1480.046 71	1447.893 68	1417.108 86	1387.606 75
1625.393 22	1586.717 37	1549.840 39	1514.639 63	1481.003 36	1448.829 53	1418.024 8	1388.503 6
1628.295 75	1589.550 79	1552.607 92	1517.344 27	1483.647 89	1451.416 57	1420.556 8	1390.982 85

SUPPLEMENTARY DATA

Materials and Methods

1. *In-Vitro* production of chemically induced HSA isoforms

1.1. Sample filtration and recovery step

To remove residues of chemicals used to induce specific isoforms, the solutions were filtered through Ultracel® 10K Amicon Centrifugal filters. After filtration, 2 washing cycles (0.5 mL of water (0.9% NaCl)) were done. Then, efficient recovery of retained albumin is achieved by reverse spin centrifugation at 4°C, 1000 rcf for 1 min after adding water (0.9% NaCl) to the filtrate. The volume of water added to recover the sample is similar to the volume of the solution before filtration.

2. Bottom-up high-resolution mass spectrometry analysis

2.1. Solid-Phase Extraction (SPE)

3 mL of a 0.5% formic acid solution was added to the digests. The mixture was then extracted on an Oasis® HLB 3cc cartridge, previously conditioned with 3 mL methanol and 3 mL of the 0.5% formic acid solution. Digests were added, cartridges were washed two times with 3 mL of 0.5% formic acid solution and then dried under nitrogen flow for 15 min. Elution was performed with 3 mL of a methanol solution. The extract was evaporated to dryness using a TurboVap® LV system (Biotage, Uppsala, Sweden) and reconstituted in 200 µL of a mixture of acetonitrile/water (2:98, by volume) with 0.05% trifluoroacetic. Extracts were kept at -20°C until analysis.

3. Isoforms-enriched solutions binding capacities:

The ligands were added to each isoforms-enriched solution and to HSAc to obtain theoretical HSA/ligand ratios (mol/mol) of 1/5 for Cu and Cd, 1/10 for L-T4, 1/50 for Au, 1/20 for DS. Ligand solutions were prepared following the information in Table S1.

Table S1: Preparation of initial ligand solutions

Ligand	Molar Concentration (mM)	Ratio HSA/Ligand	MW Ligands (g/mol)	Mass concentration (mg/mL) for 50 mL	Initial volume (µL) for 20 mL
Dansylsarcosine Piperidinium Salt	1.2	1/20	322.379	19.34	-
Gold (III) Chloride Trihydrate (900 g/L)	3	1/50	196.967	-	13.13 µL
Copper (II) Chloride	0.3	1/5	63.546	9.532	-
Cadmium Chloride	0.3	1/5	112.411	16.86	-
L-thyroxine Sodium Salt Pentahydrate	0.037	1/10	776.870	14.37	-

Supplementary Table:

Table S2: Determination of the abundance of HSA isoforms by calculating the percentage of surface under the mass spectrum in a top-down approach

Reduced albumin : HMA 1/10 (1)				
Peak	Experimental mass	Potential isoforms	Potential modifications	Surface percentage (%)
A	66255	HSA-DA	Truncation at N-terminal end	6.57
B	66324	HSA-L	Truncation at C-terminal end	1.51
C	66438.75	Native HSA	-	52.64
D	66463	HSA+SO ₂ H	Sulfinic acid	13.45
E	66483.25	HSA+SO ₃ H	Sulfonic acid	7.52
F	66602	HSA+Glyc	Glycation	5.4

Irreversibly oxidized albumin : HMA-HNA2 1/200 (4)				
Peak	Experimental mass	Potential isoforms	Potential modifications	Surface percentage (%)
A	66311.75	HSA-DA+Ox n	Truncation at N-terminal end	6.37
B	66334.75		Oxidation	1.13
C	66487.25	HSA+SO ₃ H	Sulfonic acid	27.67
D	66504.25	HSA+Ox n	Oxidation	54.88
E	66616.5	HSA+SO ₂ H+Glyc	Sulfinic/Sulfonic acid Glycation	1.78
F	66653.75	HSA+SO ₃ H+Glyc		2.35

Acetylated albumin : HSAc-acetyl 1/100 (2)				
Peak	Experimental mass	Potential isoforms	Potential modifications	Surface percentage (%)
A	66339.25	HSA-DA+Acetyl x2	Truncation at N-terminal end Acetylation	0.39
B	66377.5	HSA-DA+Cys	Truncation at N-terminal end Cysteinylation	0.61
C	66481.25	HSA+Acetyl x1	Acetylation	8.56
D	66521.75	HSA+Acetyl x2		15.55
E	66600.25	HSA+Cys+Acetyl x1	Cysteinylation Acetylation	17.11
F	66644	HSA+Cys+Acetyl x2		16.29
G	66683.25	HSA+Cys+Acetyl x3		10.17
H	66720.75	HSA+Cys+Acetyl x4		5.15
I	66765.5	HSA+Cys+Acetyl x5		3.04
J	66806.5	HSA+Cys+Acetyl x6		0.85
K	66822.25	HSA+Cys+Acetyl+ Ox1	Cysteinylation Acetylation Oxidation	0.36
L	66852.25	HSA+Cys+Acetyl x7	Cysteinylation Acetylation	0.30

Nitrated/Nitrosylated albumin : HMA-nitro 1/100 (5)				
Peak	Experimental mass	Potential isoforms	Potential modifications	Surface percentage (%)
A	66469.75	HSA+SNO	Nitrosylation	43.56
B	66514	HSA+SNO+NO ₂	Nitrosylation Nitration	5.97
C	66528.25	HSA+SNO+NO ₃		3.38
D	66632.75	HSA+Glyc+SNO	Glycation Nitrosylation	2.52

Glycated albumin : HMA-glyc 1:200 (6)				
Peak	Experimental mass	Potential isoforms	Potential modifications	Surface percentage (%)
A	66601.75	HSA+Glyc	Glycation	39.64
B	66763.75	HSA+2Glyc		33.09
C	66798.25	HSA+2Glyc+SO ₂ H	Glycation Sulfinic/Sulfonic acid	5.72
D	66814	HSA+2Glyc+SO ₃ H		4.16
E	66926.25	HSA+3Glyc	Glycation	11.69
F	66955.5	HSA+3Glyc+SO ₂ H	Glycation Sulfinic acid	1.8

Cysteinylation albumin : HNA1 1/2 (3)				
Peak	Experimental mass	Potential isoforms	Potential modifications	Surface percentage (%)
A	66371.25	HSA-DA+Cys	Truncation at N-terminal end Cysteinylation	7.32
B	66535.5	HSA-DHA+Cys	Dehydroalanine Cysteinylation	2.15
C	66557.25	HSA+Cys	Cysteinylation	50.57
D	66579.25	HSA+Cys Ox1	Cysteinylation Oxidation	7.99
E	66718	HSA+Cys+Glyc	Cysteinylation Glycation	2.86

Supplementary Figures:

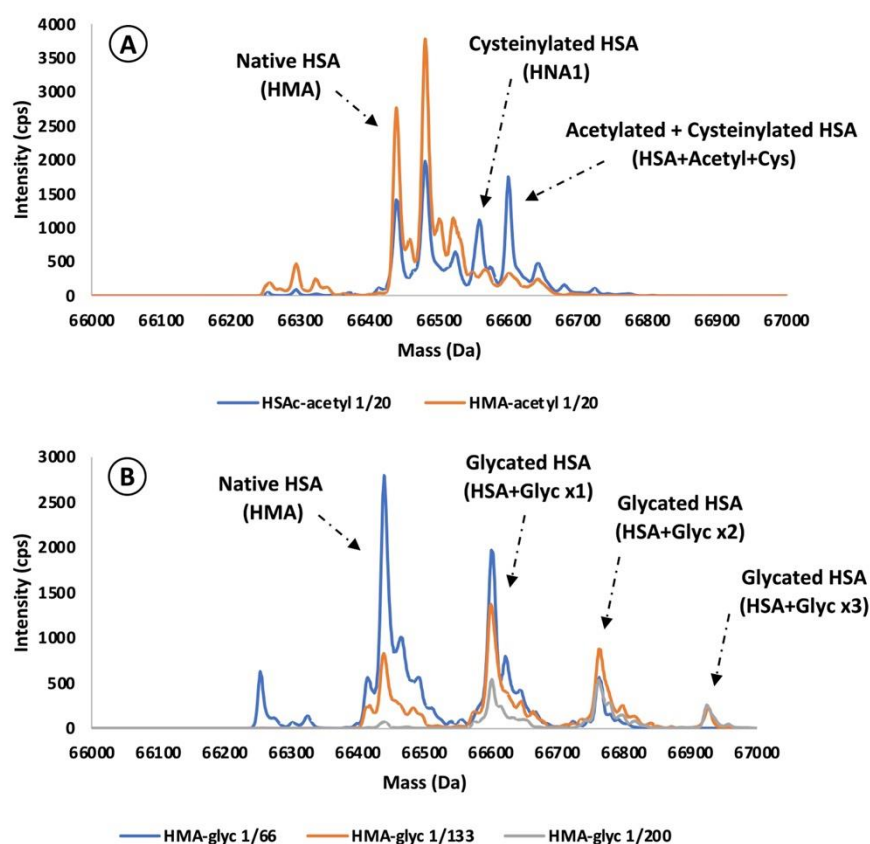


Fig. S1: Acetylated and glycosylated enriched-isoform-solution. (A) A comparison between acetylated albumin (HSAc-acetyl 1:20) and reduced acetylated albumin (HMA-acetyl 1:20) revealed the contribution of Cys-34 on albumin isoforms. (B) The formation of advanced glycosylated isoforms when incubated with glucose in a concentration dependent manner.

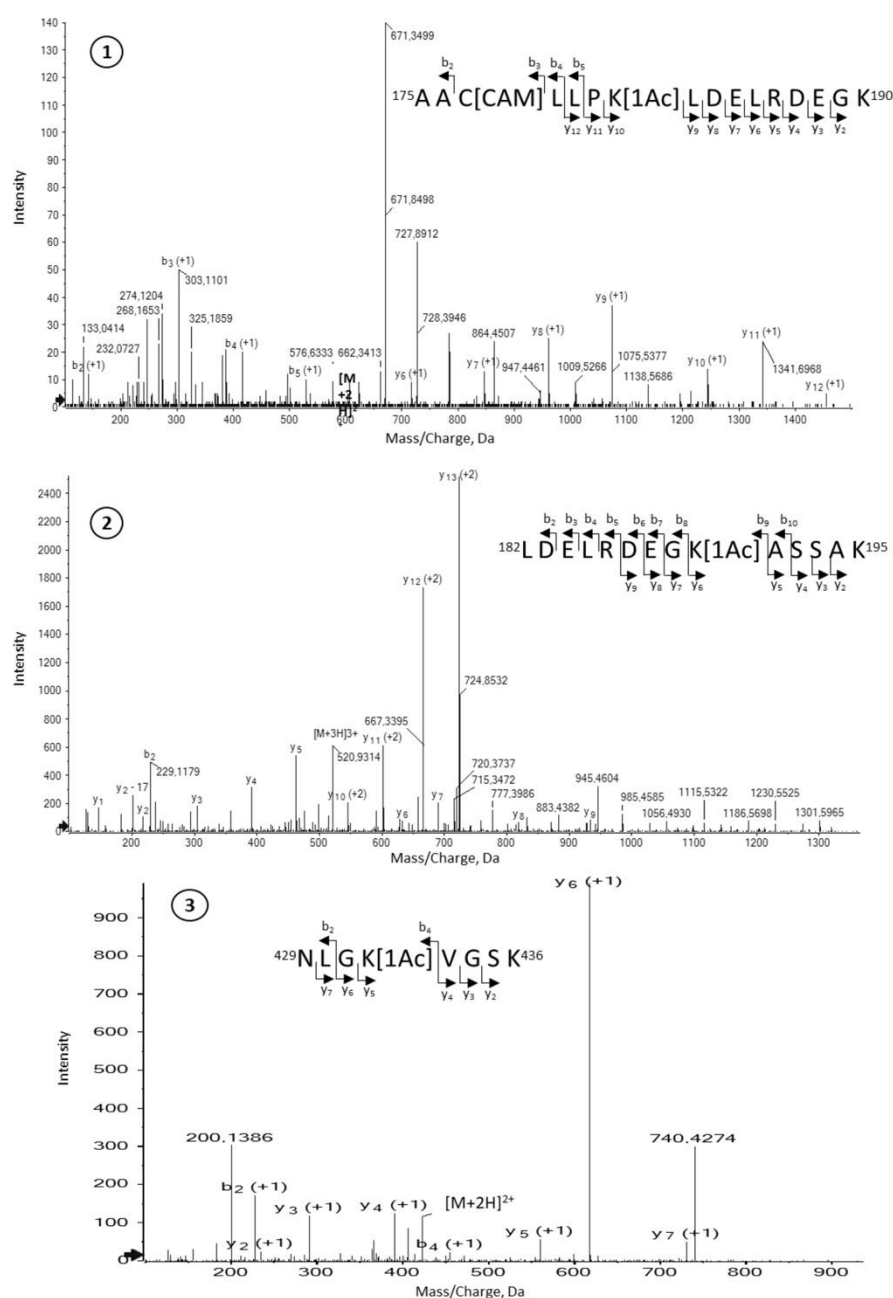


Fig. S2: Representative MS/MS spectra of the newly discovered acetylated [Ac1] peptides: (1) 175AAC[CAM]LLPK[1Ac]LDELRLDEGK¹⁹⁰, (2) 182LDELRLDEGK[1Ac]ASSAK¹⁹⁵ and (3) 429NLGK[1Ac]VGSK⁴³⁶. The b/y fragments detected and annotated on each spectrum confirm the identified peptide sequence.

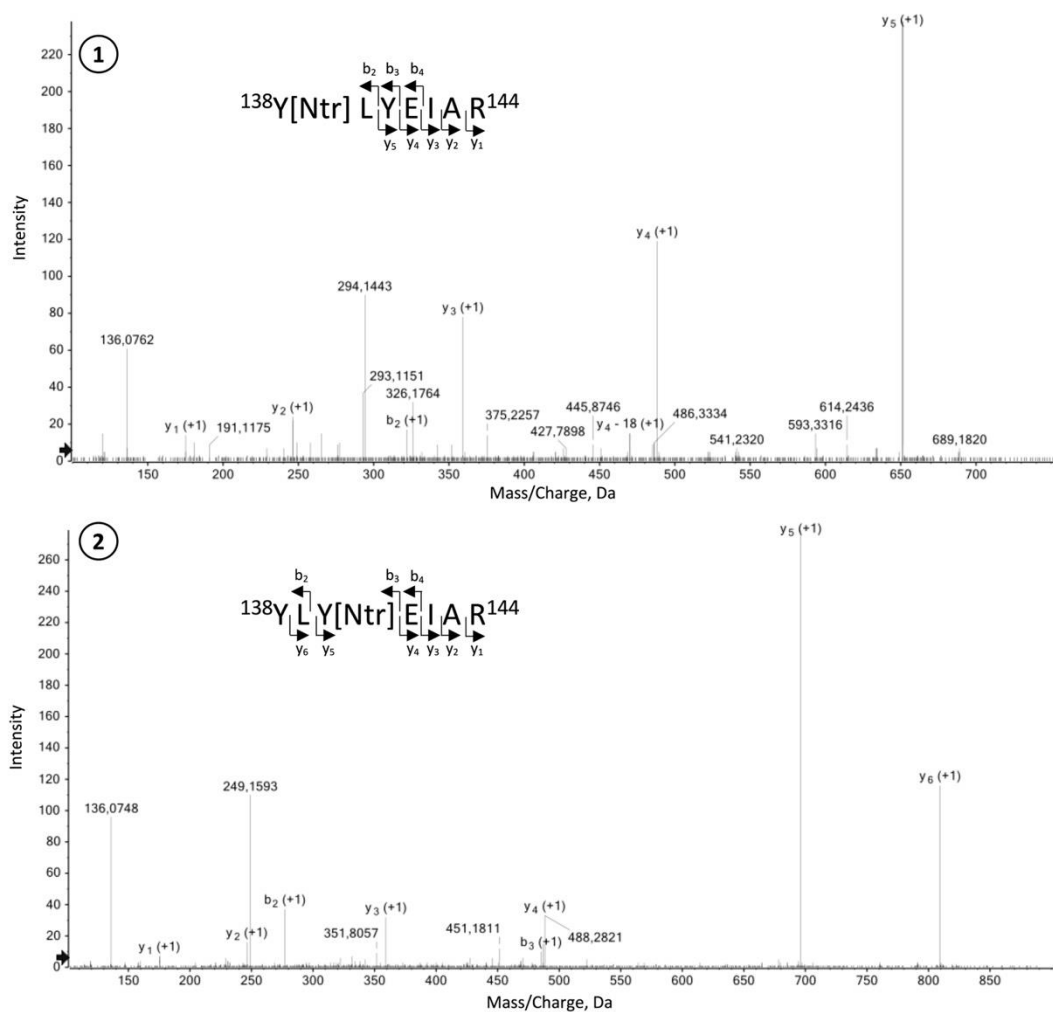


Fig. S3: Representative MS/MS spectra of the newly discovered nitrated [Ntr] peptides: (1) $^{138}\text{Y}[\text{Ntr}]\text{LYEIAR}^{144}$ and (2) $^{138}\text{YLY}[\text{Ntr}]\text{EIAR}^{144}$. The b/y fragments detected and annotated on each spectrum confirm the identified peptide sequence.

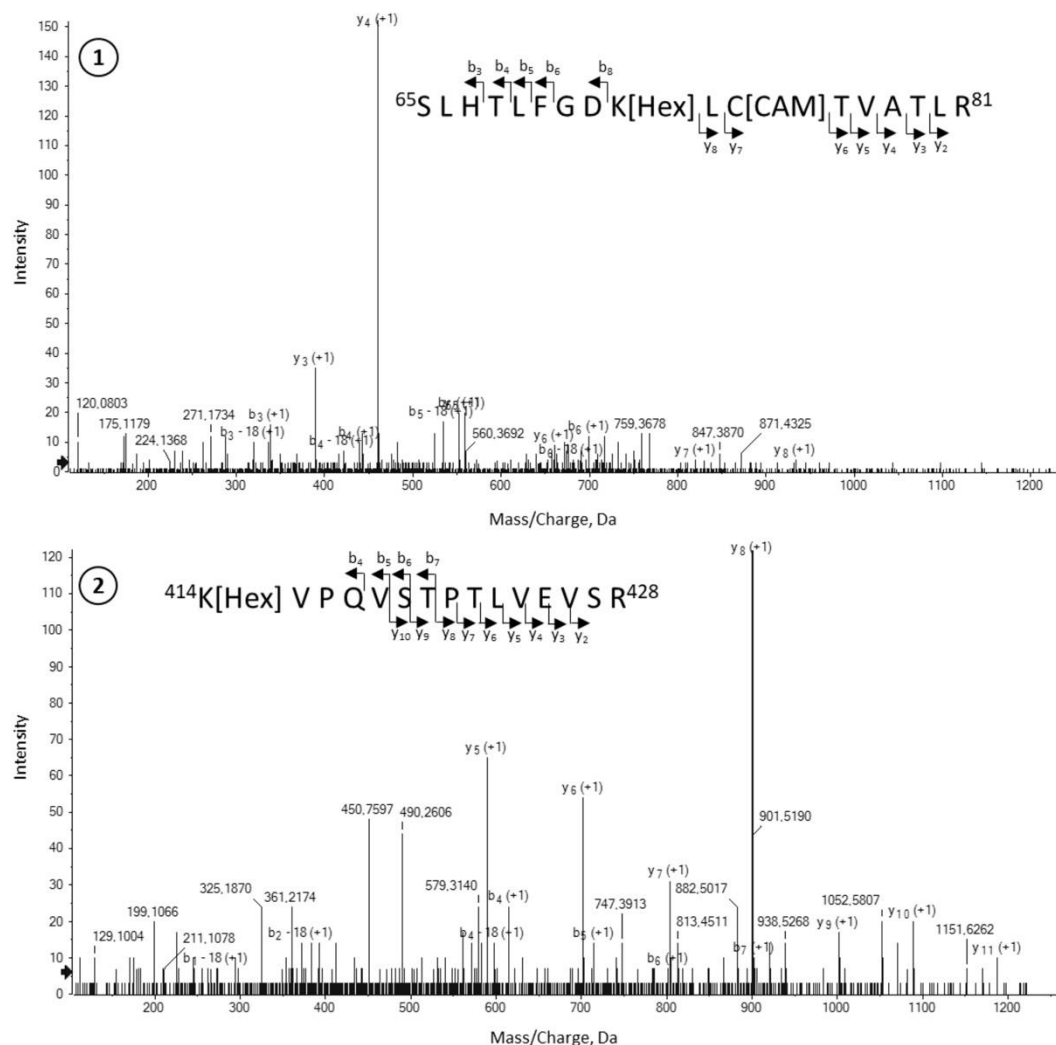


Fig. S4: Representative MS/MS spectra of the newly discovered glycosylated [Hex] peptides: (1) $^{65}\text{SLHTLFGDK}[\text{Hex}]\text{LC}[\text{CAM}]\text{TVATLR}^{81}$ and (2) $^{414}\text{K}[\text{Hex}]\text{VPQVSTPTLVEVSR}^{428}$. The b/y fragments detected and annotated on each spectrum confirm the identified peptide sequence.

Annexe 4. Contenu supplémentaire de l'article expérimentale 4

Electronic Supplementary Information

Early detection of liver injuries by the Serum enhanced binding test sensitive to albumin post-transcriptional modifications

Souleiman El Balkhi^{1,2}, Mohamad Ali Rahali^{1,2}, Roy Lakis¹, François Ludovic Sauvage¹, Marving Martin¹, Angelika Janaszekiewicz¹, Roland Lawson¹, Ruben Goncalves¹, Paul Carrier^{1,3}, Veronique Loustaud-Ratti^{1,3}, Anne Guyot⁴, Pierre Marquet^{1,2}, Florent Di Meo¹, Franck Saint-Marcoux^{1,2}

Author's institutional affiliations:

¹ P&T, UMR1248, Inserm, Univ. Limoges, France.

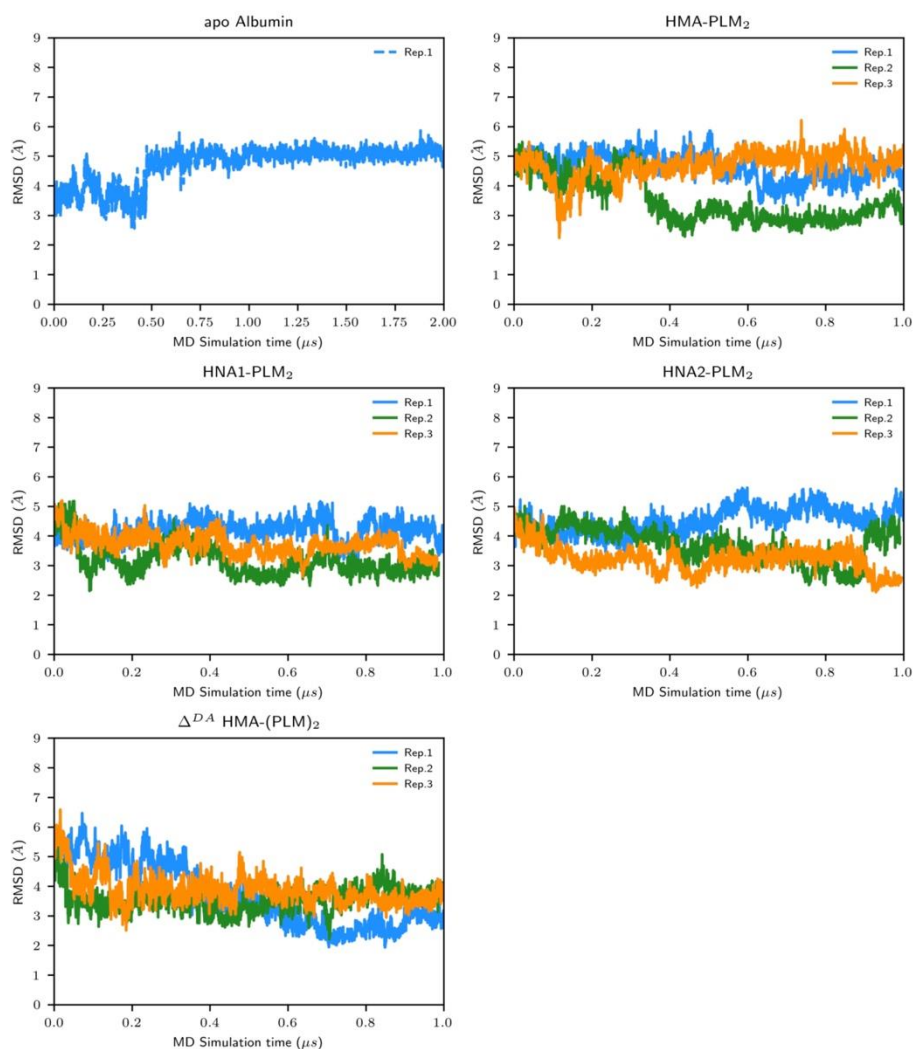
² Department of pharmacology, toxicology and pharmacovigilance, CHU Limoges, France.

³ Department of Liver Disease, CHU Limoges, Limoges, France

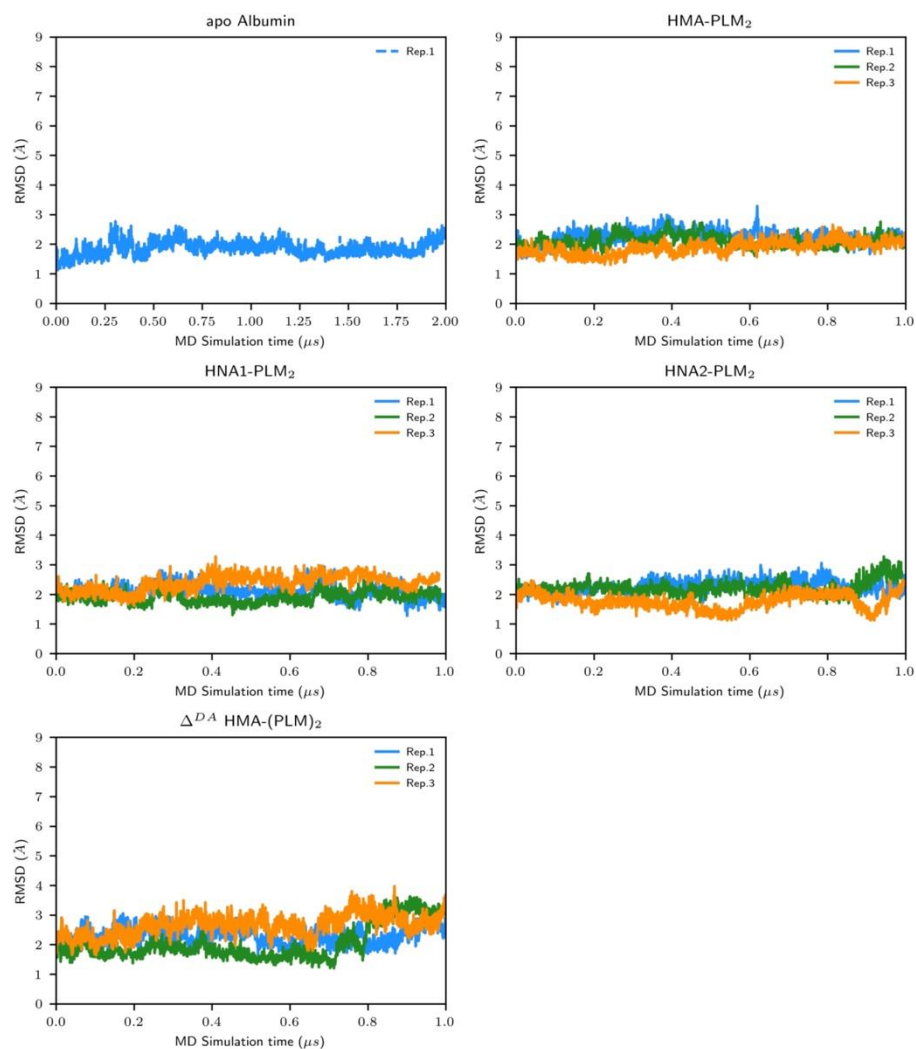
⁴ Department of Pathology, CHU Limoges, Limoges, France.

Declarations of interest: none

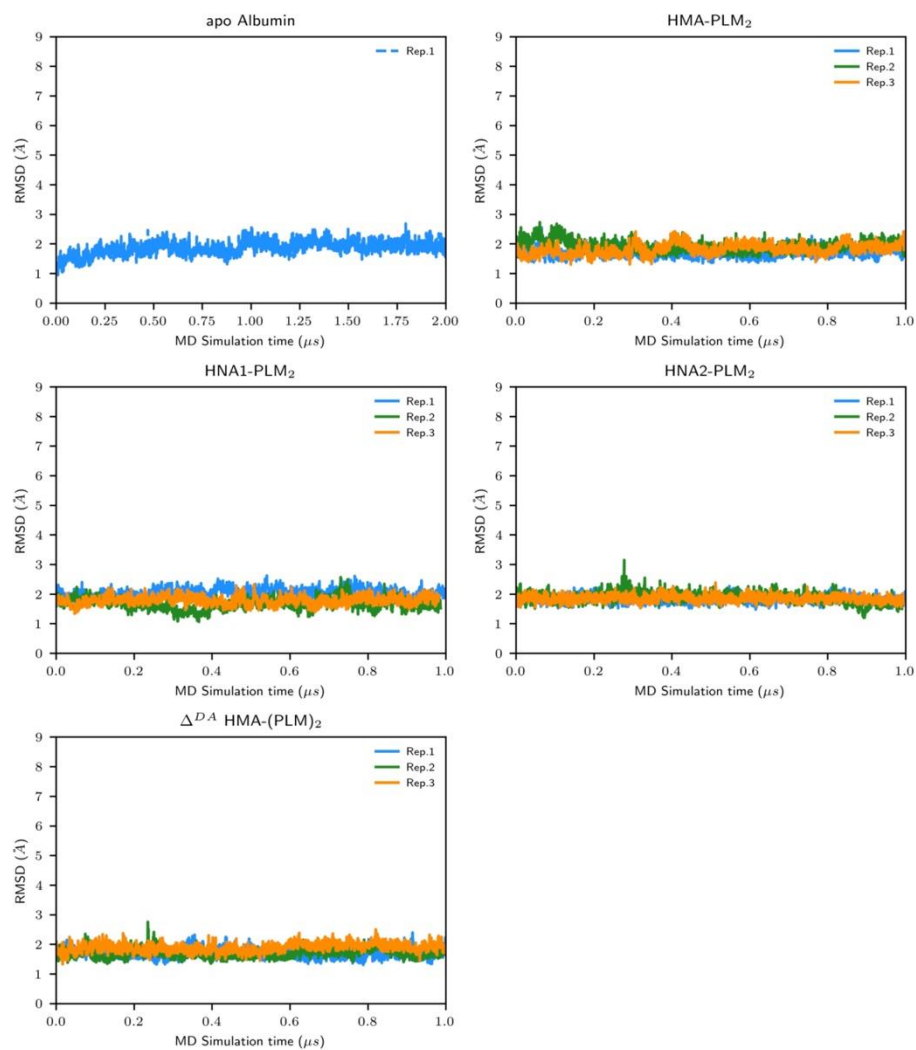
Address for correspondence: Souleiman El Balkhi, email: souleiman.elbalkhi@chu-limoges.fr



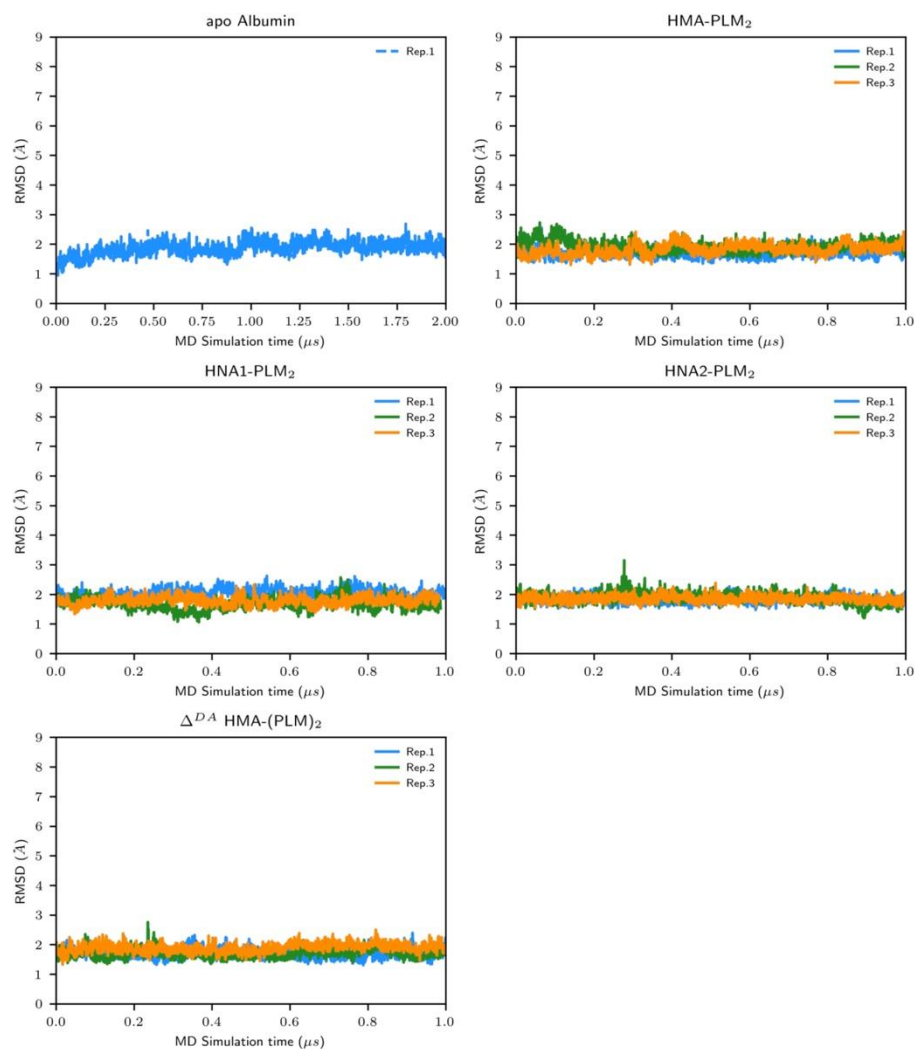
Supplementary Figure S1. Per-replica time-dependent root-mean squared deviations of overall backbone HSA isoform structures along MD simulations. The three different replicas are depicted in blue, green and orange, respectively.



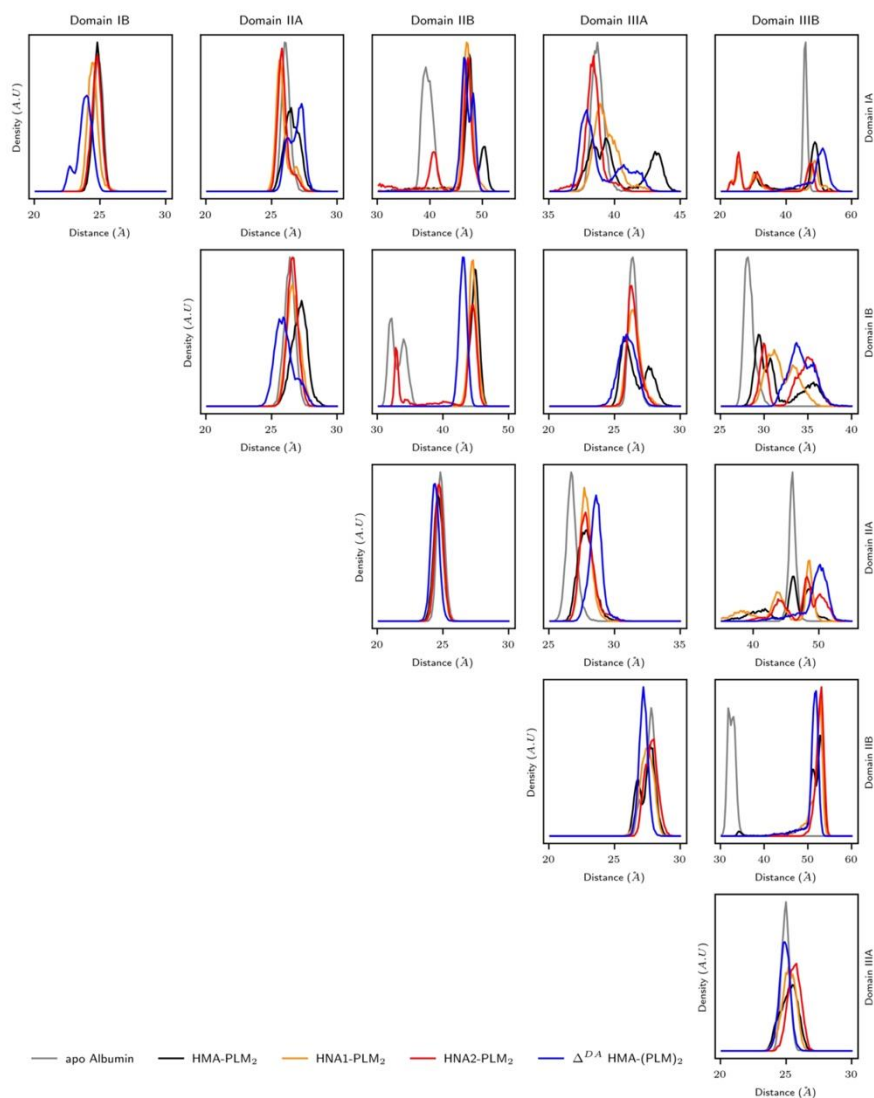
Supplementary Figure S2. Per-replica time-dependent root-mean squared deviations of backbone HSA isoform structures for domain I along MD simulations. The three different replicas are depicted in blue, green and orange, respectively.



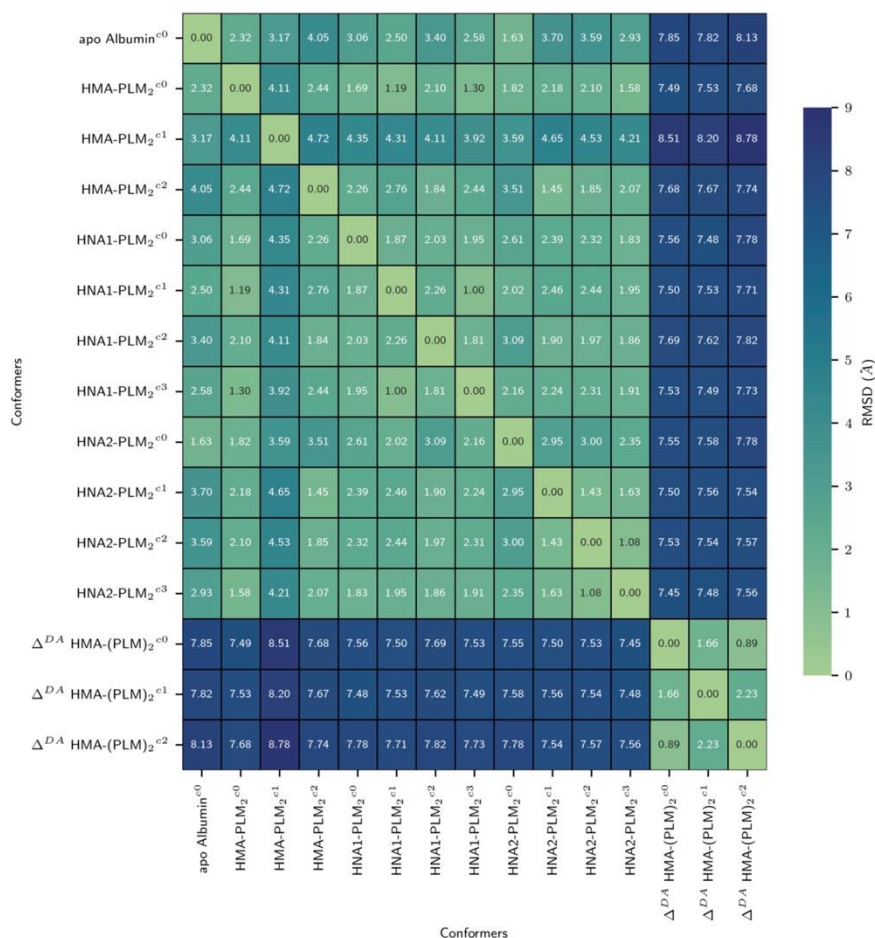
Supplementary Figure S3. Per-replica time-dependent root-mean squared deviations of backbone HSA isoform structures for domain II along MD simulations. The three different replicas are depicted in blue, green and orange, respectively.



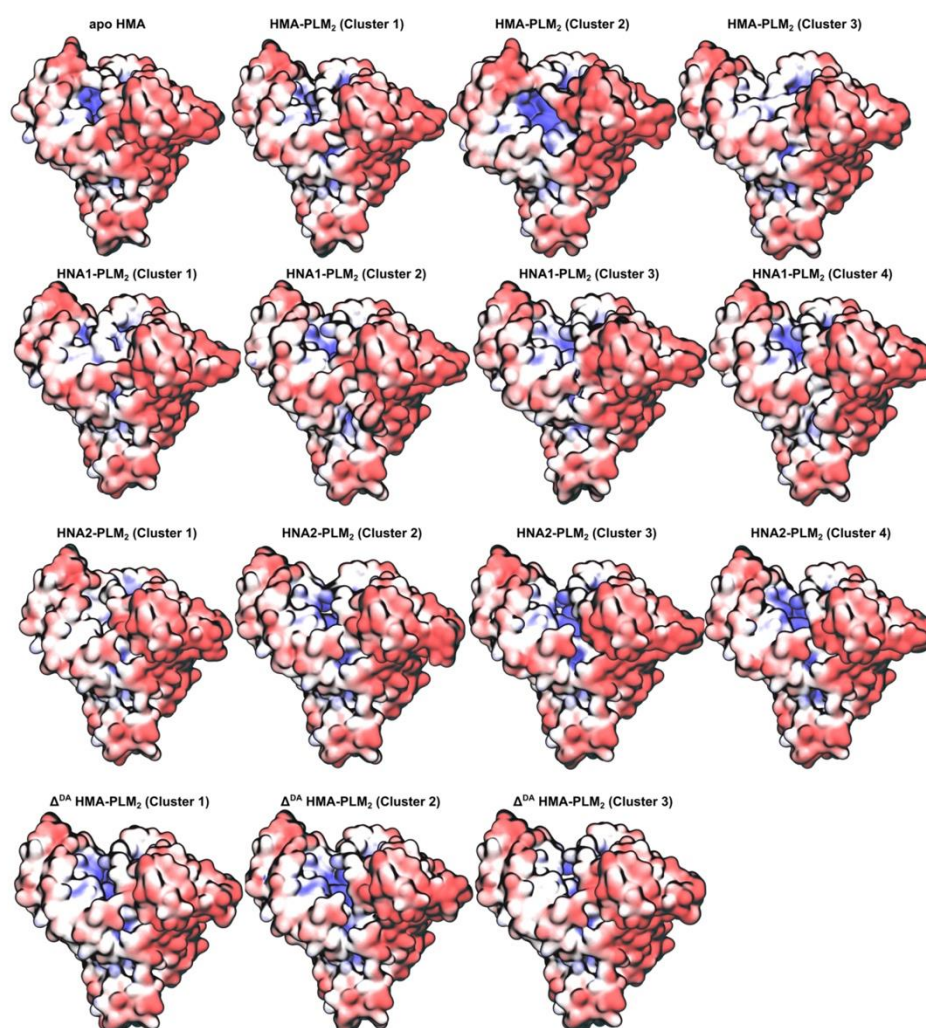
Supplementary Figure S4. Per-replica time-dependent root-mean squared deviations of backbone HSA isoform structures for domain III along MD simulations. The three different replicas are depicted in blue, green and orange, respectively.



Supplementary Figure S5. Distributions of inter-subdomain distances (Å) for the different HSA isoform structures for which replicas were aggregated. For sake of comparison, distributions from MD simulation performed with apo HMA albumin were also plotted.



Supplementary Figure S6. Calculated backbone RMSD (Å) between all representative cluster snapshots identified from density peak clustering.



Supplementary Figure S7. Calculated electrostatic potentials for each cluster representative snapshots obtained during MD simulations.

Modifications de l'albumine comme biomarqueurs précoces des hépatopathies chroniques

Face à l'augmentation inquiétante de la mortalité associée aux maladies chroniques du foie, des progrès significatifs ont été réalisés dans le domaine des approches non invasives pour améliorer notre capacité à évaluer l'apparition des complications, qui marquent un tournant décisif dans l'évolution de la maladie. Cependant, les outils non invasifs actuels d'évaluation de la fibrose hépatique présentent des limites dans l'interprétation des résultats et la précision du diagnostic. Cette thèse se concentre sur les modifications post-traductionnelles (PTM) de l'albumine en tant que biomarqueurs précoces des maladies chroniques du foie. L'albumine sérique humaine (HSA) est une macromolécule monomérique à domaines multiples qui possède d'importantes activités oncotiques et non oncotiques, telles que l'activité antioxydante et la liaison de molécules endogènes et exogènes. La HSA est sujette à de nombreuses modifications structurales et chimiques, conduisant à des isoformes, dont celles basées sur l'état d'oxydoréduction de la Cys-34 sont les plus étudiées. Nous avons réalisé une étude translationnelle impliquant différents axes de recherche analytique, in vivo, in vitro, in silico, et études cliniques. Ces travaux suggèrent le grand potentiel des isoformes d'albumine en tant que biomarqueurs précoces des lésions hépatiques. En effet, le comportement discriminant de l'albumine dans la liaison de certains ligands en présence de PTM spécifiques, ainsi que les profils isoformes caractéristiques présents à différents stades de la fibrose, nous ont permis de développer des outils informatifs, puissants et suffisamment polyvalents qui nous permettront prochainement de prédire l'évolution des lésions hépatiques et de stratifier avec précision les risques et les causes des lésions hépatiques chez les patients. Nos outils auront le potentiel d'offrir un diagnostic précoce des lésions hépatiques tout en permettant un pronostic à court et moyen terme, comblant ainsi les lacunes dans la recherche de biomarqueurs précoces pour un diagnostic et un suivi non invasif, qui est actuellement insuffisamment satisfaits.

Mots-clés : Sérum albumine humaine, Modifications post-traductionnelles, Isoforme, Biomarqueurs, Maladies hépatiques

Albumin modifications as early biomarkers of chronic liver diseases

Faced with the alarming rise in mortality associated with chronic liver disease, research into non-invasive methods has developed considerably to improve our ability to assess the onset of complications, which mark a decisive turning point in the course of the disease. However, current non-invasive tools for assessing liver fibrosis present limitations in the interpretation of results and diagnostic accuracy. This thesis focuses on albumin post-translational modifications (PTMs) as early biomarkers of chronic liver disease. Human serum albumin (HSA) is a monomeric, multi-domain macromolecule that possesses important oncotic and non-oncotic activities, such as antioxidant activity and binding of endogenous and exogenous molecules. HSA is subject to numerous structural and chemical modifications, leading to isoforms, of which those based on the redox state of Cys-34 are the most extensively studied. We have carried out a translational study involving different axes of analytical research, in vivo, in vitro, in silico, machine learning and clinical studies. This work suggests the great potential of albumin isoforms as early biomarkers of liver damage. Indeed, albumin's discriminatory behavior in binding certain ligands in the presence of specific PTMs, as well as the characteristic isoform profiles present at different stages of fibrosis, have enabled us to develop informative, powerful and sufficiently versatile tools that will soon enable us to predict the evolution of liver damage and accurately stratify the risks and causes of liver damage in patients. Our tools will have the potential to offer early diagnosis of liver lesions while enabling short- and medium-term prognosis, thus filling the gap in the search for early biomarkers for non-invasive diagnosis and follow-up, which is currently insufficiently satisfied.

Keywords: Human serum albumin, Post-translational modifications, Isoform, Biomarkers, Liver diseases

