

UNIVERSITÉ STRASBOURG I – LOUIS PASTEUR

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Doctorat

Sciences Médicales

Spécialité : Biologie Médicale

Arnaud AGIN

**DOSAGE DES ANALOGUES DE L'INSULINE
À L'AIDE DE DEUX IMMUNODOSAGES DE L'INSULINE HUMAINE :**
Évaluation analytique et application à l'étude de la biotransformation de la glargine

Thèse dirigée par Rémy Sapin

Soutenue le 14 décembre 2006

Jury :

Rapporteur interne : **Pr Laurence KESSLER**, PU-PH, Strasbourg

Rapporteur externe : **Pr Marc KLEIN**, PU-PH, Nancy

Rapporteur externe : **Dr François ROUX**, MCU-PH, Marseille

Examineur : **Pr Nathalie JEANDIDIER**, PU-PH, Strasbourg

Examineur : **Dr Didier CHEVENNE**, Attaché des Hôpitaux, Paris

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Rémy Sapin pour avoir accepté d'encadrer ma thèse, m'avoir guidé dans la découverte de l'immunoanalyse et m'avoir transmis une partie de ses compétences.

Un grand **MERCI** pour sa disponibilité, ses nombreux conseils et la liberté qu'il m'a laissé pour réaliser ce travail.

Merci à Mme Nathalie Jeandidier pour sa disponibilité, ses conseils, pour avoir facilité mon travail et pour avoir engagé une discussion avec les laboratoires qui commercialisent les analogues.

Merci aux biologistes du laboratoire, Mme Christine Demangeat et Françoise Gasser, pour leur soutien et leurs conseils.

Merci à M. Daniel Grucker pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour m'avoir donné l'opportunité de poursuivre ma carrière dans son laboratoire.

Merci aux membres du jury, Mme Laurence Kessler, M. Marc Klein, M. François Roux, Mme Nathalie Jeandidier et M. Didier Chevenne, pour avoir lu attentivement le manuscrit et y avoir apporté des corrections.

Merci à l'ensemble du personnel du laboratoire d'Explorations Fonctionnelles par les Isotopes des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, en particulier **merci** aux techniciennes et aux secrétaires pour leur accueil et leur aide. D'une façon plus générale, **merci** à l'ensemble des enseignants, des chercheurs et du personnel de l'Institut de Physique Biologique.

Merci à Françoise Gasser, à Christine Demangeat, à Margot Sapin et à Béatrice Heurtault pour leur relecture et leurs corrections.

Enfin, je me réjouis d'avoir la chance de continuer mon travail au sein de cette même équipe.

Une pensée pour toute ma famille.

LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION.....	8
PREMIERE PARTIE ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	9
CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR L'INSULINE	10
1. <i>Historique</i>	10
2. <i>Structure</i>	13
3. <i>Pancréas</i>	15
4. <i>Biosynthèse</i>	16
4.1. Synthèse de l'insuline dans la cellule β	16
4.2. Enzymes participant à la synthèse de l'insuline.....	19
5. <i>Sécrétion</i>	21
6. <i>Clairance et dégradation</i>	24
7. <i>Le récepteur de l'insuline</i>	27
8. <i>Effets biologiques et physiologiques</i>	29
CHAPITRE 2 : INSULINOTHERAPIE	31
1. <i>Place de l'insuline dans le traitement du diabète</i>	31
1.1. Généralités sur le diabète.....	31
1.2. Place de l'insuline dans le traitement du diabète de type 1.....	33
1.3. Place de l'insuline dans le traitement du diabète de type 2.....	35
2. <i>Voies d'administration de l'insuline</i>	37
2.1. Sous-cutanée.....	37
2.2. Intra-péritonéale	41
2.3. Pulmonaire.....	42
2.4. Orale.....	43
CHAPITRE 3 : ANALOGUES DE L'INSULINE	45
1. <i>Introduction : limites de l'insuline humaine recombinante</i>	45
2. <i>Relations structure-activité</i>	50
2.1. Interaction de l'insuline avec son récepteur.....	50
2.2. Interaction de l'insuline avec le récepteur à l'IGF-1	53
2.3. Modifications de l'insuline affectant sa stabilité	53
2.4. Modifications de l'insuline affectant la formation de dimères et hexamères.....	54
3. <i>Les principaux analogues</i>	56
3.1. Asp(B10).....	56
3.2. Lispro	57
3.3. Asparte	61
3.4. Glulisine	62
3.5. NovoSol Basal.....	63
3.6. Glargine.....	64
3.7. Détémir.....	68
3.8. « Nouveaux » analogues.....	72
CHAPITRE 4 : DOSAGE DE L'INSULINE ET DE SES ANALOGUES.....	73
1. <i>Milieu biologique</i>	73
2. <i>Méthodes chromatographiques</i>	73
3. <i>Immunodosages</i>	76
3.1. Insuline.....	76
3.2. Analogues.....	80
DEUXIEME PARTIE ETUDE EXPERIMENTALE.....	82
CHAPITRE 1 : MATERIELS	83
1. <i>Insulines</i>	83
1.1. Spécialités pharmaceutiques.....	83
1.2. Métabolites de l'insuline glargine.....	84
2. <i>Milieus de dilution des insulines</i>	85
2.1. Tampon.....	85
2.2. Diluant universel Elecsys	85
2.3. Pools de sérums	85
2.4. Sérums et plasmas	86
3. <i>Trousses de dosage, calibrants et contrôles</i>	87
4. <i>Carboxypeptidase B</i>	87

5. Inhibiteurs enzymatiques et cations.....	88
5.1. Inhibiteurs enzymatiques.....	88
5.2. Cations.....	90
6. Statistiques.....	90
CHAPITRE 2 : METHODES.....	91
1. Dosages.....	91
1.1. Immunodosages de l'insuline.....	91
1.2. Anti-insulin RIA.....	95
2. Evaluation analytique des immunodosages d'insuline.....	97
2.1. Comparaison de Bi-insulin IRMA et Insuline Elecsys.....	97
2.2. Choix d'un diluant.....	97
2.3. Réactivité croisée des analogues.....	98
2.4. Effet de l'hémolyse sur les analogues.....	98
2.5. Interférence des anticorps anti-insuline.....	99
3. Etude de la biotransformation de la glargine in vitro.....	100
3.1. Réactivité croisée des métabolites.....	100
3.2. Biotransformation in vitro.....	100
CHAPITRE 3 : RESULTATS.....	102
1. Evaluation analytique des immunodosages d'insuline.....	102
1.1. Comparaison de Bi-insulin IRMA et Insuline Elecsys.....	102
1.2. Choix d'un diluant.....	103
1.3. Réactivité croisée des analogues.....	109
1.4. Effet de l'hémolyse sur l'insuline humaine et les analogues.....	115
1.5. Interférence des anticorps anti-insuline.....	116
2. Etude de la biotransformation de la glargine in vitro.....	120
2.1. Réactivité croisée des métabolites.....	120
2.2. Biotransformation in vitro.....	122
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	130
1. Evaluation analytique des immunodosages d'insuline.....	130
1.1. Comparaison Bi-insulin IRMA et Insuline Elecsys.....	130
1.2. Choix d'un diluant.....	130
1.3. Réactivité croisée des analogues.....	131
1.4. Effet de l'hémolyse sur les analogues.....	132
1.5. Interférence des anticorps anti-insuline.....	133
2. Etude de la biotransformation de la glargine in vitro.....	135
CONCLUSION.....	139
BIBLIOGRAPHIE.....	142

LISTE DES ABREVIATIONS

BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CPB	Carboxypeptidase B
CPH	Carboxypeptidase H
CPN	Carboxypeptidase N
CPU	Carboxypeptidase U
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
GLUT-2	Transporteur membranaire du glucose de type 2
GLUT-4	Transporteur membranaire du glucose de type 4
HbA_{1C}	Hémoglobine A _{1C}
IDE	<i>Insulin degrading enzyme</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IRMA	<i>Immuno-radiometric assay</i>
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
NPH	<i>Neutral protamine Hagedorn</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS-BSA	<i>Phosphate buffered saline – Bovine serum albumin</i>
PC2	<i>Proprotein Convertase 2</i>
PC3	<i>Proprotein Convertase 3</i>
PEG	Polyéthylène glycol
RI	Récepteur de l'insuline
RIA	<i>Radio-immunoassay</i>
TAFI	<i>Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor</i>
TAFIa	<i>Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor activé</i>
TRIS	tris-hydroxyméthylaminométhane, 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>

INTRODUCTION

La quantification de l'insuline sérique dans les études de pharmacocinétique et en biochimie clinique courante est habituellement effectuée par immunodosage [1-3]. Des immunodosages spécifiques des analogues rapides ont été développés pour les études pharmacocinétiques [4, 5], mais ne sont pas commercialisés à l'exception de celui de la lispro. Les immunodosages « non spécifiques » de l'insuline humaine (non spécifiques pour les analogues mais spécifiques vis-à-vis de la proinsuline) sont couramment utilisés dans les études cliniques impliquant des analogues [6, 7], conduisant à un résultat appelé « insuline immunoréactive ». Les réactivités croisées de l'insuline et de ses analogues sont généralement déterminées en milieu tampon, mais les limites et les pièges de telles méthodes sont rarement évalués [8-10]. Les réactivités croisées des analogues ont été établies en milieu BSA (*Bovine serum albumin*) avec une sélection d'immunodosages de l'insuline humaine commercialisés et automatisés ; aucune de ces méthodes ne montre une réactivité croisée proche de 100% pour l'ensemble des analogues testés (lispro, asparte et glargine) [11, 12].

Nous avons sélectionné deux immunodosages pour leur différence de spécificité d'anticorps. Dans le but de pouvoir proposer une méthode simple de dosage de l'insuline et des analogues utilisable en pratique clinique courante, nous avons étudié dans la première partie de ce travail le comportement de ces deux immunodosages vis-à-vis des analogues de l'insuline en milieu tampon et en milieu sérique (spécificité) et leur sensibilité aux interférences.

Dans la seconde partie de ce travail, le profil de spécificité particulier du dosage Insuline Elecsys a été mis à profit pour l'étude de la biotransformation *in vitro* de l'insuline glargine. L'intérêt de l'étude de cette biotransformation est certain. En effet, en clinique cet analogue lent présente une variabilité d'action inter-individuelle relativement importante et l'implication du métabolisme de cette molécule dans cette variabilité est possible.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Généralités sur l'insuline

1. Historique

Paul Langerhans (1847-1888), un étudiant médecin allemand, est le premier à décrire dans sa thèse en 1869, les îlots du pancréas sans leur attribuer une fonction particulière. En 1893, E. Laguesse leur donne le nom d'îlots de Langerhans [13]. L'importance du pancréas pour le métabolisme des glucides est connue depuis les expériences de Freiherr von Mering (1849-1908) et Oscar Minkowski (1858-1931) en 1890 [14]. Après ablation, chez le chien, du pancréas, ils observent l'ensemble des symptômes du diabète, à savoir, une hyperglycémie (concentration sanguine de glucose élevée), une glycosurie (présence de glucose dans les urines) et finalement une mort en 2 à 3 semaines impliquant une cétose (accumulation sanguine des corps cétoniques) et un coma. Leurs résultats sont la première preuve expérimentale de l'origine pancréatique du diabète. En 1900, Eugène Lindsay Opie (1873-1971), un assistant à l'Université Johns-Hopkins (Baltimore, Etats-Unis), décrit la dégénérescence hyaline des îlots de Langerhans au cours du diabète [15]. Les îlots sont alors considérés comme la source probable d'une sécrétion interne du pancréas qui permet un métabolisme du glucose normal et l'absence de diabète [15, 16].

En 1905, Ernest Henry Starling (1866-1927) invente le terme « hormone » (grec : *hormaein*, mettre en mouvement) pour désigner les messagers chimiques sécrétés par les glandes endocrines de l'organisme. Dès 1894, Sir Edward Albert Sharpey-Schäfer (1850-1935) suggère, sur des bases morphologiques, que les îlots pourraient être responsables de la sécrétion interne par laquelle le pancréas produit son effet sur la concentration sanguine de glucose. En 1909 et 1913, Jean de Meyer (1878-1934) et E. A. Sharpey-Schäfer dénomment « insuline » (latin : *insula*, île) la substance hormonale encore hypothétique présente dans les îlots [16-18].

Pendant les deux premières décennies du 20ème siècle, plusieurs chercheurs préparent des extraits pancréatiques ayant la propriété de diminuer la glycémie ou celle de réduire la glycosurie chez l'animal [16]. Cependant, des difficultés de purification (présence

d'impuretés) et des réactions toxiques (fièvre, abcès douloureux) empêchent toute administration au patient diabétique [19-23]. En 1921, Frederick Grant Banting (1891-1941), un jeune chirurgien orthopédique de l'Ontario, travaillant dans le laboratoire de John James Rickard Macleod (1876-1935), physiologiste à l'Université de Toronto, étudie la fonction des îlots pancréatiques. L'attention de Banting est attirée par un article de Moses Barron de l'Université du Minnesota (Etats-Unis) [24]. Il décrit un cas rare de lithiase pancréatique ayant obstrué entièrement le canal pancréatique principal : bien que les cellules acineuses aient disparues par dégénérescence (atrophie), la plupart des cellules d'îlots ont survécu intactes. Barron note les similitudes de cette observation avec la ligature expérimentale des canaux pancréatiques. En effet, en 1901, L.V. Ssobolev (1876-1919) avait montré que la ligature des canaux pancréatiques chez le lapin, le chat ou le chien conduit à une atrophie graduelle et une destruction des cellules acineuses sécrétant les enzymes, alors que les cellules d'îlots restent intactes pendant des semaines, sans apparition de glycosurie [25]. L'assistant de Banting, Charles Herbert Best (1899-1978), ligature les canaux pancréatiques chez le chien avant d'extraire le pancréas [26]. Ceci permet de détruire les parties du pancréas sécrétant les enzymes tout en laissant les îlots de Langerhans intacts. En effet, Banting pense que les échecs antérieurs sont attribuables à l'action destructrice de la trypsine et des autres enzymes pancréatiques sur l'insuline [16]. Leurs expériences produisent un extrait pancréatique qui réduit l'hyperglycémie et la glycosurie chez des chiens rendus diabétiques par ablation du pancréas [27, 28]. Ils développeront par la suite un protocole d'extraction du pancréas entier sans ligature du canal. Le succès de la purification de l'insuline provient largement du travail de James Bertram Collip (1892-1965) [29]. L'extrait pancréatique permet alors les premiers traitements de patients diabétiques ; le premier patient ayant reçu ce traitement est un enfant diabétique âgé de 14 ans, Leonard Thompson [30-33]. Le rendement et la standardisation de l'extrait sont ensuite améliorés grâce à une collaboration avec Eli Lilly et Compagnie. Tout au long de ces découvertes, les querelles entre Banting et Macleod furent continuelles. Le prix Nobel leur fut décerné pour la découverte de l'insuline. Ils décidèrent de le partager avec Best et Collip, respectivement [16].

La compagnie Lilly commence la commercialisation de l'insuline animale dès 1923. Malheureusement, la préparation a une durée d'action inférieure à 6 heures et une recherche s'engage pour la prolonger. En 1936, Hans Christian Hagedorn montre que l'addition d'une protéine basique, telle que la protamine, à la préparation d'insuline, permet de garder

l'hormone en suspension au site d'injection, retardant ainsi son absorption et donc son action [34, 35].

L'insuline est la première protéine dont la structure est séquencée en 1955 par Fred Sanger (prix Nobel en 1958). Elle est également la première protéine dont la synthèse chimique totale est possible dans le début des années 1960 [36-40]. Enfin, l'insuline a été la première hormone peptidique dont les quantités infimes ont pu être mesurées par radio-immunodosage par Rosalyn Yalow et Salomon Berson à partir de 1959 [41, 42]. C'est également la première protéine biosynthétisée dans des micro-organismes par recombinaison de l'ADN ouvrant ainsi la voie à la construction d'analogues de l'insuline [40].

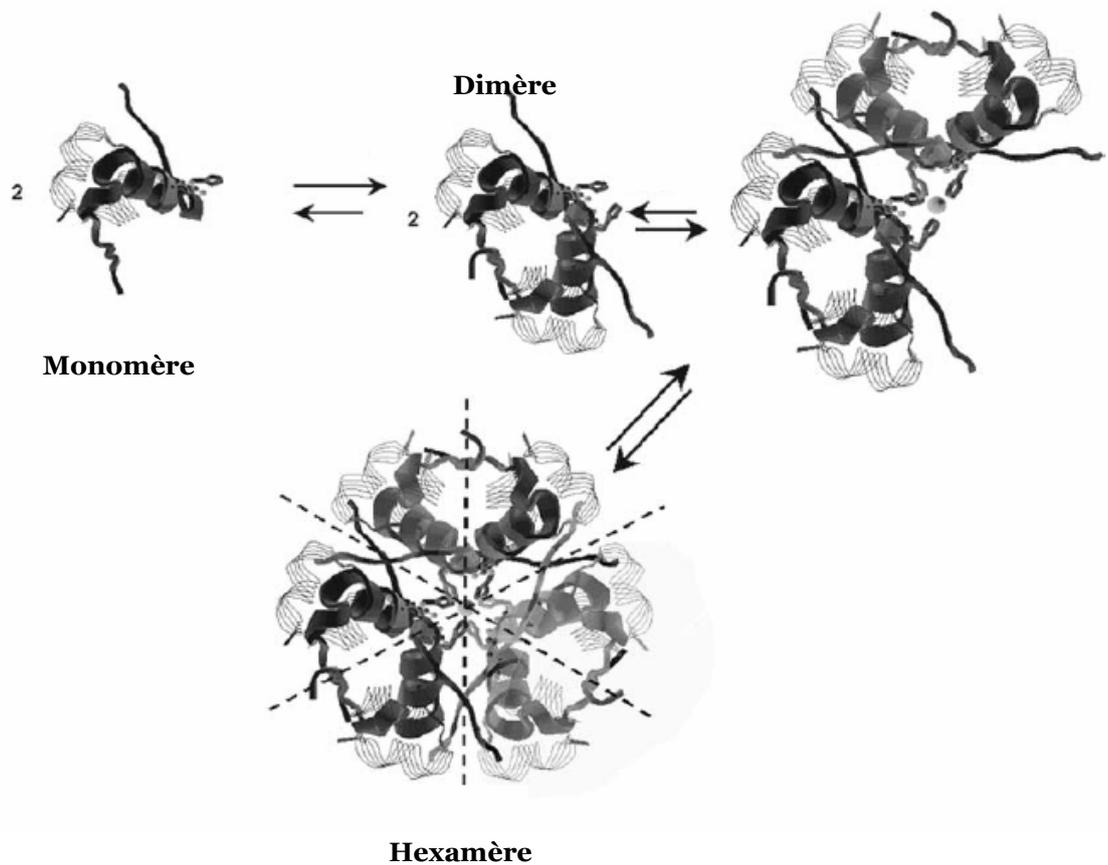


Figure 2 : Voie d'assemblage de l'hexamère T6 de l'insuline [43].

Dans la structure en hexamères avec 2 atomes de zinc, résolue par Hodgkin *et coll.* [44, 45], la chaîne A forme une hélice N-terminale, A1-A8, reliée à une hélice C-terminale, A12-A20. La chaîne B forme une hélice centrale B8-B19. Cette conformation est appelée conformation T. Dans sa forme cristallisée avec 2 atomes de zinc, l'ensemble des six monomères d'insuline est dans la conformation T (T6 ; Figure 2). Une conformation alternative existe, dans laquelle l'hélice de la chaîne B s'étend en direction de la partie N-terminale (B1-B19) ; elle est appelée conformation R. Dans l'hexamère avec 4 atomes de zinc, généré par une forte concentration d'ions chlorures, 3 des monomères sont dans la forme R et 3 dans la forme T (R3T3). Lorsque les cristaux contiennent du phénol, l'ensemble des six monomères est dans la forme R (R6) [40, 46, 47]. La transition T-R, équilibre allostérique, joue un rôle important dans les formulations pharmaceutiques de l'insuline où les phénols sont utilisés comme agents antimicrobiens et les chlorures comme agents isotoniques [48, 49].

3. Pancréas

Le pancréas est une glande exocrine et endocrine. La grande majorité des cellules du pancréas synthétise les enzymes digestives avant de les excréter dans le duodénum par l'intermédiaire de canaux. Entourés par le pancréas exocrine, on dénombre environ un million d'îlots de Langerhans qui constituent 1 à 1,5% du total de la masse pancréatique. Chaque îlot contient environ 3000 cellules productrices d'hormones organisées en un cœur central de cellules β (70% des cellules) sécrétant l'insuline et, soit en un manteau de cellules α sécrétant le glucagon (action hyperglycémiant) et/ou de cellules δ sécrétant la somatostatine (modulation de la sécrétion des autres hormones des îlots), soit en un manteau de cellules δ et de cellules PP sécrétant le polypeptide pancréatique (action sur l'excrétion des enzymes digestives du pancréas) [50, 51]. La relation étroite de couplage entre les sécrétions d'insuline et de glucagon en fonction de la glycémie est rendue possible par cette organisation anatomique et par la direction du flux sanguin dans les îlots. Chaque îlot est richement vascularisé avec de petites artérioles rentrant dans le cœur. Celles-ci se divisent en un réseau de capillaires formant des veinules qui transportent le sang dans le manteau. Ce dispositif permet une imprégnation des cellules α , δ et PP par de fortes concentrations d'insuline. De plus, les capillaires des îlots sont fenêtrés pour faciliter l'entrée des peptides dans la circulation sanguine [50].

4. Biosynthèse

4.1. Synthèse de l'insuline dans la cellule β

La découverte de la proinsuline, précurseur de l'insuline, en 1967 par Steiner et Oyer a été l'étape de départ déterminante pour la compréhension de la biosynthèse de l'insuline [52]. Chez les mammifères, l'expression du gène et la biosynthèse de l'insuline sont localisées exclusivement dans les seules cellules β du pancréas endocrine [53]. Le gène de l'insuline humaine (ou plutôt celui de la proinsuline) est localisé sur le bras court chromosome 11 et est transcrit en deux étapes. Au cours de la première étape, deux introns redondants sont excisés de l'ARN messager original. L'ARN messager mature ainsi formé est alors exporté dans le cytoplasme pour y être traduit [54]. La synthèse de la proinsuline dépend des mécanismes habituellement décrits pour les protéines exportées. Son ARN messager présente une séquence signal responsable de la stabilisation du ribosome sur la membrane du réticulum endoplasmique rugueux. Cette séquence est suivie d'autres séquences qui seront traduites en chaîne B, en un segment peptidique de connexion de 30-35 acides aminés et enfin en chaîne A. Ainsi, l'insuline est dirigée vers la lumière endoplasmique sous forme d'une molécule simple chaîne de 110 acides aminés appelée préproinsuline [55]. Dans le réticulum endoplasmique rugueux, des enzymes microsomiales coupent le peptide signal attendant à la partie N-terminale de la proinsuline ainsi formée [56]. La molécule linéaire prend sa configuration par la fermeture des 3 ponts disulfure et est ensuite transportée à travers le système de Golgi, environnement aqueux contenant du zinc et du calcium. Ces conditions favorisent la formation d'hexamères de proinsuline contenant du zinc [54, 55].

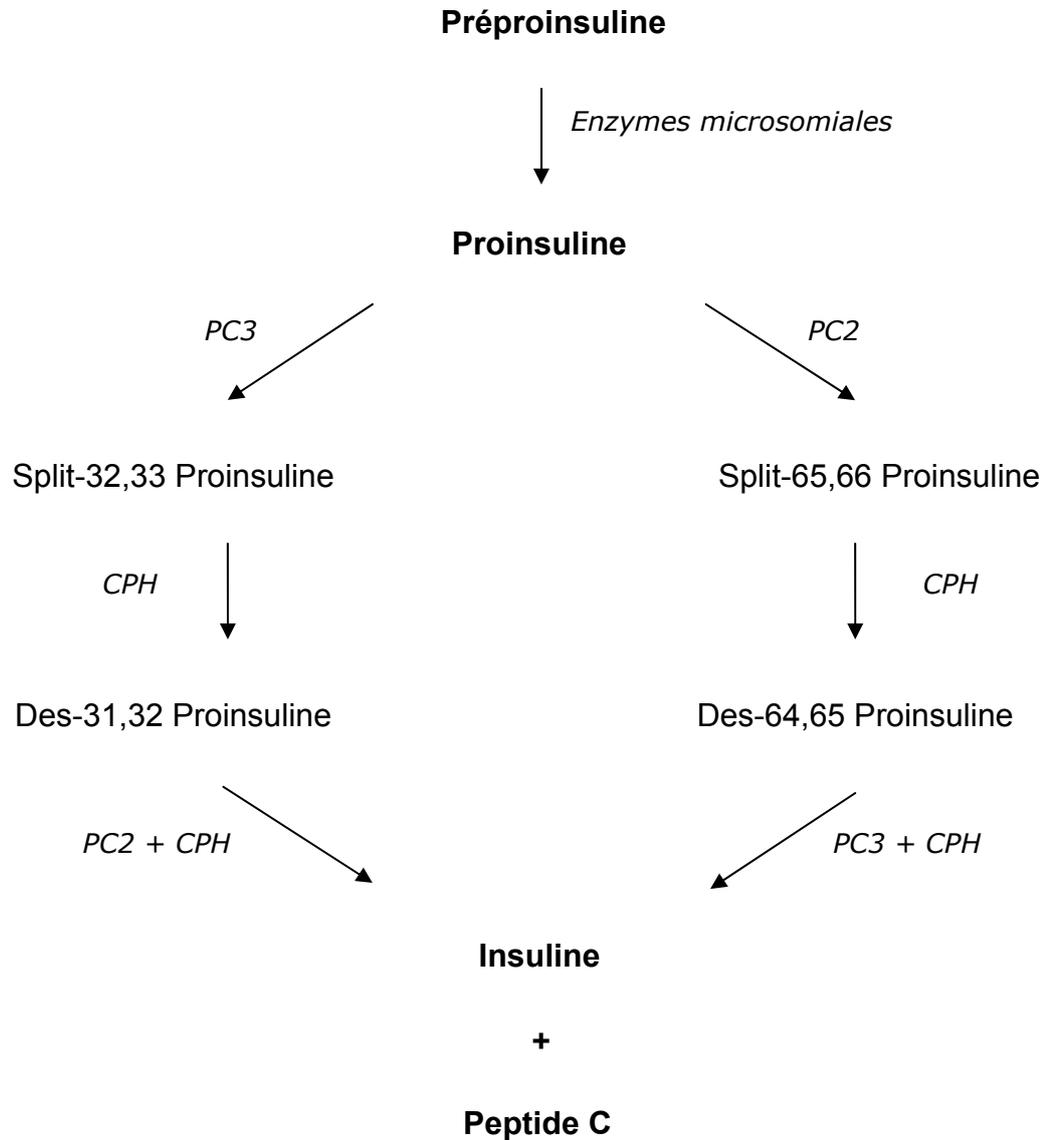


Figure 3 : Biosynthèse de l'insuline dans la cellule β pancréatique.

PC : Proprotein convertase ; CP : Carboxypeptidase.

Après triage pour la séparer des autres polypeptides produits par la cellule β , pendant son passage à travers l'appareil de Golgi, l'insuline atteint finalement les vésicules de sécrétion précoces. En premier lieu, deux endopeptidases distinctes Ca^{2+} dépendantes (*Proprotein Convertase 3* ou *1*, PC3/PC1 et *Proprotein Convertase 2*, PC2) clivent la proinsuline intacte aux deux sites aminoacides di-basiques à la fois sur la chaîne A et sur la

chaîne B. La Figure 3 indique que les endopeptidases initient deux voies de synthèse séparées, la voie conduisant à la formation de l'intermédiaire $\text{Arg}^{32}\text{Glu}^{33}$ étant préférentielle. PC3 coupe la jonction BC (chaîne B – peptide C) formant la proinsuline split $\text{Arg}^{32}\text{Glu}^{33}$, alors que PC2 agit préférentiellement sur la jonction AC (chaîne A – peptide C) donnant ainsi principalement la proinsuline split $\text{Arg}^{65}\text{Gly}^{66}$. Le pH optimum restreint de PC3 et la nécessité de concentrations élevées de Ca^{2+} pour son fonctionnement suggèrent que son activité se limite aux vésicules de sécrétion. A l'inverse, PC2 peut fonctionner avec une large gamme de pH et se satisfait de faibles concentrations en Ca^{2+} ; ainsi elle peut opérer dans le système de Golgi [54].

Par la suite, les deux intermédiaires sont clivés par la carboxypeptidase H (CPH), avec perte d'un résidu dibasique conduisant soit à la proinsuline des- $\text{Arg}^{31}\text{Arg}^{32}$ soit à la proinsuline des- $\text{Lys}^{64}\text{Arg}^{65}$. La perte du peptide C conduit finalement à l'insuline mature, produisant ainsi une molécule d'insuline et une molécule de peptide C ainsi que 4 acides aminés basiques pour chaque molécule de proinsuline convertie [54, 56].

Il semble que le clivage par les endopeptidases PC3 et PC2 aux deux jonctions proinsuline soit le facteur limitant de la synthèse de l'insuline ; au contraire, la CPH présente une action très rapide et efficace [57]. La distribution des endopeptidases et l'ensemble des activités mentionnées ci-dessus indiquent que malgré l'apparition d'une petite quantité de proinsuline split $\text{Arg}^{65}\text{Gly}^{66}$ dans le système de Golgi, le principal site de conversion est le granule acidifié recouvert de clathrine [54, 56]. La clathrine est une protéine du cytosquelette qui sert d'ancrage aux fibres contractiles du même cytosquelette, ce qui permet les mouvements des granules vers la membrane plasmique [58]. Lorsque le granule perd sa clathrine, le processus est pratiquement terminé ; il contient alors essentiellement de l'insuline et est devenu mature. La conversion n'est toutefois pas totale ; de la proinsuline intacte et des intermédiaires demeurent emprisonnés dans la vésicule de sécrétion mature, représentant environ 2 à 6% de son contenu qui sera éventuellement déversé dans la circulation. Le pourcentage de proinsuline split circulante peut être plus élevé chez les diabétiques de type 2 [54]. Le peptide C pourrait subir une protéolyse limitée générant le des-27-31 peptide C, un produit de sécrétion majeur dans la cellule β du nouveau-né [59].

4.2. Enzymes participant à la synthèse de l'insuline

PC3, PC2 et CPH agissent conjointement pour convertir la proinsuline en insuline dans les granules de sécrétion des cellules β . Ces 3 enzymes, comme la proinsuline, sont synthétisées sous forme de zymogènes et sont triées dans les voies de régulation de sécrétion de telle sorte que chaque granule de sécrétion contienne, en plus de la prohormone, un jeu complet des enzymes nécessaires au processus [59].

4.2.1 Proprotein Convertases

En 1990, une famille d'enzymes protéolytiques homologues à une protéase de champignon hex 2, ou hexin a été décrite [60-62]. Du fait de l'homologie de leur domaine catalytique avec une subtilisine sérine protéase bactérienne, ces enzymes ont été appelées *subtilisin-like proprotein convertases* (SPCs). Les principales convertases des granules de sécrétion (voie sécrétoire régulée dans les cellules neuroendocrines et dans d'autres tissus) sont PC2 et PC3 [60].

Le prodomaine de PC3 est clivé rapidement ($t_{1/2} = 5$ min) dans le réticulum endoplasmique par un mécanisme autocatalytique à pH neutre. Ce clivage est Ca^{2+} -dépendant *in vitro* ; ce n'est pas le cas *in vivo*. Le peptide prodomaine peut inhiber l'activité de PC3 *in vitro* ; ce phénomène pourrait masquer l'activité PC3 avant son tri. Un clivage supplémentaire C-terminal de la PC3 mature se produit tardivement [59].

A la différence de la maturation de proPC3, celle de proPC2 est lente ($t_{1/2} = 140$ min). Elle se produit optimalement à pH 5,5 de façon Ca^{2+} -dépendante. La génération de l'enzyme active dépend non seulement du clivage du prodomaine mais également de son association avec le zymogène d'une protéine accessoire, 7B2 [59].

Ces sérine protéases présentent toutes, de façon caractéristique, un propeptide amino-terminal (Pro) suivi par un module catalytique (Cat) bien conservé (mais modifié par rapport à la subtilisine) et enfin un domaine de 150 acides aminés appelé « domaine P » ou « *homo B-domain* » [60-62]. Le domaine P joue un rôle de régulateur ; il pourrait influencer sur la dépendance marquée aux ions Ca^{2+} et le pH optimum plus acide de certaines *Proprotein Convertases*. De plus, le domaine P apparaît également stabiliser structurellement le domaine catalytique. Ce domaine catalytique présente une spécificité pour les résidus multi-basiques.

La séquence consensus du substrat est Arg-X-Lys/Arg-Arg↓-X, où X peut être presque n'importe lequel des acides aminés et ↓ représente le site de clivage [60].

PC3 clive la proinsuline humaine presque exclusivement sur le côté carboxyl de Arg³¹-Arg³² à la jonction B/C de la proinsuline alors que PC2 préfère le site Lys⁶⁴-Arg⁶⁵ à la jonction A/C. PC2 présente une V_{max} plus élevée pour la conversion de l'intermédiaire des-31,32 proinsuline que pour la proinsuline humaine alors que PC3 convertit la proinsuline et la des-64,65 proinsuline avec une efficacité similaire. Ceci suggère que la synthèse de l'insuline est séquentielle, plus de 90% de la conversion de la proinsuline se produisant via l'intermédiaire des-31,32 proinsuline [59].

4.2.2. Carboxypeptidase H

La CPH, 3^{ème} enzyme protéolytique impliquée dans la biosynthèse de l'insuline, est une exopeptidase. Cette enzyme nécessite pour son fonctionnement la présence d'ions Ni²⁺ et présente un pH optimum acide [53]. La CPH élimine rapidement les résidus basiques exposés suite à l'action de PC3 et/ou PC2, accélérant le processus de conversion [59].

5. Sécrétion

Des études ultra-structurales ont montré qu'une seule cellule β contient plus de 10 000 granules de sécrétion ou vésicules de sécrétion lisses [51, 63]. Ces granules contiennent un mélange chimiquement complexe d'ions, de petites molécules et de protéines. Deux cations divalents sont présents en quantité particulièrement importante : Zn^{2+} et Ca^{2+} . Parmi les protéines, l'insuline et les peptides en rapport avec sa synthèse représentent environ 75% de la masse des vésicules : insuline et peptide C en quantités équivalentes ainsi qu'un peu de proinsuline résiduelle. Les 25% de protéines restantes comprennent notamment plus d'une centaine de protéines de membrane et de protéines de transport [51, 64].

Dans l'exocytose constitutive, le matériel est sécrété en continu. Inversement, dans la voie régulée, l'exocytose des vésicules de sécrétion est arrêtée à la dernière étape et ne se poursuit que lorsqu'un stimulus approprié est appliqué. Ainsi, la cellule β pancréatique est chargée de granules indénombrables, contenant de l'insuline, prêts à être stimulés pour l'exocytose [65]. L'augmentation de la concentration du glucose constitue ce stimulus : la membrane de la vésicule s'intègre alors à la membrane cellulaire libérant l'insuline hors de la cellule [51, 63].

La sécrétion d'insuline ne dépend pas seulement de la concentration locale de glucose mais également de la rapidité de la variation de cette concentration. Lorsque la concentration de glucose augmente lentement *in vitro*, la sécrétion d'insuline augmente en parallèle. Cette cinétique est retrouvée également *in vivo* après un repas ou une augmentation progressive de la concentration en glucose. Lorsque la concentration de glucose augmente brutalement et si elle est maintenue à un niveau élevé, la sécrétion de l'insuline suit une cinétique biphasique : un nadir et une seconde phase d'augmentation lente suivent un pic rapide (première phase) [63, 66]. Cette cinétique particulière est observée *in vitro* sur pancréas de rat perfusé ou *in vivo* après augmentation rapide de la glycémie pendant une perfusion intraveineuse de glucose.

Une fraction seulement du contenu en insuline de la cellule β est sécrétée pendant la stimulation. La première et la seconde phase de sécrétion, dans des îlots de souris, représentent respectivement 0,14%/minute et 0,05%/minute (quantité d'insuline sécrétée par minute / quantité d'insuline présente dans la cellule). Etant donné que chaque cellule β

contient environ 10 000 granules, ce taux de sécrétion correspond approximativement à 15 et 5 granules par minute et par cellule β . Ce qui représente un total de 40 à 80 granules pour la première phase [63].

L'entrée de glucose dans les cellules β s'effectue par diffusion facilitée à l'aide du transporteur membranaire de type 2 du glucose (GLUT-2), ayant une forte capacité, et n'est pas limitée [58, 66, 67]. Les modifications de la concentration de glucose extracellulaire sont immédiatement répercutées par des modifications du métabolisme de la cellule β . Un couplage étroit entre glycolyse et métabolisme mitochondrial conduit à des variations rapides et marquées du rapport ATP/ADP [66-68]. Ce rapport contrôle les canaux K^+ /ATP de la membrane plasmique. Une augmentation du rapport ATP/ADP provoque la fermeture de ces canaux, une dépolarisation membranaire et une ouverture de canaux calciques voltage-dépendants [66, 69]. Au repos, la concentration de Ca^{2+} libre dans la cellule β est environ 10 000 fois plus faible que dans le milieu extracellulaire (100-200 nmol/l et 1,2 mmol/l, respectivement) [58]. L'influx de Ca^{2+} provoquée par l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants active un système effecteur responsable de l'exocytose des granules d'insuline [66, 69].

La sécrétion d'insuline est un phénomène pulsatile. Deux fréquences majeures caractérisent ces oscillations : des pulses rapides d'insuline (et de peptide C) avec une périodicité de 10 à 15 minutes et des oscillations ultradiennes avec des périodes de 1 à 3 heures [1, 70]. Les pulses les plus rapides pourraient avoir pour origine les oscillations du Ca^{2+} libre cytosolique. Des concentrations stimulantes de glucose (>7 mmol/l) dépolarisent la cellule β et initient une activité électrique rythmique. Cette activité électrique consiste en des phases actives de potentiels d'action calcium dépendantes s'interposant avec des phases silencieuses hyperpolarisées. L'activité électrique rythmique entraîne simultanément des oscillations de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . Ces oscillations, à leur tour, provoquent des oscillations simultanées de la sécrétion d'insuline [69]. Les oscillations ultradiennes résultent probablement d'une boucle de rétrocontrôle entre la production de glucose et la sécrétion d'insuline [70].

Après libération de la cellule β , l'insuline pénètre dans les capillaires sanguins. L'endothélium des capillaires sanguins, dans les glandes endocrines, présente la particularité d'être percé de très nombreux pores, obturés chacun par un mince diaphragme [51].

La régulation à court terme de la sécrétion d'insuline, telle qu'une réponse à un repas, se produit principalement sur l'exocytose. Par contre, le maintien des stocks intracellulaires adéquats d'insuline sur le long terme repose sur une régulation transcriptionnelle et traductionnelle de la biosynthèse de l'insuline. Là encore, le glucose joue le rôle principal de régulateur de l'expression du gène de la proinsuline [71].

La totalité de l'insuline n'est pas ultimement sécrétée : un certain nombre de vésicules sécrétoires lisses rencontrent, lors de leur migration vers la membrane cellulaire, des lysosomes, c'est-à-dire des organites de dégradation cytoplasmique. Lors de cette rencontre, l'insuline est détruite [51].

6. Clairance et dégradation

L'insuline a une demi-vie plasmatique courte (4 à 6 minutes) permettant une adaptation rapide à toute modification de la concentration sanguine de glucose [72]. En 1981, Goldstein et Livingston ont suggéré que la dégradation de l'insuline pouvait se produire à l'intérieur de la cellule [73, 74]. L'insuline exerce son action sur les cellules cibles après liaison à un récepteur membranaire spécifique [75]. La capture et la dégradation de l'insuline sont des propriétés de tous les tissus sensibles à l'insuline [72]. Dans la plupart des tissus cibles, l'interaction de l'insuline avec son récepteur constitue la première étape du processus de sa dégradation [74, 75]. Le complexe insuline-récepteur s'internalise dans la cellule et l'insuline est ensuite dégradée. La contribution d'un processus de capture de l'insuline non spécifique ne présente que peu d'importance aux concentrations physiologiques [72].

L'enzyme responsable de la dégradation a été identifiée pour la première fois il y a presque 50 ans et a été dénommée insulase (EC 3.4.24.56 ; en anglais, *insulysin* ou *insulin degrading enzyme*, IDE) [8, 74, 76]. L'IDE est composée d'une chaîne polypeptidique d'environ 110 kDa et contient un atome de zinc dans son site actif [74]. Il s'agit d'une métallopeptidase, membre de la famille de l'inverzincine. Bien que l'IDE soit principalement localisée dans le cytoplasme, elle est également retrouvée dans les peroxysomes, alors qu'une faible fraction de l'enzyme est présente sur la membrane plasmique ou encore sécrétée. La spécificité de substrat de l'IDE est complexe et encore mal comprise. L'enzyme aurait une préférence pour les résidus acides aminés basiques (arginine, lysine) ou larges et hydrophobes (phénylalanine, leucine, tyrosine). La structure tridimensionnelle du substrat aurait une grande importance pour la spécificité (Figure 4). Les autres substrats décrits pour cette enzyme sont notamment le glucagon, le *transforming growth factor* α , le peptide natriurétique atrial, la β -endorphine, les dynorphines et l'amyline [77]. Cependant, l'insuline est de loin le substrat ayant la plus forte affinité pour l'IDE [78].

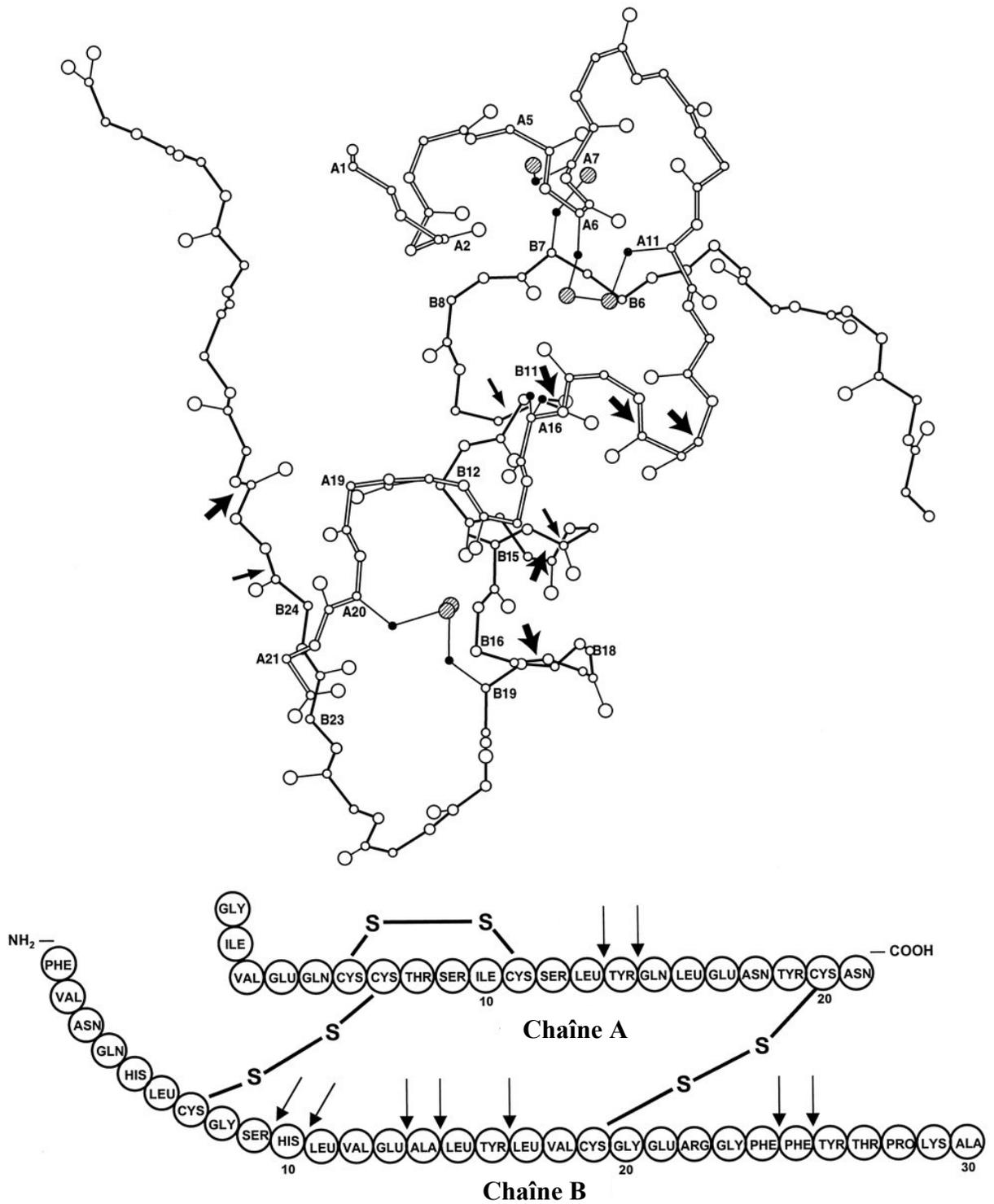


Figure 4 : Sites de clivage de l'IDE (insulin degrading enzyme) sur l'insuline porcine. La plupart des clivages se produisent dans une poche (structure tridimensionnelle) éloignée du site de liaison au récepteur. D'après Duckworth et coll. [72]

La PDI (*protein disulfide isomerase*) clive les liaisons disulfure. Enfin, les lysosomes achèvent la dégradation des molécules d'insuline partiellement dégradées. Les enzymes impliquées sont des protéinases acides fonctionnant dans un environnement acide [72].

Dans les conditions physiologiques, le foie est l'organe le plus important dans la dégradation de l'insuline : environ 50% de l'insuline entrant dans le foie est dégradée en un seul passage [72, 75]. Cette dégradation se produit presque exclusivement à la suite de la liaison de l'insuline à son récepteur. La localisation anatomique du pancréas, sécrétant l'insuline directement dans la veine porte, induit la dégradation immédiate par le foie d'environ la moitié de l'insuline nouvellement formée [75].

L'autre site important de dégradation est le rein. Deux voies de dégradation y sont décrites : l'une faisant intervenir le récepteur de l'insuline (saturable) et l'autre non (non saturable). Le rein dégrade également la proinsuline et le peptide C par une voie non saturable. Puisque le peptide C n'est pas capté par le foie, sa mesure dans le plasma est un bon indicateur du taux de sécrétion de l'insuline [75].

7. Le récepteur de l'insuline

Le récepteur de l'insuline (RI) est une glycoprotéine transmembranaire qui appartient à la superfamille des récepteurs transmembranaires à tyrosine kinases. Contrairement aux autres membres de cette superfamille qui présentent tous une structure monomérique (EGF, *epidermal growth factor* ; PDGF, *platelet-derived growth factor* ; érythropoïétine ; VEGF, *vascular endothelial growth factor* ; FGF, *fibroblast growth factor* ; etc.), le RI et son homologue, le récepteur à l'IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*) sont des dimères. Il s'agit de dimères de protéines elles-mêmes hétérodimériques ($\alpha\beta$) liées par des ponts disulfure pour former un ensemble $(\alpha\beta)_2$. La sous-unité α de 135 kDa, liant l'insuline, du RI est extracellulaire, alors que la sous-unité β de 95 kDa contient une portion extracellulaire, une simple séquence transmembranaire et une partie intracellulaire contenant un domaine tyrosine kinase [79-81].

Le gène du RI contient 22 exons et 21 introns. L'exon court 11 est alternativement épissé donnant naissance à deux isoformes (A et B) qui diffèrent légèrement pour leur affinité vis-à-vis de l'insuline. L'isoforme B lie les IGF (*insulin-like growth factors*) avec une affinité au moins 100 fois plus faible que l'insuline ; l'isoforme A a une affinité significativement plus importante pour les IGF [40]. Le RI est synthétisé sous forme d'un précurseur polypeptidique de 1343 ou 1355 acides aminés. Pendant le transport vers la surface cellulaire, 27 résidus acides aminés sont éliminés et les chaînes oligosaccharidiques sont greffées aux sites spécifiques de glycosylation [82].

Les autres membres de la superfamille des récepteurs transmembranaires couplés aux tyrosine kinases sont des monomères inactifs qui sont activés par la liaison extracellulaire d'un ligand induisant une oligomérisation non covalente. Celle-ci produit une auto-phosphorylation du domaine tyrosine kinase intracellulaire. Au contraire, le RI, déjà dimérisé de façon covalente, est inactif et est activé par la liaison du ligand sans autre oligomérisation. Ainsi, la structure de récepteur dimérique inhibe l'activation de sa tyrosine kinase en l'absence d'insuline et permet son activation après liaison de son ligand. La phosphorylation de la tyrosine kinase permet son activation et va à son tour activer une série de messagers intracellulaires. Ces voies d'activation conduisent à une augmentation du transport cellulaire du glucose notamment à travers le transporteur régulable du glucose GLUT-4 et une augmentation de l'activité de la glycogène synthase. Les autres effets métaboliques de ces

activations concernent la lipogenèse, la lipolyse, la synthèse protéique et la croissance cellulaire [80].

8. Effets biologiques et physiologiques

Les effets biologiques de l'insuline au niveau cellulaire peuvent être classés en 3 groupes en fonction du moment de leur intervention [75] :

- Les effets immédiats apparaissent dans les secondes qui suivent le contact avec l'hormone. Ils comprennent l'activation de systèmes de transport du glucose et des ions et des phosphorylations/déphosphorylations d'enzymes pré-existantes ;
- Les effets intermédiaires impliquent l'induction de gènes et l'expression de quelques protéines. Par exemple, des activités ornithine décarboxylase et tyrosine aminotransférase sont détectées dans les 5 à 60 minutes mais atteignent un maximum en 3 à 6 heures après la stimulation par l'insuline ;
- Les effets à long terme de l'insuline nécessitent plusieurs heures à plusieurs jours. Ces effets sont la synthèse de l'ADN, la prolifération cellulaire et la différenciation cellulaire mais aussi l'expression de certains gènes.

Les effets physiologiques de l'insuline sont essentiellement anaboliques [50]. L'insuline est la principale hormone responsable de la régulation du métabolisme glucidique et participe à la régulation du stockage et de l'utilisation de nombreux nutriments [75]. L'insuline est le seul facteur hypoglycémiant face à un arsenal abondant d'hormones et de neurotransmetteurs hyperglycémiant [83].

Les principales cibles des actions anaboliques de l'insuline sont le foie, le tissu adipeux et le muscle [50, 84].

Dans le foie, l'insuline favorise la synthèse du glycogène en stimulant la glycogène synthétase et en inhibant la glycogène phosphorylase ; elle n'a aucun effet direct sur les transporteurs GLUT-2 et de ce fait sur la capture du glucose par les hépatocytes. Par contre, dans le muscle et le tissu adipeux, l'insuline induit une capture rapide du glucose en recrutant et en augmentant l'expression à la surface cellulaire des transporteurs GLUT-4. Dans le muscle, le glucose est converti en glycogène et, dans le tissu adipeux, en acides gras avant d'être stocké sous forme de triglycérides [50, 84].

L'insuline joue, sur le métabolisme lipidique, un rôle anabolisant. Elle favorise la synthèse des triglycérides à partir des glucides alimentaires, stimule leur stockage dans le tissu adipeux et le muscle grâce à l'activation de la lipoprotéine lipase et de la lipogenèse et inhibe la lipolyse adipocytaire [84].

Dans le muscle, l'insuline stimule la capture des acides aminés, favorise la synthèse protéique et inhibe la protéolyse [50, 84].

Chapitre 2 : Insulinothérapie

1. Place de l'insuline dans le traitement du diabète

L'injection d'insuline exogène a pour la première fois été utilisée par Fred Banting et Charles Best en 1922, chez un patient diabétique de type 1. Cette expérience a démontré que le diabète de type 1 n'est pas une pathologie nécessairement mortelle et a ouvert la voie à l'insulinothérapie [85].

Deux études à grande échelle ont marqué la prise en charge actuelle des patients diabétiques : les études DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) et UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*) ont montré, pour le diabète de type 1 et de type 2, respectivement, qu'une insulinothérapie « intensive » diminue significativement les risques de complications diabétiques [86, 87].

1.1. Généralités sur le diabète

Le diabète est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par l'hyperglycémie et résultant d'une insuffisance absolue ou relative de sécrétion de l'insuline, d'action de l'insuline, ou les deux. L'hyperglycémie chronique du diabète est associée à des dommages à long terme et conduit à un dysfonctionnement et une insuffisance d'organes variés, en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins. Une hyperglycémie à jeun supérieure à 1,26 mg/l (7,0 mmol/l) est spécifique du diabète ; elle est susceptible d'entraîner des complications microangiopathiques. Une hyperglycémie chronique même moins prononcée peut à elle seule entraîner des complications macroangiopathiques.

La classification des diabètes est fondée depuis 1997 sur la physiopathologie des différentes formes cliniques et génétiques de la maladie et non plus sur le type de traitement administré au patient [88]. Cette classification est actuellement recommandée par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et l'ADA (American Diabetes Association) et comprend 4 catégories [89, 90] :

- Le diabète de type 1 qui résulte de la destruction cellulaire β conduisant habituellement à une insuffisance absolue en insuline ;
- Le diabète de type 2 qui résulte d'une insuffisance progressive de sécrétion d'insuline sur un terrain de résistance à l'insuline ;
- De nombreux autres types de diabètes provoqués par des causes variées (exemple : le déficit génétique de la fonction cellulaire β) ;
- Le diabète gestationnel (diagnostiqué pendant la grossesse).

Les formes les plus répandues de diabète sont par ordre d'incidence décroissante les diabètes de type 2 et de type 1 [91].

Plusieurs processus pathologiques sont donc impliqués dans le développement du diabète. La destruction auto-immune des cellules β du pancréas, dans le diabète de type 1, a pour conséquence un déficit en insuline auquel peut être associée une résistance à l'action de l'insuline.

Le défaut d'activité insulinique sur les tissus cibles, dans le diabète de type 2, conduit à des anomalies du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Ce défaut d'activité de l'insuline provient d'une sécrétion inadéquate d'insuline (insuffisance cellulaire β) et/ou de réponses du tissu à l'insuline diminuées (résistance à l'insuline). L'insuffisance de sécrétion de l'insuline et la résistance à l'insuline coexistent dans le diabète de type 2 chez un même patient ; il n'est souvent pas facile, lorsque les deux anomalies sont présentes, de discerner celle qui est principalement responsable de l'hyperglycémie [89].

Une polyurie (augmentation du volume des urines émises), une polydipsie (exagération anormale de la sensation de soif, poussant le malade à boire en quantité), une perte pondérale, parfois une polyphagie (exagération anormale de la prise d'aliments) et des problèmes visuels sont les symptômes de l'hyperglycémie. Un retard de croissance et une susceptibilité particulière à certaines infections peuvent également accompagner l'hyperglycémie chronique. L'hyperglycémie avec acidocétose et le syndrome hyperosmolaire non cétonique sont des complications aiguës du diabète non contrôlé. La rétinopathie avec possible cécité, la néphropathie conduisant à l'insuffisance rénale et la neuropathie périphérique sont des complications dites microangiopathiques à long terme du diabète. D'autre part, les patients diabétiques présentent un risque accru de développer des maladies

cardiovasculaires athérosclérotiques, artérielles périphériques et cérébrovasculaires [89]. L'hypertension et les anomalies du métabolisme des lipoprotéines sont souvent retrouvées avant l'apparition du diabète : dans le diabète de type 2, la macroangiopathie précède souvent l'apparition du diabète, du fait du terrain sur lequel il apparaît et des troubles du métabolisme glucidique qui ont évolué sur plusieurs années (hypertension, obésité, hyperglycémie à jeun et hypertriglycéridémie) [89].

1.2. Place de l'insuline dans le traitement du diabète de type 1

La carence en insuline est la caractéristique principale du diabète de type 1. L'insulinothérapie, vitale pour les patients diabétiques de type 1, prévient un état catabolique progressif et une cétose. Lorsque l'insuline est correctement utilisée, elle peut faire disparaître les symptômes cliniques de l'hyperglycémie, prévenir l'acidocétose diabétique, restaurer la masse musculaire, permettre les exercices physiques, diminuer l'incidence de certaines infections et améliorer la sensation de bien-être des patients [92].

Les complications microvasculaires (rétinopathie, neuropathie et néphropathie) débutent chez le patient diabétique dès le début de l'exposition à l'hyperglycémie chronique mais ne sont diagnostiquées cliniquement qu'après une dizaine d'année d'évolution de la pathologie ; elles peuvent être prévenues ou stabilisées lorsque l'HbA_{1C} (hémoglobine A_{1C}, résultant de la fixation d'un résidu glucose sur l'hémoglobine A, reflet de l'équilibre glycémique) demeure inférieure à 7%. Les complications cardiovasculaires (cardiopathie ischémique, accident vasculaire cérébral et arosyndrome) débutent après l'apparition du diabète, en présence d'autres facteurs de risques cardiovasculaires, et sont une cause importante de morbidité et de mortalité [93, 94].

Deux méta-analyses indépendantes et une grande étude ont conclu qu'une augmentation de l'exposition glycémique augmente le risque de développer des maladies cardiovasculaires [94-97]. Ces études indiquent qu'une augmentation de 1% de l'HbA_{1C} au-dessus de 5% augmente le risque de maladie cardiovasculaire d'environ 20%. Dans l'étude EPIC (*European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition*) – Norfolk, les sujets ayant une HbA_{1C} entre 5,0 et 5,5% avaient un risque de décès par maladie cardiovasculaire 2,5 fois supérieur à celui des sujets ayant une HbA_{1C} ≤ 5,0% [98]. Il semble donc raisonnable d'en conclure que l'exposition glycémique est un facteur de risque indépendant de maladie cardiovasculaire ; ce facteur de risque semble continu et sans seuil apparent [94].

L'étude DCCT a concerné 1441 patients diabétiques de type 1 randomisés en deux groupes : le premier groupe recevait une insulinothérapie « intensive » (pompe à insuline ou plus de 3 injections d'insuline par jour) avec des contrôles glycémiques fréquents et le second groupe recevait une insulinothérapie « classique » définie par une ou deux injections d'insuline par jour [86]. Les patients ont été suivis pendant 6,5 années en moyenne. L'insulinothérapie « intensive » a permis une réduction de 76% du développement de la rétinopathie chez des patients non atteints et un ralentissement de 54% de la progression de la maladie chez les patients ayant une rétinopathie modérée. Dans le groupe recevant une insulinothérapie « intensive », on constate une diminution de la microalbuminurie de 39%, de l'albuminurie de 54% et de la neuropathie clinique de 60% par rapport à l'autre groupe. L'effet secondaire principal observé dans ce groupe est une augmentation de 2 à 3 fois de la fréquence des hypoglycémies sévères. L'essai a permis de conclure que l'insulinothérapie « intensive » chez le patient diabétique de type 1 retarde le début et ralentit la progression de la rétinopathie diabétique, de la néphropathie et de la neuropathie [86]. Une cohorte représentant 93% de la population initiale de l'étude DCCT a été suivie pendant 17 ans en moyenne. L'insulinothérapie « intensive » a réduit le risque d'infarctus du myocarde non fatal, d'accident vasculaire cérébral ou de décès de maladie cardiovasculaire de 57% ($p = 0,02$) [99].

Pour résumer, les buts de l'insulinothérapie chez le patient diabétique de type 1 sont [92] :

- D'éliminer les symptômes de l'hyperglycémie.
- De prévenir l'acidocétose diabétique.
- De prévenir l'état catabolique sévère et de regagner de la masse musculaire.
- De diminuer la fréquence des infections.
- Pendant la grossesse, de diminuer la morbidité pour la mère et pour le fœtus.
- De prévenir et de retarder l'apparition des complications micro- et macro-angiopathiques.

1.3. Place de l'insuline dans le traitement du diabète de type 2

Le diabète de type 2 est la forme la plus commune de diabète (90 à 95% des cas de diabètes dans le monde) [89, 91]. Elle est caractérisée par des perturbations de l'action de l'insuline (résistance à l'insuline) et de sa sécrétion (insuffisance relative) ; l'un ou l'autre aspect peut se retrouver au premier plan. La résistance à l'insuline est définie comme la nécessité de concentrations en insuline plasmatique plus élevées que la normale pour maintenir la normoglycémie [100]. En général, les deux anomalies (résistance à l'insuline et insuffisance β cellulaire) sont présentes au moment de l'apparition des signes cliniques.

Le traitement initial du diabète de type 2 ne comprend généralement pas d'insulinothérapie. Un régime, de l'exercice physique, une perte de poids et des antidiabétiques oraux sont les traitements qui permettent de parvenir à un contrôle glycémique correct à ce stade [92]. En effet, au moment du diagnostic, on estime à environ 50% la fonction cellulaire β résiduelle [101]. L'insulinothérapie est indiquée chez les patients qui ne parviennent pas à équilibrer leur glycémie. Les buts de l'insulinothérapie dans le diabète de type 2 sont identiques à ceux du diabète de type 1 [92].

L'étude UKPDS a concerné 3867 diabétiques de type 2 dont le diagnostic venait tout juste d'être posé [87]. Les patients ont été randomisés en 2 groupes : les patients du premier groupe recevaient soit une thérapie « intensive » à base de sulfamides hypoglycémiantes (chlorpropamide, glibenclamide ou glipizide) soit une insulinothérapie « intensive » et les patients du second groupe un traitement classique avec un régime. Les patients ont été suivis pendant 10 ans. Dans le groupe des patients recevant un traitement intensif, les paramètres témoignant d'une complication diabétique avaient diminué de 12% (diminution de 25% des paramètres indiquant un risque microvasculaire) , la mortalité liée au diabète de 10% et la mortalité globale de 6%. Les épisodes hypoglycémiques et la prise pondérale ont été plus importants dans le premier groupe. Cet essai n'a pas permis de montrer une réduction du risque cardiovasculaire. Cependant, une ré-analyse a montré une relation significative entre complications cardiovasculaires et hyperglycémie chronique estimée par l'HbA_{1C} [102, 103]. Pour chaque point de pourcentage de diminution de l'HbA_{1C}, le risque d'infarctus du myocarde est diminué de 14% ($p < 0,0001$), le risque d'accident vasculaire cérébral est diminué de 12% ($p = 0,035$) et le risque d'amputation ou de décès consécutif à un acrosyndrome est diminué de 43% ($p < 0,0001$) [102].

Habituellement, l'insulinothérapie dans le diabète de type 2 fait suite à un échec des antidiabétiques oraux ou à une de leurs contre-indications [104]. Si l'on considère le diabète de type 2 comme une maladie évolutive, l'insulinothérapie est susceptible d'être proposée un jour ou l'autre à la plupart des patients [105].

2. Voies d'administration de l'insuline

L'injection sous-cutanée est la voie d'administration de l'insuline la plus utilisée en clinique. La voie intraveineuse est réservée au milieu hospitalier. La voie intrapéritonéale est utile dans les cas de diabète très instables. Récemment, l'administration pulmonaire a été rendue possible. L'insuline est faiblement absorbée par la cavité buccale et nasale, les intestins et la peau [106]. Pour éviter les injections, de très nombreuses recherches sont en cours pour développer une voie d'administration alternative (buccale, sublinguale, rectale, oculaire, transdermique, intranasale, etc.) [107].

2.1. Sous-cutanée

La seule voie d'administration de l'insuline possible en pratique clinique a pendant longtemps été la voie parentérale, l'insuline étant dégradée par les protéases du système gastro-intestinal [108].

L'injection sous-cutanée n'est pas une voie d'administration physiologique pour l'insuline : elle introduit de plus fortes concentrations d'insuline dans le sang périphérique par rapport aux concentrations présentes dans la veine porte [108].

2.1.1. Bolus

Les systèmes utilisés pour l'administration sous-cutanée en bolus de l'insuline sont soit la traditionnelle seringue avec une aiguille, soit le stylo. Le premier système est flexible, permet d'ajuster facilement la dose et d'effectuer des mélanges de plusieurs préparations pour limiter le nombre d'injections. Le patient ne doit pas présenter de problèmes de vue et savoir effectuer correctement l'administration d'une dose, ce qui n'est pas toujours le cas. Le flacon d'insuline, la seringue et l'aiguille doivent être disponibles immédiatement lorsque l'injection d'insuline s'avère nécessaire et certains patients trouveront donc ce système embarrassant. La seringue n'est quasiment plus utilisée en France. Le stylo, dans lequel on dispose une cartouche, est plus répandu et plus simple à utiliser [92].

Dans la circulation sanguine, l'insuline a une demi-vie de quelques minutes. Par conséquent, le profil d'action d'une préparation d'insuline est déterminé uniquement par ses caractéristiques d'absorption [109].

L'insuline injectée dans le tissu sous-cutané forme un dépôt ou réservoir à partir duquel elle est absorbée. Pour gagner la circulation sanguine, elle doit être présente sous la forme de dimères ou de monomères qui sont les seules entités capables de diffuser dans le liquide interstitiel et de traverser la barrière représentée par les capillaires sanguins. Le délai d'apparition dans la circulation sanguine dépend de la formulation de la préparation d'insuline [110]. En effet, les insulines sont classées, selon leur durée d'action et le type de formulation, en insulines rapides, intermédiaires ou prolongées (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques pharmacocinétiques des préparations d'insuline humaine après injection sous-cutanée [92].

Préparation	Début d'action	Pic d'action	Durée d'action
Rapide	15-60 minutes	2-4 heures	5-8 heures
NPH	2,5-3 heures	5-7 heures	13-16 heures
Lente	2,5-3 heures	7-12 heures	Jusqu'à 18 heures
Ultralente	3-4 heures	8-10 heures	Jusqu'à 20 heures

Les insulines rapides sont utilisées pour reproduire les pics d'insuline postprandiaux. Ces préparations sont habituellement administrées avant un repas ; leur action débute environ 30 minutes après administration et a une durée de 2 à 4 heures [92]. Elles ne sont pas idéales lorsque le patient ne programme pas soigneusement ses injections avant les repas ; des écarts glycémiques postprandiaux peuvent alors survenir. L'insuline rapide est présente à concentration élevée dans le flacon ou la cartouche : elle est donc majoritairement sous la forme d'hexamères qui doivent se dissocier en dimères et monomères ; seuls ces dimères ou monomères pourront alors diffuser dans la circulation sanguine. Le temps nécessaire à cette dissociation explique le délai d'action de ces préparations [110].

Les insulines intermédiaires (NPH, *neutral protamin Hagedorn* ; et Lente) ou prolongées (Ultralente) sont conçues pour reproduire l'insulinémie basale physiologique. Les insulines intermédiaires ou prolongées se présentent sous forme cristalline. L'addition de protamine (NPH) ou de zinc (insuline lente ou ultra-lente) à une solution neutre d'insuline conduit à la formation d'une suspension de cristaux d'insuline [110, 111]. Dans le tissu sous-cutané, les cristaux doivent être déstructurés pour libérer des complexes d'insuline constitués d'hexamères. Les hexamères se dissocient ensuite en dimères et monomères. Du fait de la lenteur plus ou moins importante de ces différentes étapes, l'insuline aura un profil d'action plus ou moins retardé [110]. De plus, le développement de matériels d'injection modernes

(stylos) et l'utilisation d'aiguilles très fines, limitant ainsi la douleur, ont considérablement simplifié et facilité l'injection d'insuline. Cependant, l'insulinothérapie par cette voie reste encore mal perçue par le public [108]. De plus, la variabilité de ce type d'insulinothérapie en constitue un des principaux handicaps. La vitesse de passage de l'insuline dans la circulation sanguine varie d'un patient à l'autre, mais également chez le même patient d'un jour à l'autre [110]. Cette variabilité sera discutée ultérieurement (Chapitre 3. 1). D'autre part, il se produit une dégradation locale dans le dépôt sous-cutané, conduisant à une biodisponibilité inférieure à 100% [108].

Les limites des préparations de l'insuline humaine injectée par voie sous-cutanée ont conduit à modifier sa structure afin d'en améliorer les caractéristiques physico-chimiques.

2.1.2. Perfusion continue sous-cutanée

L'objectif des pompes à insuline est de simuler la sécrétion pancréatique en administrant par perfusion continue de l'insuline dans le tissu sous-cutané. Les premières pompes à insuline ont fait leur apparition à la fin des années 1970. Avec le temps et l'amélioration des technologies ces dispositifs sont devenus plus fiables, plus petits et combinent plusieurs vitesses de perfusion. Les pompes commercialisées actuellement perfusent l'insuline dans le tissu sous-cutané à l'aide d'une petite aiguille à partir d'un réservoir relié à un cathéter [112].

La pompe à insuline a tout d'abord été réservée à des patients très motivés par cette voie d'administration et bien entraînés à son utilisation. De nos jours, ces dispositifs se révèlent particulièrement utiles chez des patients ayant des difficultés à contrôler leur diabète, présentant des épisodes répétés d'acidose métabolique et d'hypoglycémies. Cependant, l'indication de la perfusion continue sous-cutanée, même si elle peut théoriquement être posée pour tout diabétique de type 1, n'apporte pas toujours une amélioration du contrôle glycémique. La diminution initiale de l'HbA_{1C} (signe d'un meilleur contrôle glycémique) est souvent réversible et ne se prolonge pas au-delà de 6 mois à un an pour revenir à la situation antérieure à l'utilisation de la pompe. Des indications bien codifiées et reconnues universellement n'existent pas réellement pour l'utilisation de la pompe à insuline ; elles sont à examiner au cas par cas. Les indications les plus fréquemment retenues sont : un contrôle glycémique inadéquat, les antécédents d'hypoglycémies graves (comas ou ayant nécessité une

assistance), le besoin d'une flexibilité plus importante dans le mode de vie, la grossesse ou le projet de grossesse et des besoins en insuline faibles (< 20 U/jour) [112].

La perfusion continue sous-cutanée améliore l'absorption de l'insuline ; la dose journalière doit donc être réduite de 20 à 30% et divisée en perfusion basale (pour environ 50% de la dose) et perfusion en bolus (pour environ 50% de la dose) [112].

Les principaux avantages de la perfusion continue sous-cutanée sont :

- Un contrôle glycémique amélioré ; la baisse de l'HbA_{1C} (parfois transitoire) est accompagnée d'une variabilité glycémique moindre et d'une glycémie à jeun plus faible. Un facteur important de la variabilité glycémique rencontrée avec les protocoles d'injections multiples est la variabilité régionale d'absorption. La perfusion sous-cutanée ne nécessite qu'un site unique d'injection pour 2 à 3 jours au lieu d'un nouveau site 3 à 4 fois par jour. L'amélioration du contrôle glycémique est associée à une diminution de la fréquence des complications rencontrées au cours du diabète [113, 114].
- Un nombre d'événements hypoglycémiques et hyperglycémiques moins important ; les épisodes hypoglycémiques sévères peuvent être significativement diminués sans réduction du contrôle glycémique. Les hypoglycémies nocturnes notamment sont moins fréquentes : la perfusion continue permet un contrôle glycémique optimisé tout au long de la nuit. De même, les risques d'hyperglycémie à jeun sont diminués [113, 114].
- Une qualité de vie améliorée ; avec notamment une plus grande liberté dans les horaires des repas et des encas. La pompe à insuline permet également de moduler voire d'interrompre la perfusion d'insuline au cours des périodes d'activité physique ou d'exercices [114]. La vitesse de perfusion peut être adaptée et modifiée très rapidement [92].
- Le désagrément engendré par de multiples injections est diminué, même si les injections sont devenues presque indolores [92].

Les principaux désavantages de la perfusion continue sous-cutanée sont :

- Un risque d’acidocétose ; il n’y a pas de dépôt sous-cutané d’insuline au cours de la perfusion sous-cutanée d’insuline. Si le flux d’insuline est interrompu suite à un dysfonctionnement de la pompe, un blocage ou un déplacement du cathéter, une acidocétose peut s’installer très rapidement [92, 113]. Heureusement, la présence d’alarmes de sécurité sur les pompes minimise ce type d’incident.
- Des complications locales telles que des infections sur le site du cathéter ou des dermatites de contact. La complication la plus courante est l’infection bactérienne à *Staphylococcus* ou *Streptococcus spp* [113].
- Une prise de poids ; il s’agit en réalité d’un effet secondaire d’une amélioration du contrôle glycémique très courant, cet effet n’est pas spécifique de la perfusion continue sous-cutanée [113].

2.2. Intra-péritonéale

L’absorption intrapéritonéale de l’insuline est rapide et reproductible [115-117]. Cette résorption est physiologique : l’insuline transite par le système porte et rejoint le foie directement [118].

L’administration intrapéritonéale d’insuline s’effectue soit par une pompe implantable soit par addition d’insuline aux solutions de dialyse chez les patients en dialyse péritonéale [118].

Des adaptations du mode d’utilisation, de la formulation de la solution d’insuline et du matériel ont été initiées et évaluées par le groupe EVADIAC (Evaluation dans le Diabète du Traitement par Implants Actifs) [119-121]. Ces améliorations ont conduit notamment à une diminution des problèmes de reflux et d’obstruction des cathéters [119]. Une formulation adaptée stabilise l’insuline dans le réservoir de la pompe implantée vis-à-vis de la température élevée, de l’agitation mécanique et du contact avec du matériel inerte (titane, silicone, polyéthylène,...) : un surfactant (Genapol[®]) prévient la dénaturation et l’agrégation de l’insuline [118]. En effet, avec une solution d’insuline conventionnelle, sous agitation à 37°C, la dégradation est complète en 5 jours.

Les principaux bénéfices de cette voie d’administration sont une incidence diminuée des hypoglycémies sévères et une plus grande stabilité de la glycémie par rapport à la perfusion continue sous-cutanée chez le patient diabétique de type 1 [122-125]. Le premier

passage hépatique et la résorption par le système porte pourraient expliquer ces avantages [123].

La voie intra-péritonéale est plus antigénique que la perfusion continue sous-cutanée. Cette antigénicité particulière est probablement liée à la voie d'administration ou aux modifications de l'insuline pendant le stockage dans les matériels implantables [126].

2.3. Pulmonaire

Le principe de l'administration pulmonaire d'insuline date de 1925 [106, 127, 128]. Des dizaines d'années plus tard, après administration d'insuline de porc et de bœuf à l'aide d'un nébulisateur, une augmentation de l'insuline immunoréactive a pu être montrée chez des sujets sains et des patients diabétiques [128, 129].

L'arbre respiratoire offre une surface d'échange bien perfusée de plus de 75 m². La surface alvéolaire, qui représente plus de 95% de la zone d'absorption de l'insuline, est délimitée par une monocouche de cellules épithéliales très fine (0,1-0,2 µm) et richement perfusée ; la clairance mucociliaire y est minimale. Ces propriétés sont très favorables à l'administration de l'insuline par cette voie : l'absorption et le début d'action de l'insuline sont rapides [92, 106-108]. Le pic de concentration plasmatique est atteint en 15 à 40 minutes. L'insuline peut donc être administrée par cette voie pour couvrir les besoins au moment des repas (bolus) [128].

Les paramètres à maîtriser parfaitement pour développer des dispositifs permettant une administration par cette voie sont :

- La distribution de la taille des particules émises ; les particules doivent être suffisamment petites pour parvenir jusqu'aux alvéoles pulmonaires mais d'une taille suffisante pour ne pas être exhalées [107].
- Le débit de masse du dispositif (masse de la particule et nombre de particules par volume).

Les principaux avantages de cette voie d'administration sont une résorption rapide et une administration indolore et non invasive [108, 128].

Les principaux désavantages de l'administration pulmonaire de l'insuline sont [106, 128] :

- La nécessité d'une forte dose d'insuline : environ 20 fois celle d'une injection sous-cutanée.
- La production par le patient d'anticorps anti-insuline (les taux sont comparables à ceux de la voie intra-péritonéale).
- Des facteurs incontrôlables : les fumeurs ont besoin de doses plus faibles (augmentation de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire) [130] et les sujets asthmatiques de doses plus importantes (en partie explicable par des modifications du diamètre des voies respiratoires, de la circulation pulmonaire et du flux sanguin) [131].
- Un recul insuffisant pour juger des effets secondaires à long terme sur l'arbre respiratoire.

Au total, cette voie d'administration n'apporte pas d'amélioration de l'efficacité par rapport à la voie sous-cutanée (insulines rapides) mais présente l'avantage d'éviter une injection.

2.4. Orale

La voie orale, pour l'administration d'insuline, est encore aujourd'hui un but pratiquement impossible à atteindre. Peu de temps après la découverte de l'insuline, des essais d'administration par cette voie avaient été déjà tentés en emprisonnant l'insuline dans des capsules ou entre des couches lipidiques [132]. La simplicité de cette voie d'administration n'en serait pas le seul avantage. En effet, une fois absorbée par l'intestin, l'insuline pourrait emprunter la voie physiologique via le système porte et le foie avec un effet direct sur la production hépatique de glucose [108].

Les principaux obstacles à l'administration de l'insuline par voie orale sont [107, 108] :

- La protéolyse de la molécule dans l'estomac (environnement acide) et l'intestin grêle (enzymes digestives).
- L'absence de diffusion ou de mécanismes de transport de l'insuline à travers la paroi intestinale.

- Un transit à travers l'intestin non prévisible risquant d'accélérer ou de ralentir de façon inattendue la résorption.
- Une absorption retardée de l'insuline encapsulée.

Les stratégies employées pour contourner ces obstacles sont une co-administration d'inhibiteurs enzymatiques et/ou de molécules augmentant la perméabilité de la paroi intestinale, des méthodes améliorant la stabilité chimique de l'insuline et une utilisation de systèmes d'administration divers tels que les émulsions ou les liposomes. Malgré ces différents moyens mis en œuvre, moins de 1% de la dose est en général absorbé et aucune de ces approches n'a pour le moment produit de résultats cliniques satisfaisants [107, 108].

Chapitre 3 : Analogues de l'insuline

1. Introduction : limites de l'insuline humaine recombinante

Les études DCCT [86] et UKPDS [87] ont confirmé le lien entre mauvais contrôle glycémique et survenue de complications du diabète de type 1 et de type 2, respectivement [133]. L'insulinothérapie idéale permettrait d'obtenir une normoglycémie identique à celle qui est assurée par la sécrétion endogène d'insuline chez le sujet sain. Cette sécrétion, comme nous l'avons vu précédemment, est composée d'une composante basale et d'une composante prandiale. L'insuline basale régule la lipolyse et la production hépatique de glucose [134]. L'insuline basale idéale présenterait donc un profil plat (absence de pic) sans nécessité de multiplier les injections [106, 133]. L'insuline prandiale se décompose en deux phases : la première phase est caractérisée par une sécrétion importante sous forme d'un pic et la seconde phase est plus prolongée dans la circulation portale [134]. La préparation permettant de couvrir les besoins insuliniques liés à la prise alimentaire devrait avoir un début d'action ultra-rapide afin de réduire la glycémie postprandiale et une élimination rapide de façon à éviter les hypoglycémies entre les repas [133]. Une insulinothérapie optimale devrait avant tout être reproductible d'un jour à l'autre chez le même patient.

Les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des insulines standards (préparations à base d'insuline humaine recombinante de durée d'action brève, intermédiaire ou prolongée) rendent quasiment impossible toute tentative d'obtenir une normoglycémie soutenue. En effet, lorsque l'HbA_{1C} tend vers des valeurs normales avec ces préparations, les hypoglycémies deviennent trop fréquentes. L'insulinothérapie à base d'insuline humaine recombinante ne permet pas de mimer de façon précise les différentes phases de sécrétion (basale et prandiale) décrites ci-dessus mais y répond globalement ; des molécules imitant précisément chaque composante sont nécessaires pour éviter l'apparition d'hypoglycémies. Or, avant l'apparition des analogues de l'insuline, les améliorations des formulations d'insuline étaient sérieusement limitées : les progrès qui avaient alors été faits se limitaient à la pureté de la préparation, l'utilisation d'insuline humaine recombinante plutôt

que des préparations à base d'insuline animale et quelques modifications des caractéristiques des agents retardateurs [133, 134].

Les principaux problèmes de l'insuline humaine auxquels les analogues ont essayé de répondre sont, par ordre chronologique :

– La stabilité

L'insuline n'est pas une entité chimique stable et une série de modifications de sa structure primaire (conduisant à des dérivés de l'insuline) affecte la molécule pendant la manipulation, le stockage prolongé et l'utilisation. La décomposition de l'insuline est principalement due à deux catégories de réactions chimiques : l'hydrolyse et la formation de dimères d'insuline par liaison covalente. La réaction principale d'hydrolyse est une désamidation du résidu Asn^{B3} ; elle est non négligeable à température ambiante mais ne modifie que très peu l'activité biologique et les propriétés immunologiques de la molécule. A l'inverse, la formation de dimères par liaison covalente est quantitativement moins importante mais elle réduit l'activité biologique. Ces agrégats covalents produiraient des effets secondaires immunologiques [135-138].

– L'absorption trop lente des insulines humaines à action brève

L'insuline humaine après injection sous-cutanée est présente dans le dépôt à forte concentration, donc sous forme d'hexamères. Les hexamères ne traversent pas la paroi des capillaires, la résorption de l'insuline à partir du dépôt sous-cutané est retardée et prolongée avec une grande variabilité inter- comme intra-individuelle. Les préparations d'insuline humaine à action brève doivent donc être injectées 30 minutes avant les repas pour respecter ce délai d'absorption afin d'éviter une hyperglycémie postprandiale. Le délai d'injection avant la prise du repas est une contrainte rarement respectée puisque certaines études indiquent que 75% des patients n'attendent pas les 30 minutes nécessaires après injection pour débiter leur repas [85, 139].

– L'élimination trop lente des insulines humaines à action brève

Après une prise alimentaire, la première phase de sécrétion d'insuline sous forme d'un pic laisse la place à une seconde phase de sécrétion plus prolongée décrite ci-dessus [134]. Même lorsque l'insuline est injectée avant le repas avec un délai adapté, l'insulinémie reste élevée jusqu'à 8 heures après l'injection, ce qui augmente le risque de survenue d'hypoglycémie postprandiale et nécessite fréquemment un apport alimentaire supplémentaire (« grignotage ») 3 à 4 heures après le repas. La conséquence est une prise de poids indésirable [85].

- La durée d'action trop brève des insulines intermédiaires et prolongées

Pour éviter de multiples injections, les tentatives soit pour prolonger l'action de l'insuline humaine soit pour ralentir sa résorption ont été nombreuses. Les premières substances utilisées ont été la gomme arabique (1923), la lécithine (1923) et des suspensions huileuses (1925). Ces essais furent infructueux du fait d'une faible stabilité et d'effets secondaires au site d'injection. L'insuline protamine et les insulines lentes (obtenues par ajout de zinc à la préparation) ont été introduites entre les années 1930 et 1950 [140]. Même l'insuline Ultralente, insuline humaine d'action prolongée, présente une action non prévisible ne couvrant pas la durée d'action idéale de 24 heures [141].

- La présence d'un pic plasmatique d'insulinémie des insulines intermédiaires et prolongées

Le profil d'action des préparations d'insuline humaine intermédiaire et prolongée est également caractérisé par un pic prononcé entre 4 et 8 heures après injection suivi d'une diminution d'insulinémie. Ceci expose les patients à un risque d'hypoglycémie, en particulier nocturne lorsque l'insuline est administrée le soir [141, 142]. La diminution d'insulinémie qui fait suite au pic de concentration peut provoquer tôt le matin des hyperglycémies à jeun attribuables à des causes multiples [141].

La première cause, n'expliquant pas entièrement cette manifestation, est l'effet Somogyi ou hyperglycémie réactive post-hypoglycémie. L'hypoglycémie induite par le pic insulinaire provoque la libération d'hormones de contre-régulation qui à leur tour favorisent

une hyperglycémie. L'utilisation d'une insuline prolongée ne présentant pas de pic permettrait de limiter ce phénomène [143].

La seconde explication à ces hyperglycémies matinales est la diminution de l'insulinémie entraînant une hyperglycémie. Là encore, l'utilisation d'une préparation insulinique prolongée permettrait d'éviter ce phénomène [143].

Enfin, le « phénomène de l'aube » consiste en une augmentation à la fois des besoins en insuline et de la concentration plasmatique de glucose ; il peut se produire chez le patient diabétique en l'absence d'hypoglycémie le précédant et d'une diminution des concentrations d'insuline. Il survient entre 4h et 8h le matin. Le mécanisme pathologique sous-jacent le plus probable est un dysfonctionnement de la sensibilité à l'insuline, dans le foie et dans les muscles, impliquant l'hormone de croissance. Les mécanismes biochimiques impliqués exacts ne sont pas connus. Là encore, un contrôle glycémique plus strict peut prévenir cette hyperglycémie notamment par la mise en place d'une pompe à insuline [143].

– Une variabilité trop importante

L'un des plus grands défauts des préparations à base d'insuline humaine est la très grande variabilité inter- mais surtout intra-individuelle de l'absorption sous-cutanée [142, 144, 145].

La variabilité intra-individuelle des paramètres pharmacocinétiques a été étudiée par de nombreux auteurs. Elle est d'environ 20% dans des conditions expérimentales strictes (injections sous-cutanées par le même opérateur 3 jours consécutifs au même site avec un examen de la nature de l'injection et de sa profondeur) [110, 111, 146]. Dans des conditions moins strictes, le coefficient de variation des paramètres pharmacodynamiques est plus élevé : 20 à 40% pour l'insuline NPH et 38 à 55% pour l'insuline Ultralente. La variabilité peut être plus importante encore dans la pratique clinique.

La variabilité de l'action de l'insuline est induite par différents facteurs : certains dépendent directement de la préparation d'insuline, certains dépendent des conditions d'injection (profondeur, site anatomique, délai avant le retrait de la seringue et flux sanguin sous-cutané) et d'autres de l'organisme sur lequel l'injection est pratiquée. Notamment, l'utilisation d'insuline cristallisée (NPH, zinc) nécessite une remise en suspension avant

injection [110, 147]. Jusqu'à un tiers des patients n'agissent pas convenablement la cartouche avant injection conduisant à une variation d'environ 20% de la concentration d'insuline dans la cartouche. Les patients qui ne prennent pas cette précaution présentent une fréquence d'hypoglycémies plus élevée lorsqu'ils changent de cartouches et vice versa [110].

La variabilité est également observée avec l'insuline humaine rapide : le délai entre l'injection et l'effet hypoglycémiant est une source de variabilité intra-individuelle d'au moins 20% d'un jour à l'autre [110, 111].

Les conséquences les plus dramatiques de cette variabilité sont d'une part une diminution de la qualité de vie du patient et d'autre part une moins bonne observance du traitement [110, 148]. L'incompréhension de ce phénomène par certains patients entraîne une méfiance envers les recommandations du diabétologue. Les complications dégénératives du diabète semblent également être favorisées par cette variabilité entraînant une succession d'hypo- et d'hyperglycémies [110].

– Une activité non sélective

Parmi les différentes actions de l'insuline, l'effet hépatique (inhibition de la production de glucose et stimulation de sa capture périphérique) tient une place particulière en physiologie : après sa synthèse par le pancréas, l'insuline est déversée dans le système porte à des concentrations beaucoup plus importantes que dans les autres tissus cibles. Le traitement par insuline humaine recombinante sous-cutanée ne permet pas de reproduire ce gradient de concentration entre tissu hépatique et autres tissus cibles [149].

Les principales modifications chimiques apportées à l'insuline de séquence humaine pour en faire des analogues sont des mutations dans sa séquence par la technique de l'ADN recombinant et des hémisynthèses chimiques, par exemple la greffe de divers groupements chimiques sur les acides aminés.

2. Relations structure-activité

2.1. Interaction de l'insuline avec son récepteur

La connaissance du domaine de liaison de l'insuline à son récepteur provient essentiellement du travail du groupe de Hodgkin qui a conduit à l'élucidation de la structure cristalline tridimensionnelle de l'insuline de porc par diffraction des rayons X [44, 45, 150]. Les données de cette époque montrent qu'un certain nombre d'acides aminés largement conservés au cours de l'évolution des vertébrés sont probablement impliqués dans la liaison de l'insuline à son récepteur : Gly^{A1}, Gln^{A5}, Tyr^{A19}, Asn^{A21}, Val^{B12}, Tyr^{B16}, Gly^{B23}, Phe^{B24}, Phe^{B25} et Tyr^{B26} (que l'on appellera « domaine de liaison traditionnel ») [40].

La transition entre les conformations T → R de l'insuline est accompagnée d'un mouvement concomitant de la partie C-terminale de la chaîne B. En effet, la flexibilité de l'insuline est particulièrement prononcée aux extrémités N- et C-terminales de la chaîne B. La flexibilité de l'extrémité C-terminale est cruciale pour la liaison au récepteur, comme cela a pu être montré par la perte d'activité de l'insuline simple chaîne synthétisée avec une liaison peptidique entre B29 et A1. Cette insuline monocaténaire est pourtant capable d'adopter les conformations T et R et de s'auto-associer comme l'insuline [151, 152]. La conformation active permettant la liaison de l'insuline à son récepteur nécessite une séparation de l'extrémité C-terminale de la chaîne B et de l'extrémité N-terminale de la chaîne A. Ainsi, des résidus inaccessibles tels que Ile^{A2} et Val^{A3} sont démasqués [153]. Toute modification de conformation à l'extrémité C-terminale de la chaîne B peut donc faire évoluer l'affinité de la molécule pour son récepteur [152].

Une approche alternative pour l'identification du domaine de liaison au récepteur a été proposée par Kristensen *et coll.* qui ont utilisé la mutagenèse systématique avec l'alanine pour identifier les chaînes latérales spécifiques des acides aminés influençant la liaison au récepteur [154]. Des analogues de l'insuline humaine ont été préparés : pour chaque analogue, un acide aminé différent est remplacé par l'alanine. L'hypothèse de départ est la suivante : si la substitution d'un résidu particulier ne modifie pas la liaison au récepteur alors la région de l'insuline dans laquelle se situe le résidu testé n'appartient pas au domaine de liaison au récepteur. La substitution de Leu^{B6}, Gly^{B23}, Phe^{B24}, Ile^{A2}, Val^{A3} et Tyr^{A19} par l'alanine diminue plus de 20 fois l'affinité de liaison. Au contraire, les substitutions de Tyr^{B16}, Tyr^{B26}, Glu^{A4},

Gln^{A5} et Asn^{A21}, résidus auparavant considérés comme appartenant à la surface de liaison, ont des effets relativement mineurs (< 3 fois) sur l'affinité de liaison. Les substitutions de Leu^{B11}, Glu^{B13} et Phe^{B25} diminuent l'affinité d'un facteur 10. Par contre, le remplacement de Gly^{B20}, Glu^{B21} et Arg^{B22}, dans la région du retournement β , par l'alanine produit des analogues avec une affinité de liaison augmentée d'un facteur 2 à 4. Ces données ont suggéré un modèle alternatif dans lequel le domaine de liaison au récepteur est constitué de 5 résidus (Ile^{A2}, Val^{A3}, Tyr^{A19}, Gly^{B23} et Phe^{B24}) formant une zone à la surface de la molécule. Les résidus Leu^{B6}, Gly^{B8}, Leu^{B11}, Glu^{B13} et Phe^{B25}, bien que ne faisant pas partie du domaine de liaison lui-même, sont considérés comme importants pour maintenir une conformation d'ensemble nécessaire à la liaison avec le récepteur [153, 154].

Certains analogues de l'insuline humaine substitués aux positions A13 et B17 présentent des propriétés de liaison anormales au récepteur de l'insuline humaine solubilisé [153]. Schäffer a proposé l'existence d'un second domaine de liaison au récepteur qui comprend ces acides aminés (site 2) en plus du « domaine de liaison traditionnel » (site 1) [155]. Les résidus leucine en A13 et B17 sont localisés dans la surface formant l'hexamère à la face opposée du site 1 dans le monomère. Chacune des sous-unité α du récepteur de l'insuline a également 2 sites de liaison (site 1 et site 2 ; Figure 5). Pour obtenir une liaison de forte affinité, une molécule d'insuline forme un pont entre deux sous-unités α du même récepteur avec le site 1 de l'insuline monomère lié au site 1 d'une sous-unité α et le site 2 du même monomère lié au site 2 du récepteur dans l'autre sous-unité α (Figure 5) [153, 155].

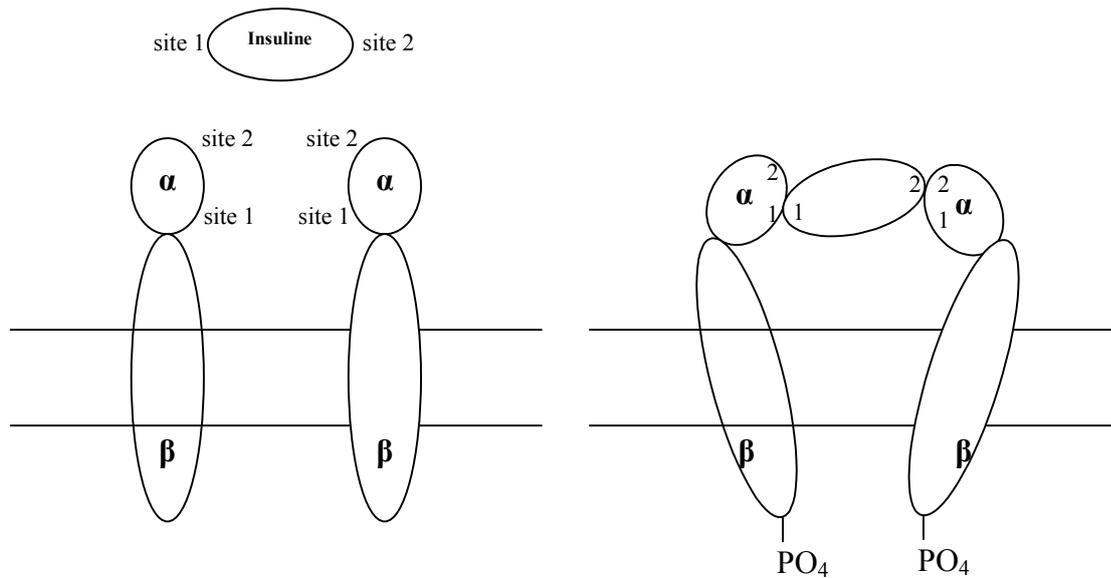


Figure 5 : Représentation schématique de la liaison de forte affinité de l'insuline avec son récepteur illustrant la présence de deux domaines de liaison au récepteur sur l'insuline (site 1, site 2) et de deux sites de liaison du ligand sur chaque sous-unité α du récepteur (site 1, site 2) [153].

Une autre approche consiste à comparer les acides aminés conservés au cours de l'évolution en supposant que ceux-ci correspondent aux acides aminés du site de liaison au récepteur. Les résidus acides aminés qui constituent le « domaine de liaison traditionnel » basé sur la structure cristalline de l'insuline ont été bien conservés. Les résidus Gly^{A1}, Ile^{A2}, Val^{A3}, Tyr^{A19}, Val^{B12}, Gly^{B23} et Phe^{B24} sont des invariants mais des substitutions sur d'autres sites peuvent modifier de façon appréciable les propriétés de liaison du ligand. Les données de cette approche confortent les conclusions des expériences de mutagenèse avec l'alanine : Tyr^{B16}, Tyr^{B26}, Glu^{A4}, Gln^{A5} et Asn^{A21} n'appartiennent pas au domaine de liaison au récepteur. L'hypothèse de la formation d'un second domaine de liaison au récepteur (Leu^{A13} et Leu^{B17}) est plutôt renforcée par l'étude de la conservation de ces résidus à travers l'évolution des vertébrés [153].

Les potentiels métabolique et mitogène de l'insuline humaine et de 6 de ses analogues ont été comparés par Hansen *et coll.* [156]. Le potentiel métabolique est estimé par le transport de 3-O-méthylglucose dans les hépatocytes de rats et le potentiel mitogène par l'incorporation de thymidine dans l'ADN de cellules CHO (*Chinese hamster ovary*) [156]. Plusieurs des analogues testés présentent un rapport potentiel mitogène / potentiel métabolique inversement corrélé, de façon exponentielle, à la constante de dissociation (K_d) de la liaison de l'analogue au récepteur de l'insuline (Tableau 2). En d'autres termes, les

analogues se dissociant très lentement du récepteur de l'insuline montrent une augmentation disproportionnée de l'activité mitogène par rapport à l'activité métabolique. C'est en particulier le cas de l'analogue X10 ou Asp(B10), non développé cliniquement notamment pour ces raisons. Une durée prolongée du signal de l'insuline au niveau du récepteur semble déplacer le profil d'activité vers des effets mitogènes [156].

Tableau 2 : Potentiels mitogène et métabolique relatifs (DE50, Doses efficaces 50 potentiel mitogène / transport du glucose) et constantes de dissociation de 6 analogues de l'insuline [156].

Analogue	Substitutions	Rapport DE ₅₀	K _d relatif (%)
Insuline	-	1	100
X2	Asp ^{B9} , Glu ^{B27}	1,3	139
X14	Asp ^{B28}	0,9	81
X8	His ^{A8}	1,1	39
X97	Glu ^{B10} , des Thr ^{B30}	2,1	24
X10	Asp^{B10}	2,9	14
H2	His ^{A8} , His ^{B4} , Glu ^{B10} , His ^{B27}	6,8	1,5

2.2. Interaction de l'insuline avec le récepteur à l'IGF-1

La partie C terminale de la chaîne B de l'insuline est impliquée dans la liaison de l'insuline au récepteur IGF-1 [157]. Des études avec une série d'analogues indiquent que l'affinité de l'insuline pour le récepteur de l'IGF-1 est modifiée par la substitution d'acides aminés aux positions B28-B32 [158]. En particulier, le nombre et la position de résidus basiques dans cette région sont importants pour la liaison au récepteur de l'IGF-1.

2.3. Modifications de l'insuline affectant sa stabilité

Dans les solutions pharmaceutiques, l'insuline est sujette à des modifications chimiques et physiques. Un certain nombre de facteurs tels que le pH, l'état physique, les agents bactériostatiques, la présence de substances isotoniques, les agents stabilisateurs, la protamine et les ions zinc dans la formulation pharmaceutique affectent sa stabilité. Les dégradations chimiques et physiques se produisent même dans des conditions optimales, résultant en la formation d'agrégats insolubles pendant le stockage et l'utilisation [152].

La question de la stabilité de l'insuline en solution a été étudiée en détail, puisqu'elle détermine les conditions de stockage et de manipulation des préparations pharmaceutiques. C'est également un facteur contributif de la variabilité intra- et inter-individuelle.

L'agrégation covalente de l'insuline lyophilisée se produit via la formation d'échanges de liaisons disulfure intermoléculaires et est directement proportionnelle à la température, le contenu en eau et l'alcalinité [152, 159]. L'insuline Asp^{B10} est l'un des premiers analogues de l'insuline ayant une stabilité accrue.

Un mécanisme prédominant de la dégradation chimique de l'insuline est la désamidation des résidus asparagine. En effet, les mutants Gln^{B3} et Ala^{A21}/Gly^{A21} présentent une stabilité chimique accrue [152].

L'agrégation, conduisant à la formation de fibrilles amyloïdes à l'origine d'une turbidité du milieu, est une autre source de dégradation des solutions d'insuline *in vitro*. La formation amyloïde est favorisée par les températures élevées, un pH bas et une concentration protéique millimolaire. La flexibilité de l'extrémité C-terminale de la chaîne B est un facteur important influençant l'agrégation. Le remplacement de cette partie de la chaîne B conduit à une monomérisation qui démasque des résidus hydrophobes cachés, provoquant la formation d'un noyau critique et la formation consécutive de fibrilles. La stabilisation de l'hexamère d'insuline et l'addition de surfactants pour bloquer les interactions hydrophobes ont été proposées pour bloquer cette formation de fibrilles *in vitro*. Cette piste est explorée pour le développement d'analogues formant des dimères et hexamères stables. Malgré un grand nombre d'études, le mécanisme sous-jacent à la formation de fibrilles et les mesures préventives nécessaires ne sont pas clairement établis [152].

2.4. Modifications de l'insuline affectant la formation de dimères et hexamères

Des études ont montré qu'il est possible de modifier certains résidus acides aminés de l'insuline impliqués dans les surfaces à l'origine de la formation de dimères et hexamères, sans altérer la liaison de la molécule au récepteur [160].

L'association de monomères de l'insuline en dimères et hexamères est un équilibre complexe, dynamique, dépendant du pH, de la force ionique et de la concentration en insuline [160].

Dans toutes les structures cristallines de l'insuline native, la région C-terminale B24-B26 s'enveloppe contre la surface hydrophobe équivalente d'un second monomère en une conformation de feuillet β anti-parallèle et contribue fortement à la stabilisation de l'interface du dimère. Les chaînes latérales non polaires de cette région sont masquées du fait de la

formation de dimères. Ainsi, l'association de deux monomères ramène le résidu Pro^{B28} à proximité des résidus B20-B24. Quatre liaisons hydrogène impliquant les résidus B24 et B26 stabilisent le dimère. L'ablation de la région B26-B30 empêche l'association des monomères d'insuline en dimères et hexamères. Des mutations de résidus particuliers à l'extrémité C-terminale de la chaîne B sont capables de modifier les propriétés d'association de l'insuline [152, 160].

Des études de modélisation moléculaire, notamment par comparaison avec l'IGF-1, ont identifié Pro^{B28} comme l'un des résidus clés associé à la formation de dimères et dont la modification n'affecte pas la liaison au récepteur. Malgré une grande similitude structurelle de l'IGF-1 avec l'insuline, l'IGF-1 présente une moindre auto-association. Une modélisation tenant compte de l'homologie entre insuline et IGF-1 a conduit à la synthèse de l'analogue lispro par inversion des acides aminés Pro^{B28}-Lys^{B29} [152].

Les 3 dimères d'insuline assemblés en hexamère autour de deux ions zinc forment une structure protéique globulaire soluble. La conformation des molécules d'insuline en hexamère peut adopter deux états différents, connus comme conformations T et R qui font respectivement référence à une conformation étendue et α -hélicoïdale des 8 premiers résidus N-terminaux de la chaîne B [160]. Les principales conformations de l'extrémité C-terminale de la chaîne B, à savoir T et R, ont été observées dans les structures cristallines de l'insuline [152]. Les dérivés phénoliques et les anions (exemple, chlorures) induisent un passage d'une conformation T à une conformation R par des interactions à l'interface dimère-dimère stabilisant les hélices α B1-B8 ; ceci augmente spectaculairement la stabilité cinétique des hexamères de l'insuline [152, 160, 161]. L'hexamère dans la conformation R a une tendance moindre à la dissociation que l'hexamère dans la conformation T : le positionnement des hélices α B1-B8 restreint la diffusion de l'ion zinc hors de l'hexamère [160, 162]. La demi-vie cinétique des hexamères est de 30 secondes dans les conditions T₆ et peut aller jusqu'à 3,4 jours dans les conditions R₆, auxquelles on parvient en augmentant la concentration de phénol. La liaison du phénol et des anions resserre également les structures hexamériques tertiaires et quaternaires. Rahuel-Clermont *et coll.* [163] ont montré que la conformation R₆ induite par l'ion chlorure et le résorcinol est plus stable d'un facteur 1,5 million que les unités T₃ dans T₃R₃ ou T₆ et plus stable d'un facteur de plus de 70 000 que l'unité R₃ dans T₃R₃ [152].

3. Les principaux analogues

La Figure 6 représente la structure primaire des analogues de l'insuline commercialisés en France.



PRINCIPAUX ANALOGUES DE L'INSULINE

lispro	B28 Lys, B29 Pro
asparte	B28 Asp
glulisine	B3 Lys, B29 Glu
glargine	A21 Gly, B31 Arg, B32 Arg
<i>métabolite M1</i>	A21 Gly
<i>métabolite M2</i>	A21 Gly, des B30
détémir	B29 tetradecanoyllsyl, des B30

Figure 6 : Principaux analogues commercialisés de l'insuline humaine.

3.1. Asp(B10)

En essayant d'élucider les bases génétiques d'un cas familial d'hyperproinsulinémie (mutation en un seul point du gène de la proinsuline correspondant à une substitution d'une His en position B10 dans l'insuline par l'Asp), Schwartz *et coll.* [164] ont développé le premier analogue rapide de l'insuline : l'analogue Asp(B10). La chaîne latérale du résidu His^{B10} de l'insuline est impliquée dans la liaison avec le zinc conduisant à la formation et à la stabilisation de l'hexamère d'insuline. La substitution de His^{B10} par Asp^{B10} détermine une absorption deux fois plus rapide que celle de l'insuline humaine. Cet analogue présentait donc un intérêt clinique potentiel [149, 152].

Différentes études ont montré un changement de la structure tridimensionnelle de la molécule à l'origine d'une interaction modifiée avec le récepteur de l'insuline et le récepteur de l'IGF-1 [149]. D'autre part le temps de résidence dans les cellules de l'analogue Asp(B10)

est augmenté. L'affinité de l'analogue Asp(B10) pour le récepteur de l'insuline est également augmentée : sa liaison au récepteur est prolongée et sa dissociation diminuée [165, 166]. L'internalisation de cet analogue, dépendant de cette même liaison, est de ce fait favorisée sans augmentation concomitante de la dégradation intracellulaire par l'IDE [156, 165, 167]. La conséquence est une rétention cellulaire de cet analogue biologiquement actif. Ces propriétés, qui se traduisent par un effet métabolique approximativement 10 fois plus puissant que celui de l'insuline humaine, auraient pu se révéler comme un avantage potentiel [149, 166]. Cependant, des études chez l'animal ont mis en évidence, notamment chez le rat avec des doses supra-pharmacologiques, une augmentation de l'incidence des adénocarcinomes [167, 168]. Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer l'activité mitogène de cet analogue, notamment l'affinité accrue de cet analogue pour le récepteur de l'insuline et également pour le récepteur de l'IGF-1 et une stimulation prolongée des cellules due à une dégradation intracellulaire et une clairance diminuées [156, 165]. En effet, l'augmentation de l'affinité pour le récepteur de l'IGF-1 de cet analogue par rapport à l'insuline humaine ne peut expliquer à lui seul l'effet biologique observé : d'une part, l'analogue lispro, qui a une affinité pour le récepteur à l'IGF-1 comparable à celle de l'analogue Asp(B10) (0,2% et 0,3% de l'affinité de l'IGF-1, respectivement), n'a pas de propriétés mitogènes comparables, et, d'autre part, Hamel *et coll.* [165] ont montré un effet mitogène significativement plus important de cet analogue dans des cellules dont la concentration en récepteur de l'IGF-1 était indétectable. Les cinétiques des effets d'une activation du récepteur à l'insuline sur le métabolisme et la croissance sont très différentes (cf. Chapitre 1, 8). Alors que les effets sur le glucose débutent dans les secondes qui suivent l'exposition de la cellule à l'insuline en culture, il faut attendre des heures, pendant lesquelles l'insuline interagit avec son récepteur, pour obtenir des effets sur la croissance cellulaire. Le temps de résidence cellulaire prolongé de l'analogue Asp(B10) pourrait donc expliquer en partie son effet mitogène [165].

Les études cliniques de l'analogue Asp(B10) ont donc été interrompues [149]. Depuis, l'activité mitogène est un critère testé systématiquement sur les nouveaux analogues de l'insuline [152].

3.2. Lispro

La région B26-B30 de la molécule d'insuline n'est pas déterminante pour sa liaison au récepteur de l'insuline [133]. Cependant, elle est essentielle à la formation de dimères [44].

Des modifications structurales de la molécule d'insuline ont été effectuées sur ces résidus dans l'espoir de générer des analogues de l'insuline ayant une tendance moindre à l'auto-association sans toutefois affaiblir l'affinité de la molécule pour le récepteur de l'insuline [158].

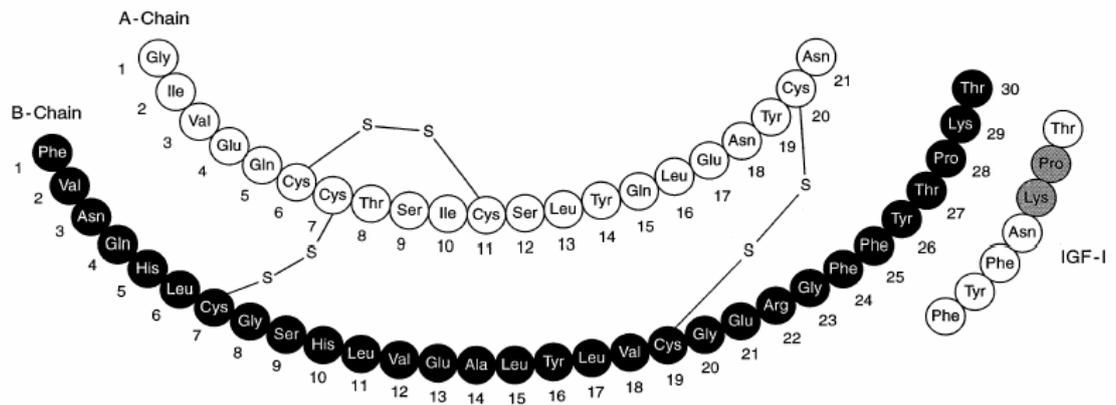


Figure 7 : Structure primaire de l'insuline humaine et d'une partie de la séquence homologue de l'IGF 1 correspondant à la portion B25-30 de l'insuline [158].

L'IGF-1, qui présente une forte homologie avec l'insuline particulièrement dans la région C-terminale de la chaîne B (Figure 7), n'est pas capable de former des dimères. Approximativement 50% des résidus acides aminés des domaines A et B de l'IGF-1 sont identiques à ceux des chaînes A et B de l'insuline, avec un maintien des ponts disulfure caractéristiques de la superfamille de l'insuline. La séquence normale de l'insuline humaine aux positions B28 et B29 est Pro-Lys ; elle est inversée dans l'IGF-1 (Lys-Pro) [169]. L'hypothèse suivante a été formulée : si la séquence Lys-Pro rend l'IGF-1 incapable d'auto-association, l'inversion de la séquence Pro^{B28}-Lys^{B29} dans l'insuline pourrait générer un analogue de l'insuline également incapable de former des dimères [170]. Cette modification conduit à une élimination du contact existant entre monomères au niveau des acides aminés B28 et B23 (due à une perte des interactions hydrophobes) et réduit la force des deux liaisons hydrogène entre les feuillets β (influençant la stabilisation des dimères au sein des hexamères d'insuline) [85]. La relation structure-activité a été étudiée dans cette région en déplaçant la proline en position B29 avec une substitution systématique par des acides aminés naturels et

synthétiques en position B28 [158, 171]. Parmi la cinquantaine d'analogues testés, l'analogue de départ (insuline Lys^{B28}, Pro^{B29} ou insuline lispro) a été sélectionné sur les critères suivants : (1) des caractéristiques d'auto-association fortement diminuées ; (2) une puissance hypoglycémique identique à celle de l'insuline humaine *in vivo* ; (3) une action rapide avec une durée d'action brève à la fois chez le chien et le cochon ; et (4) une modification structurelle modelée sur une hormone naturelle (l'IGF-1) [169]. L'insuline lispro a été le premier analogue commercialisé en 1996.

Alors que l'insuline lispro a plutôt tendance à rester sous forme de monomères, elle peut être cristallisée en présence de ligands phénoliques et de zinc sous la forme d'un complexe hexamérique, lui conférant une certaine stabilité dans la formulation pharmaceutique concentrée [152, 172-174]. Les modifications conformationnelles décrites ci-dessus dans l'insuline lispro induisent une déformation de la région B20-B23 dans le monomère adjacent, particulièrement dans le trimère R₃. La flexibilité de la partie N-terminale de la chaîne B est également augmentée dans l'insuline lispro par rapport à l'hexamère T₃R₃ de l'insuline humaine. L'insuline lispro cristallise sous la forme d'un hexamère T₃R₃ moins stable avec seulement 3 molécules de phénol au lieu de 6 molécules de phénol pour l'insuline qui cristallise sous la forme d'un hexamère R₆. Les interactions hydrophobes stabilisant les hexamères d'insuline lispro sont fragilisées. Après injection sous-cutanée, l'excès de phénol lié est rapidement absorbé par les tissus environnants à partir des hexamères. La perte des molécules de phénol est couplée à une transition R→T provoquant la déstabilisation de l'hexamère pour se dissocier rapidement en dimères et monomères. De plus, une étude comparative des interactions entre hexamères a montré que l'insuline lispro présente des énergies de liaison inter-hexamère plus faibles que l'insuline [152]. Contrairement aux analogues purement monomériques, l'insuline lispro se présente en solution sous forme d'hexamères, mais leur dissociation s'effectue de façon quasi-instantanée après injection sous-cutanée [175].

D'un point de vue biochimique, la liaison de l'insuline lispro au récepteur de l'IGF-1 est légèrement accrue, mais aucune modification de la durée de dissociation des récepteurs de l'insuline n'a pu être mise en évidence [85, 157]. L'insuline lispro a un faible potentiel mitogène lorsqu'elle est étudiée sur une lignée cellulaire d'ostéosarcome humain [157], et contrairement à l'analogue Asp(B10), la prise en charge cellulaire de l'insuline lispro est pratiquement identique à celle de l'insuline humaine [165]. Des études chez l'animal, notamment chez le rat, portant sur la reproduction et le développement, n'ont pas révélé

d'événements secondaires indésirables exceptés ceux liés à l'effet hypoglycémiant de l'analogue [176].

Le profil d'action de l'insuline lispro est parfaitement superposable à celui d'une insuline monomérique pure. D'un point de vue pharmacocinétique, l'injection sous-cutanée de lispro permet l'obtention d'un pic plasmatique deux fois plus élevé en deux fois moins de temps qu'une injection équivalente d'insuline humaine [175]. L'insuline lispro agit dans les 15 minutes après son injection, forme un pic en une heure environ et disparaît dans les 2 à 4 heures après injection sous-cutanée (Figure 8) [177, 178].

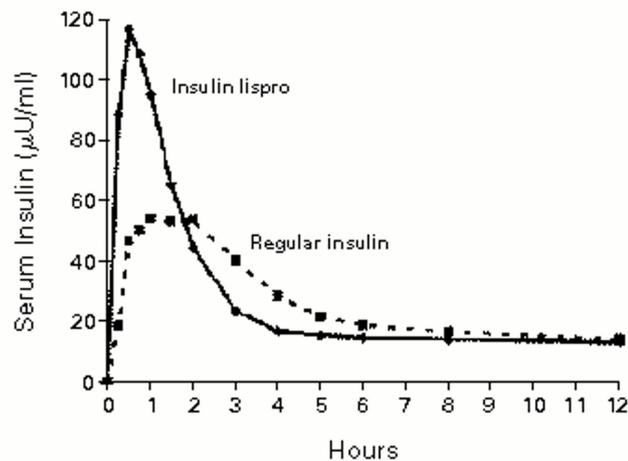


Figure 8 : Effets de l'administration sous-cutanée de l'insuline humaine et de l'insuline lispro sur les concentrations sériques d'insuline chez 10 sujets normaux [176].

La durée nécessaire pour atteindre le pic plasmatique après une injection sous-cutanée d'insuline lispro est indépendante de la dose, alors qu'avec l'insuline humaine, elle augmente avec la dose [176, 179].

Des études cliniques ont confirmé les avantages potentiels d'un analogue d'action rapide : des améliorations significatives de la glycémie post-prandiale avec une fréquence plus faible d'événements hypoglycémiques par rapport à l'insuline humaine [180-182]. De plus, l'insuline lispro peut être administrée immédiatement avant le repas sans attendre, comme c'est le cas pour l'insuline humaine, 30 à 45 minutes [149]. L'insuline lispro est utilisable pendant la grossesse [183, 184].

Le profil immunogène de l'insuline lispro est identique à celui de l'insuline humaine recombinante. Avant tout traitement par insuline lispro, une augmentation de la réactivité croisée des anticorps (le sérum du patient réagit à la fois avec l'insuline lispro et l'insuline humaine) est retrouvée sans évolution des taux d'anticorps spécifiques de l'insuline humaine ou spécifiques de l'insuline lispro. Le taux de ces anticorps diminue avec le temps et est sans conséquence clinique [185, 186].

L'insuline lispro est couramment utilisée dans les pompes pour perfusion continue sous-cutanée [187-191]. Cette voie d'administration, pour un analogue rapide tel que l'insuline lispro avec une clairance rapide, faisait redouter la survenue encore plus rapide d'une acidocétose en cas d'occlusion de cathéter ou de dysfonctionnement de la pompe [192]. Ces craintes n'ont pas été confirmées au cours d'une étude qui n'a pas mis en évidence de différence de rapidité d'augmentation des concentrations plasmatiques de glucose et de corps cétoniques après interruption de la perfusion entre deux groupes de patients : l'un recevant de l'insuline lispro et l'autre de l'insuline humaine [193].

Une formulation d'insuline lispro intermédiaire a été développée par addition de protamine : la « *neutral protamine lispro* » est disponible soit seule soit en prémélanges avec une proportion fixe d'insuline lispro (*neutral protamine lispro*/lispro : 25/75 et 50/50) [133].

3.3. Aspartate

L'insuline aspartate résulte de la substitution du résidu Pro^{B28} par un acide aspartique dans la molécule d'insuline [128]. Les insulines lispro et aspartate ont de très nombreuses propriétés physico-chimiques, biologiques, pharmacocinétiques et pharmacodynamiques en commun. Comme pour l'insuline lispro, les interactions entre les résidus B23 (Gly) d'un monomère et B28 (Asp) d'un autre monomère sont diminuées. L'introduction d'un groupement carboxyle dans la chaîne B, et donc d'une charge négative dans les conditions physiologiques, réduit encore la formation d'agrégats [85, 169, 194].

L'insuline aspartate cristallise en présence de phénol ou de *m*-crésol. En présence de phénol, l'hexamère d'insuline aspartate lie 9 molécules de phénol et adopte une conformation R₆ avec une augmentation de la flexibilité de l'extrémité C-terminale de la chaîne B et une perte consécutive des interactions hydrophobes à l'interface entre les monomères. De plus, l'hélice N-terminale de la chaîne B est légèrement perturbée. En l'absence de phénol, qui diffuse rapidement dans les tissus après injection sous-cutanée, la flexibilité accrue des parties

N- et C-terminales de la chaîne B de l'analogue déstabilise l'hexamère provoquant sa dissociation. De la même façon que pour l'insuline lispro, les interactions inter-hexamères sont affaiblies conduisant à une dissolution plus rapide du cristal [152].

Après injection sous-cutanée, les hexamères d'insuline asparte se dissocient aussi rapidement que ceux de lispro en dimères et monomères [169, 194]. La vitesse d'absorption de l'insuline asparte n'est pas significativement différente de celle d'un analogue purement monomérique tel que l'insuline Asp^{B9}, Glu^{B27} [195].

Aucune différence notable n'a pu être décrite entre l'insuline lispro et l'insuline asparte vis-à-vis de l'affinité pour les récepteurs de l'insuline et de l'IGF-1, de la dissociation des récepteurs de l'insuline et du potentiel mitogène. De même, ces deux analogues ont des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques superposables [85, 128, 134, 195-198]. Une étude comparative directe de la capacité de ces deux molécules à contrôler la glycémie chez des patients diabétiques de type 1 a montré qu'elles entraînent une diminution de la glycémie postprandiale avec un rapport asparte/lispro des C_{max} de glycémie postprandiale de 1,01 [199].

La formation d'anticorps anti-insuline au cours d'un traitement par insuline asparte n'est pas très différente de celle liée à l'insuline humaine recombinante [168, 200].

L'insuline asparte est perfusable dans le tissu sous-cutané à l'aide de pompes [201].

Des prémélanges fixes constitués d'un mélange d'asparte et d'asparte-protamine ont été mis au point ; leurs propriétés sont comparables à celles des prémélanges à base de lispro [202].

3.4. Glulisine

La glulisine est un analogue rapide de l'insuline modifié sur deux résidus acides aminés : la lysine remplace l'asparagine en B3 et l'acide glutamique remplace la lysine en B29 [203]. Sa structure cristalline n'est pas encore disponible [152]. Ses propriétés pharmacocinétiques sont comparables à celles des insuline lispro et asparte [106, 204].

L'originalité de cet analogue provient d'une activité protectrice possible, revendiquée par le fabricant, de cet analogue vis-à-vis de la cellule β , bien que non démontrée cliniquement. Après liaison de l'insuline à son récepteur, la région protéine kinase

intracellulaire du récepteur est activée : des résidus tyrosine de la sous-unité β subissent une auto-phosphorylation (cf. Chapitre 1. 7). Cette tyrosine kinase activée phosphoryle à son tour les IRS (*insulin receptor substrates*) qui interagissent en aval avec d'autres protéines du réseau de signalisation cellulaire. Au moins 4 sous-types d'IRS ont été identifiés. Cette famille de protéines est activée par les récepteurs de l'insuline, de l'IGF-1, de l'hormone de croissance et des cytokines. L'insuline phosphoryle de façon similaire IRS-1 et IRS-2 [152]. Les souris *knockout* pour IRS-2 présentent une destruction cellulaire β accompagnée d'une résistance périphérique à l'insuline ; les souris *knockout* pour IRS-1 présentent un retard de croissance avec une masse cellulaire β augmentée [205]. Une étude *in vitro* [206] sur une lignée cellulaire a montré des propriétés anti-apoptotiques, vis-à-vis des cytokines et de l'acide palmitique, supérieures à l'insuline humaine, l'insuline lispro et l'insuline asparte. Une autre étude *in vitro* [207], de la même équipe, a montré une activation préférentielle d'IRS-2 par rapport à IRS-1 suite à l'application d'insuline glulisine. Cependant, *in vivo*, lorsque des souris reçoivent une injection intraveineuse ou intrapéritonéale d'insuline ou de glulisine, elles présentent des augmentations comparables de la phosphorylation de la tyrosine d'IRS-1 et de celle d'IRS-2 à la fois dans le muscle squelettique et dans le foie [208].

Les analogues avec des propriétés protectrices cellulaires β sont une voie de recherche intéressante mais difficile à assurer sans augmentation du potentiel mitogène [152].

L'insuline glulisine a une affinité comparable à celle de l'insuline pour les récepteurs de l'insuline et de l'IGF-1 [207, 209].

3.5. NovoSol Basal

Un certain nombre de stratégies ont été tentées pour retarder ou stabiliser la cinétique d'absorption des préparations d'insuline à action longue [133]. La proinsuline et son métabolite, la des-64,65 proinsuline humaine, n'ont pu être retenus en raison de leur faible efficacité et de l'existence de risques cardiovasculaires potentiels [85].

Une autre possibilité alors proposée pour prolonger l'action de l'insuline est de déplacer le point isoélectrique (pI) de la molécule (5,4) vers la neutralité en développant des analogues avec des résidus acides aminés chargés positivement. L'analogue est alors soluble à pH acide dans la préparation mais précipite à pH physiologique au site d'injection [133].

L'insuline Gly(A21), Arg(B27), Thr-NH₂(B30), également appelée NovoSol Basal, est l'un des premiers analogues de l'insuline basés sur ce principe [133, 210]. Le développement clinique de cette molécule a été interrompu en phase 2 du fait notamment de réactions inflammatoires locales au site d'injection [169]. D'autre part, même si NovoSol Basal présente moins de variabilité intra-individuelle que la préparation Ultratard HM, la variabilité inter-individuelle n'est pas significativement différente entre les deux préparations [210, 211]. Enfin, un contrôle glycémique correct ne peut être obtenu avec NovoSol Basal qu'en administrant des doses deux fois plus élevées, indiquant une biodisponibilité réduite.

3.6. Glargine

L'insuline Arg^{B31}, Arg^{B32} fut une des premières molécules testées avec un pI proche de la neutralité dans le but de prolonger la durée d'action [212]. Cependant, comme pour NovoSol Basal, la biodisponibilité n'était pas optimale et la formation du dépôt d'insuline dans le tissu sous-cutané n'était pas plus importante qu'avec l'insuline NPH. Une substitution supplémentaire en A21 a permis de développer une insuline avec une structure hexamérique plus stable : l'insuline glargine, qui est un analogue de l'insuline d'action prolongée résultant de l'élongation de la partie C-terminale de la chaîne B de l'insuline par deux acides aminés arginine et de la substitution de l'asparagine en A21 par la glycine [152, 210]. L'addition de 2 résidus arginine modifie le pI de la molécule : 6,7 pour l'insuline glargine (insuline humaine 5,4). Ce déplacement du pI insolubilise la molécule à pH neutre ou physiologique et conduit à la formation de microprécipités au point d'injection [128, 152]. Ainsi, son absorption dans la circulation sanguine est retardée. L'addition de petites quantités de zinc (30 µg/ml) retarde davantage encore l'absorption [145, 152]. La durée d'action prolongée de cet analogue peut s'expliquer en partie par la liaison d'un phénol supplémentaire à l'hexamère. La localisation de la molécule de phénol, à l'entrée du canal créé par les hélices N-terminales de la chaîne B, prévient l'accès du solvant à l'ion chlorure et crée également une liaison hydrogène avec un autre hexamère. L'accès restreint du solvant et le contact inter-hexamères contribuent à la prolongation de la cinétique mais ne l'expliquent pas entièrement [152, 213].

Avec un pI proche de 7,0, cet analogue est commercialisé sous la forme d'une solution limpide de pH 4,0 : il n'est donc plus nécessaire, comme pour les formulations prolongées d'insuline humaine, de remettre en suspension avant injection ; la variabilité liée à cette manipulation disparaît. L'acidité explique une légère douleur au moment de l'injection [128, 152].

La substitution de l'asparagine par la glycine prévient la désamidation chimique et la dimérisation. Ceci contribue également à la stabilité de cet analogue dans la formulation acide (pH 4,0) [128, 152].

La glargine ne peut être mélangée dans la seringue avec d'autres insulines du fait de son pH acide et doit donc être injectée séparément [106].

L'effet hypoglycémiant est identique à celui de l'insuline humaine ; cependant, le fabricant recommande une diminution de 20% de la dose lorsque l'insuline NPH intermédiaire est substituée par la glargine. L'insuline glargine présente 50 à 60% de l'affinité de l'insuline humaine pour son récepteur mais a une puissance équivalente *in vivo* ; les concentrations plasmatiques atteintes sont deux fois celles de l'insuline humaine : la clairance métabolique de la glargine est diminuée [157, 214].

Au contraire de l'analogue Asp(B10), l'insuline glargine se dissocie légèrement plus rapidement que l'insuline humaine du récepteur de l'insuline [214].

L'étude de Kurtzhals *et coll.* [157] compare différents analogues de l'insuline : leur affinité a été testée sur des récepteurs humains purifiés, leur vitesse de dissociation du récepteur de l'insuline sur des cellules CHO (*Chinese hamster ovary*) surexprimant le récepteur de l'insuline humaine, leur puissance métabolique sur des adipocytes de souris et leur potentiel mitogène sur des cellules humaines d'ostéosarcome. Les résultats de cette étude sont présentés dans le Tableau 3 et indiquent une affinité pour le récepteur à l'IGF-1 et un potentiel mitogène augmentés d'un facteur 6 à 8 par rapport à l'insuline. Au contraire, les mêmes paramètres sont diminués par rapport à l'insuline pour l'un des métabolites principaux (M₁) de l'insuline glargine. La pertinence clinique de cette étude est inconnue [214]. Cette augmentation du potentiel mitogène n'a pas été confirmée par d'autres études utilisant des cellules humaines musculaires de patients diabétiques [215], des fibroblastes de rat surexprimant le récepteur de l'insuline [216] ou des myoblastes surexprimant le récepteur de l'IGF-1 [217]. Une étude *in vivo* effectuée avec des souris et des rats n'a pas montré d'augmentation de l'incidence des tumeurs des glandes mammaires avec un traitement de deux ans à base de glargine (2 à 12,5 µg/kg) [218].

Tableau 3 : Liaison aux récepteurs et puissances métabolique et mitogène des analogues de l'insuline par rapport à l'insuline humaine [157] *[219].

Analogue	Affinité pour le récepteur de l'insuline (%)	Vitesse de dissociation du récepteur de l'insuline (%)	Puissance métabolique (lipogénèse) (%)	Affinité pour le récepteur de l'IGF-1 (%)	Pouvoir mitogène (%)
Insuline humaine	100	100	100	100	100
Asp(B10)	205 ± 20	14 ± 1	207 ± 14	587 ± 50	975 ± 173
Lispro	84 ± 6	100 ± 11	82 ± 3	156 ± 16	66 ± 10
Aspartate	92 ± 6	81 ± 8	101 ± 2	81 ± 9	58 ± 22
Glargine	86 ± 3	152 ± 13	60 ± 3	641 ± 51	783 ± 132
A21Gly (métabolite M ₁)	78 ± 10	162 ± 11	88 ± 3	42 ± 11	34 ± 12
Insuline Arg ^{B31} , Arg ^{B32}	120 ± 4	75 ± 8	75 ± 5	2049 ± 202	2180 ± 390
Détémir	46 ± 5* / 18 ± 2	204 ± 9	≈ 27	16 ± 1	≈ 11

L'axe de l'IGF-1 est impliqué dans le développement de la rétinopathie diabétique [214]. Le risque potentiel d'aggravation des complications rétinienne a été évalué mais la progression de la rétinopathie pendant le traitement par glargine n'a pu être confirmée [106]. Une étude montre une progression plus rapide de la rétinopathie chez des patients diabétiques de type 2 traités par glargine par rapport au groupe témoin traité par insuline NPH mais il est difficile de déterminer la pertinence de cette étude notamment du fait du petit nombre de patients, de la période de suivi courte et de résultats non confirmés par d'autres études [220]. Par mesure de précaution, le fabricant mène actuellement une étude multicentrique chez plus de 1000 patients diabétiques de type 2 afin de déterminer le risque d'aggravation de la rétinopathie sous traitement par glargine ; cette étude est toujours en cours [221].

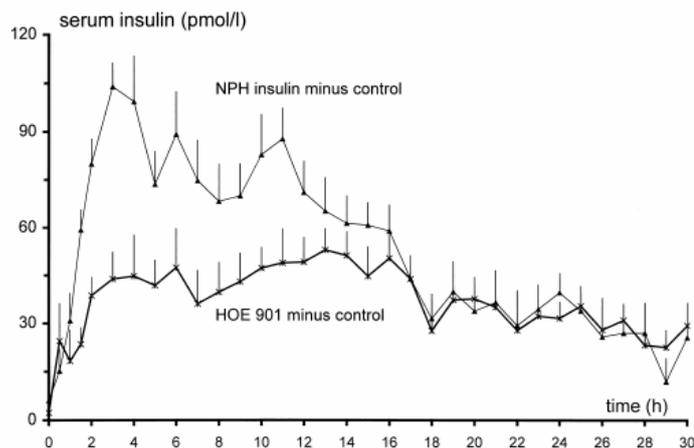


Figure 9 : Concentrations sériques d'insuline après injection sous-cutanée d'insuline glargine (HOE 901, 0,4 U/kg) 3 jours différents chez 15 volontaires sains ; la concentration en insuline est corrigée par soustraction de l'insulinémie mesurée dans des expériences témoins sans injection d'insuline [222].

L'insuline glargine commence à agir une à deux heures après administration et a une durée d'action de 24 heures [141, 152, 223]. Le profil est pratiquement dénué de pic (Figure 9) [85, 141, 152, 223]. L'insuline glargine est généralement administrée une fois par jour par voie sous-cutanée, en association avec l'injection d'une insuline rapide avant les repas. Toutefois, lorsqu'elle est utilisée à faibles doses, comme en pédiatrie, 2 injections journalières peuvent être nécessaires pour couvrir 24 heures [194].

Les études cliniques ont montré qu'une injection journalière de glargine (administrée de préférence le matin) réduit le nombre d'hypoglycémies, en particulier nocturnes, en comparaison avec l'insuline NPH, sans détérioration du contrôle glycémique [106, 220, 224-230].

Une étude randomisée en double aveugle a comparé la variabilité intra-individuelle de l'absorption de l'insuline humaine, d'action intermédiaire (NPH notamment) et prolongée, et de la glargine [231]. La variabilité intra-individuelle de la glargine, mesurée à l'aide du coefficient de variation, des SSC_{0-24} (surface sous la courbe des concentrations sur 24 heures) est plus élevée sur 24 heures (32% contre 19%) que celle de l'insuline NPH. Cet effet est toutefois inversé lorsque l'évaluation s'effectue sur la période 12-24 heures seulement. Cette variabilité importante est susceptible de gêner l'obtention régulière du profil cinétique moyen de l'insuline glargine en pratique clinique [85].

Une autre étude a comparé la variabilité inter-individuelle de la glargine, de l'insuline lispro perfusée à l'aide d'une pompe, de l'insuline NPH et de l'insuline Ultralente (insuline humaine d'action prolongée) [224]. Les variabilités inter-individuelles de la glargine et de la perfusion de lispro sont comparables et moins importantes que celles des insulines NPH et Ultralente ($p < 0,05$).

La partie C-terminale de la chaîne B est partiellement métabolisée dans le dépôt sous-cutané pour former deux métabolites actifs ayant une activité identique à celle de l'insuline *in vitro*. M₁ (insuline Gly^{A21}) et M₂ (insuline Gly^{A21}, des-Thr^{B30}) auraient une activité hypoglycémiant identique à celle de l'insuline humaine et circulent à côté de la molécule inchangée [232].

La formation d'anticorps anti-insuline liée à l'injection de glargine est rare et n'est pas associée à une perte du contrôle glycémique [128]. Six études cliniques ont évalué les concentrations de glargine en association avec la formation d'anticorps anti-insuline humaine [145]. Trois des études n'ont pas montré d'évolution des taux d'anticorps anti-glargine ou anti-insuline humaine pendant la durée de l'étude (administration de glargine ou d'insuline NPH) [233-235]. Les 3 autres études ont montré une décroissance du taux des anticorps anti-insuline humaine ou glargine plus importante dans le groupe recevant de la glargine par rapport à celui recevant de l'insuline NPH (valeurs de p non rapportées) [220, 236, 237].

Les effets secondaires sont principalement locaux mais ne nécessitent pas l'arrêt du traitement (sensation de brûlure dans la zone d'injection) [128]. L'expérience de l'utilisation de l'insuline glargine pendant la grossesse est encore limitée [106].

3.7. Détémir

Une autre approche pour augmenter la durée d'action de l'insuline est de coupler la molécule à des acides gras non estérifiés [152]. Dans la structure de l'insuline détemir, l'acide aminé Thr^{B30} est éliminé, tandis que la Lys^{B29} est acylée par un acide gras miristoyle à 14 atomes de carbone [85]. Le détemir se lie à l'albumine dans le tissu sous-cutané et dans le plasma [203].

Le détemir est soluble à pH neutre ; ce qui assure une concentration homogène sans la nécessité d'une remise en suspension avant injection [128]. Le mélange, dans la même

seringue, de détémir et d'une insuline humaine rapide ou d'un analogue rapide est possible, bien que le pic d'action de l'insuline rapide puisse être modifié dans un tel mélange [203].

Comme pour l'insuline glargine, les modifications de structure permettent de prolonger le temps de résorption à partir du dépôt sous-cutané. Cependant, à l'inverse de l'insuline glargine, cette prolongation n'est pas due à une cristallisation ; l'insuline détémir se présente sous une forme soluble conservée après l'injection [85].

Comme l'insuline humaine, l'insuline détémir existe de façon prédominante sous la forme d'hexamères en présence de zinc et de phénol [140].

La résorption du détémir à partir du dépôt sous-cutané est prolongée essentiellement par 2 mécanismes [221, 238] :

1) Une forte liaison mais réversible de l'insuline détémir à l'albumine, au site d'injection, dans le plasma (98% liée à l'albumine) et dans les tissus (96% liée à l'albumine), retarde son élimination par le foie [221, 239]. Seule la fraction libre (non liée à l'albumine) du détémir est biologiquement active [214]. L'insuline acylée se lie à l'albumine sur les sites de liaison des acides gras libres par des interactions non polaires et ioniques [128, 152]. L'albumine ayant une clairance lente à partir du sang, le détémir a une durée d'action prolongée corrélée à son affinité pour l'albumine. Des études, avec d'autres analogues acylés ayant des affinités différentes pour l'albumine, suggèrent que la rétention de l'insuline détémir dans la circulation par liaison à l'albumine ne contribue pas autant que la rétention dans le dépôt sous-cutané à la prolongation de l'action [240].

2) La chaîne acide gras latérale interagit avec les molécules d'insuline environnantes dans le dépôt sous-cutané et ainsi ralentit davantage encore la vitesse de résorption [221]. Des expériences physico-chimiques et pharmacologiques suggèrent que l'insuline hexamérique détémir est en équilibre avec une forme di-hexamérique après injection dans le tissu sous-cutané [240]. Les di-hexamères se forment probablement par contact entre les chaînes latérales acide myristique, qui sont situées aux pôles de chaque hexamère de détémir [241]. Une augmentation de l'auto-association des hexamères se produit lorsque les conservateurs de la préparation pharmaceutique (phénol et crésol) sont éliminés. L'insuline détémir peut se lier à l'albumine dans tous ses états d'association : di-hexamérique, hexamérique, dimérique et monomérique [238].

Les substances capables de libérer les acides gras libres de l'albumine (héparine, β agonistes) ne modifient pas la liaison du détémir à l'albumine. Les médicaments qui déplacent les acides gras libres de leur liaison à l'albumine (sulfonylurées, acide valproïque) n'ont aucun effet sur le détémir. En effet, la liaison du détémir à l'albumine s'effectue hors de la zone de liaison des médicaments sur l'albumine, c'est-à-dire hors des deux poches situées dans les domaines IIA et IIIA de la molécule d'albumine. Inversement, aucun effet de l'analogue n'a été observé sur la liaison de substances à l'albumine, probablement du fait de la faible concentration de détémir [128, 242].

La liaison de l'insuline détémir au récepteur de l'insuline exclut toute liaison concomitante à l'albumine : l'insuline détémir doit se dissocier de l'albumine pour exercer ses effets cellulaires. Le détémir a une affinité plus faible que l'insuline humaine pour son récepteur et une vitesse de dissociation supérieure à celle de l'insuline. La liaison du détémir au récepteur de l'IGF-1 est comparable à celle de l'insuline [157]. L'absence de potentiel mitogène a été confirmée sur des cellules humaines d'ostéosarcome [238].

Le détémir présente un délai d'apparition plus long que celui de l'insuline NPH, un pic d'action moins prononcé et moins variable par rapport à l'insuline NPH [152, 219, 242]. Les études de pharmacocinétique et de pharmacodynamie montrent que la durée d'action de l'insuline détémir est dose-dépendante et est caractérisée par une demi-vie d'environ 10 heures [85, 203]. L'insuline détémir réduit la variabilité intra-individuelle de l'absorption montrant une meilleure reproductibilité par rapport à l'insuline NPH. Une étude a comparé la variabilité de la résorption de l'insuline détémir, à celle de l'insuline glargine et de l'insuline NPH [243]. La variabilité de résorption la plus faible est celle de l'insuline détémir.

Tableau 4 : Paramètres pharmacocinétiques (concentrations sériques d'insuline humaine, de glargine et de détémir) et pharmacodynamiques (vitesses de perfusion de glucose) chez 54 sujets ayant reçu 4 doses de l'une des insulines (insuline NPH, glargine ou détémir ; 0,4 U/kg) réparties sur 4 jours différents dans des conditions de clamp euglycémique [243]. SSC : surface sous la courbe ; VPG : vitesse de perfusion du glucose ; * $p < 0,001$ par comparaison avec le détémir.

	Moyennes \pm écart-types			Coefficients de variation (%)		
	Insuline NPH	Glargine	Détémir	Insuline NPH	Glargine	Détémir
Pharmacocinétique						
Insuline-SSC _(0-12h) (nmol.min ⁻¹ .l ⁻¹)	75 \pm 20	46 \pm 16	1295 \pm 201	26	34	15
Insuline-SSC _(0-∞) (nmol.min ⁻¹ .l ⁻¹)	162 \pm 48	128 \pm 42	2355 \pm 323	28	33	14
C _{max} (pmol/l)	147 \pm 40	99 \pm 33	2865 \pm 626	24	34	18
Pharmacodynamie						
VPG-SSC _(0-12h) (mg/kg)	1280 \pm 559	886 \pm 325	1130 \pm 312	59*	46*	27
VPG-SSC _(0-24h) (mg/kg)	1923 \pm 765	1474 \pm 498	1703 \pm 490	68*	48*	27
VPG-SSC _(2-24h) (mg/kg)	1831 \pm 744	1377 \pm 482	1608 \pm 459	77*	66*	27
VPG _{max} (mg.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	2,7 \pm 1,1	1,8 \pm 0,6	2,3 \pm 0,5	46*	36*	23

La solubilité de l'insuline détémir, avant et après injection, est susceptible de limiter la variabilité provenant notamment des erreurs de dosage liées à une mauvaise remise en suspension par les patients ou une dissolution erratique du précipité [238]. Cependant, un second mécanisme atténue probablement la variabilité du profil d'action d'une injection à l'autre : un effet tampon de la liaison à l'albumine dans la circulation [244]. La vitesse d'absorption de l'insuline détémir est indépendante du flux sanguin et ne dépend que de sa vitesse d'élimination [238].

Les cellules endothéliales capillaires du tissu adipeux et du muscle limitent le transfert de l'insuline détémir depuis la circulation vers les espaces extracellulaires, alors que les capillaires sinusoides du foie sont délimités par des cellules épithéliales fortement fenêtrées séparées par de larges espaces. Les capillaires sinusoides n'ont pas de lame basale. De ce fait, il n'existe pas de barrière significative entre le plasma des capillaires sinusoides et la membrane plasmique des hépatocytes. L'insuline détémir peut donc traverser librement vers l'espace de Disse (espace périnsusoidal), exposant ainsi les hépatocytes directement à l'insuline détémir : un effet privilégié de l'analogue sur le foie par rapport aux autres tissus périphériques est probable [140]. Cet avantage potentiel est une piste de recherches actuelle importante pour le développement de nouveaux analogues de l'insuline.

3.8. « Nouveaux » analogues

Outre son action sur le métabolisme des glucides, l'insuline exerce de très nombreux autres effets. Certains dépendent du type cellulaire ou tissulaire étudié. La sélectivité d'un analogue de l'insuline peut être définie comme une sélectivité vis-à-vis de certains tissus ou vis-à-vis d'une activité particulière. Des analogues couplés de façon covalente à la thyroxine (T_4), hormone thyroïdienne, montrent une sélectivité plus importante pour la production de glucose hépatique. Sur le même principe que le détémir, ces analogues se lient aux protéines liant les hormones thyroïdiennes pour former des complexes de haut poids moléculaire ayant un accès privilégié aux hépatocytes [133].

De très nombreuses voies de recherches sont à l'étude pour obtenir des analogues présentant une stabilité accrue, une variabilité moindre, un début d'action encore plus rapide et/ou une activité encore plus prolongée.

Chapitre 4 : Dosage de l'insuline et de ses analogues

Il existe 3 types principaux de dosage de l'insuline : les bio-essais, les méthodes chromatographiques et les immunodosages. Les bio-essais ne sont plus utilisés ; ils étaient employés pour la standardisation des préparations pharmaceutiques et pour la production de standards.

1. Milieu biologique

L'activité endogène de l'insuline humaine est fonction de sa concentration dans le liquide interstitiel. L'insuline doit traverser l'endothélium des capillaires situés entre le plasma et le liquide interstitiel avant d'interagir avec son récepteur dans les tissus sensibles à l'insuline. Les concentrations en insuline dans le liquide interstitiel sont 2 à 3 fois moins élevées que dans le plasma et leur évolution est considérablement plus lente. Il a été montré que la concentration en insuline dans le liquide interstitiel est fortement corrélée avec l'utilisation du glucose [245-251]. L'insuline endogène, humaine recombinante et ses analogues sont couramment dosés dans le sang (sérum ou plasma) qui présente l'avantage d'être un milieu biologique plus facilement accessible, reflétant en partie (en fonction du transport transendothélial) la concentration en insuline du liquide interstitiel non accessible en pratique clinique courante.

Le détémir répond à une problématique particulière. En effet, l'albumine circulante, servant de système tampon, retient une grande partie du détémir circulant ; des études devront déterminer s'il est plus pertinent de doser le détémir libre (non lié à l'albumine) ou le détémir total (lié et non lié à l'albumine).

2. Méthodes chromatographiques

Les techniques chromatographiques et, plus particulièrement, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse sont largement utilisées pour l'analyse de

l'insuline humaine recombinante, les analogues, les précurseurs et produits de dégradation dans l'industrie pharmaceutique essentiellement. En effet, les quantités d'insuline à analyser dans les préparations pharmaceutiques sont extrêmement élevées et une sensibilité importante n'est pas nécessaire [2]. Quelques exemples de l'utilisation de ces techniques, notamment en recherche, sont présentés dans le Tableau 5. Les techniques CLHP ne sont par contre disponibles ni en pratique clinique courante, ni pour les études de pharmacocinétique.

Si l'analyse de l'insuline est conduite sur des échantillons biologiques, ceux-ci doivent être prétraités [2].

La détection peut être effectuée :

- par analyse des fractions à l'aide d'un immunodosage non spécifique de l'insuline [2] ;
- par détection UV lorsque les échantillons contiennent des quantités importantes d'insuline, dans les préparations pharmaceutiques notamment ;
- par spectrométrie de masse, permettant de distinguer l'insuline humaine des analogues dans des échantillons biologiques [252, 253].

Tableau 5 : Exemples de méthodes chromatographiques pour la détermination de l'insuline et de molécules apparentées. RIA : Radio-immunoassay ; ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

Auteurs	Type d'échantillon	Molécule(s) séparée(s)	Détection
Cao <i>et coll.</i> [254]	Molécules purifiées	Insuline humaine et insuline lispro (non séparées) Insuline asparte Insuline glargine	Spectrométrie de masse
Hamel <i>et coll.</i> [255]	Hépatocytes isolés de rats après extraction	Insuline marquée à l'iode 125 Produits de dégradation hépatique de l'insuline	Radioactivité – ¹²⁵ I
Hoyer <i>et coll.</i> [256]	Préparation pharmaceutique	Insuline Produits de dégradation	UV (230 nm)
Hvass <i>et coll.</i> [257]	Molécules purifiées	Insuline humaine Insuline asparte Produits de dégradation des 2 insulines	UV-Visible
Jars <i>et coll.</i> [258]	Préparation pharmaceutique	Insuline asparte Produits de dégradation	UV (214 nm)
Kalant <i>et coll.</i> [259]	Molécules purifiées	Insuline humaine Insuline bovine Insuline porcine	UV (210 nm)
Khaksa <i>et coll.</i> [260]	Plasma (homme, rat) après extraction	Insuline	UV (214 nm)
Kippen <i>et coll.</i> [261]	Sérum après extraction	Insuline Proinsuline Peptide C	Spectrométrie de masse
Kuerzel <i>et coll.</i> [232]	Plasma et tissu adipeux après extraction	Insuline Glargine Métabolites de la glargine	RIA UV Spectrométrie de masse (Technique non décrite)
Lougheed [262]	Préparation pharmaceutique	Insuline lispro	Non précisée
Moslemi <i>et coll.</i> [263]	Préparation pharmaceutique	Insuline A21-désamido insuline	UV (214 nm)
Oliva <i>et coll.</i> [264]	Préparation pharmaceutique	Insuline Produits de dégradation	Spectrométrie de masse
Ostrega <i>et coll.</i> [265]	Plasma humain après extraction	Insuline Proinsuline Produits de conversion de la proinsuline en insuline	ELISA
Sakura <i>et coll.</i> [266]	Pancréas humain après extraction Sérum humain après extraction	Insuline humaine Insuline humaine mutante sur un acide aminé	RIA
Seino <i>et coll.</i> [267]	Plasmas humains après extraction	Insuline humaine Insulines humaines mutantes Insuline bovine Insuline porcine	RIA
Stickelmeyer <i>et coll.</i> [268]	Préparations pharmaceutiques	Insuline lispro	UV (214 nm)
Stocklin <i>et coll.</i> [269]	Sérum après extraction Sang post-mortem	Insuline Produits de dégradation par l'hémolyse de l'insuline	Spectrométrie de masse
Thevis <i>et coll.</i> [252]	Plasmas après extraction	Insuline humaine Insuline lispro Insuline asparte Insuline glargine	Spectrométrie de masse
Thevis <i>et coll.</i> [253]	Urines humaines après extraction	Insuline humaine Insuline lispro Insuline asparte Insuline glulisine	Spectrométrie de masse

3. Immunodosages

3.1. Insuline

Depuis la description par Yalow et Berson en 1959 du dosage RIA (*radio-immuno assay*) de l'insuline, la technique a largement évolué [2, 41, 42]. Les premiers dosages RIA utilisaient de l'insuline bovine marquée à l'iode 125 et des anticorps polyclonaux de cobaye anti-insuline bovine. Les anticorps polyclonaux reconnaissent avec un degré variable l'insuline et la proinsuline. Les dosages immunométriques à deux sites, dans lesquels un anticorps est fixé à une phase solide et l'autre anticorps est marqué, ont été développés pour augmenter la sensibilité et la spécificité. La disponibilité d'insuline humaine recombinante et d'anticorps monoclonaux anti-insuline humaine, à la fin des années 1980, a rendu possible l'utilisation des anticorps en large excès dans les immunodosages immunométriques [1, 2]. La spécificité des dosages peut être façonnée par une sélection attentive des anticorps pour un épitope d'intérêt. Les couples d'anticorps monoclonaux actuellement utilisés dans les dosages immunométriques ne reconnaissent généralement pas les précurseurs de l'insuline présents dans le sérum ou le plasma (proinsuline et des-31,32 proinsuline principalement) [2]. Les dosages immunométriques ont abaissé la limite de détection et amélioré la reproductibilité, ce qui facilite la détermination de l'insulinémie à jeun et l'étude de la pulsativité de la sécrétion basale [270]. Les phases solides et les marquages des anticorps (radioactifs, enzymatiques, fluorescents ou chimiluminescents) sont très variables : IRMA (*immuno-radiometric assay*), IEMA (*immuno-enzymometric assay*), IFMA (*immuno-fluorimetric assay*) et ICMA (*immuno-chemiluminometric assay* ; Tableau 6) [2, 270]. Pour notre étude, nous avons utilisé un dosage IRMA (Bi-insulin) et un dosage IECMA (*immuno-electrochemiluminometric assay* ; Elecsys).

Tableau 6 : Immunodosages de l'insuline commercialisés. D'après Sapin et coll. [271]. IRMA : immunoradiometric assay ; IEMA : immuno-enzymometric assay ; ICMA : immuno-chemiluminometric assay ; IECMA : immuno-electrochemiluminometric assay ; IFMA : immuno-fluorometric assay.

Dosage Fabricant	Méthode	Volume échantillon (µl)	Standard	Durée d'incubation (heures)	Limite de détection (mU/l)	Réactivité croisée (%)				
						Pro-insuline			Insuline	
						Intacte	Des 31,32	Des 64,65	Rat	Porc
Dosage par compétition										
INSI K5 DiaSorin	RIA	100	66/304	1,75	4	80	67	94	100	100
Phadeseph Pharmacia	RIA	100	66/304	2,5	2,5	60	46	75		
Bi-insulin Bio-Rad	RIA	100	66/304	2,5	2,5	80	70	100	90	100
Coat-Count DPC	RIA	200	66/304	18	1,2	55	50	55		100
Insulin RIA DSL	RIA	100	83/500	16	1,3	55	50	68		99
Insulin CT Cis Bio	RIA	100	66/304	18	2				89	119
Insulin RIA BioSource	RIA	100	66/304	1,2	3,6	40			29	100
Ultrasensitive Linco	RIA	100		48	0,2	6	6	78		
Specific Linco	RIA	100		16	2	< 0,2	< 0,2	76	< 0,1	100
Dosages non compétitifs										
Insulin IRMA BioSource	IRMA	50	66/304	2	1	< 0,1	< 0,1	100	< 0,1	162
Insulin EASIA BioSource	IEMA	50	66/304	0,5	0,15	0			0	100
Immunotech Beckman	IRMA	50	66/304	2	0,5	< 0,1	< 0,1	55		
Bi-insulin Cis Bio	IRMA	50	66/304	2	0,2	< 0,1	< 0,1	100	< 0,1	100
INSI-CTK DiaSorin	IRMA	50	66/304	2	0,3	32,7			121	
IMx Abbott	IEMA	150	66/304	< 0,5	1	< 0,1	< 0,1	77		90
AxSYM Abbott	IEMA	36	66/304		1	< 0,1	< 0,1	77		90
Access Beckman	IEMA	20	66/304	0,5	0,1	< 0,1	< 0,1	75		97
Immulate DPC	IEMA	100	66/304	1	2	12				
Immulate 2000 DPC	IEMA	100	66/304	1	2	13				
Active Insulin DSL	IEMA	25	66/304	1,25	0,26	< 0,1				
Elecsys Roche	IECMA	20	66/304	0,3	0,2	< 0,1				19
Insulin ELISA Dako	IEMA	25	66/304	1,25	0,5	0,3	0,5	66	0	450
Delfia PerkinElmer	IFMA	50	66/304	2	0,5	0,1	0,4	66		
ADVIA Centaur ACS:180 Bayer	ICMA	25	66/304	0,125	0,1	0,2				
AIA Pack Tosoh	IEMA	25	66/304	0,67	2	< 0,1	< 0,1	100		72

Les nombreux dosages de l'insuline commerciaux ou « maison » présentent des performances très disparates en terme de précision pour les faibles et fortes concentrations, de linéarité et de récupération sans que ces données soient complètement évaluées ou disponibles pour l'utilisateur. Ceci explique la difficulté à obtenir des valeurs de références chez le sujet à jeun [1, 2].

La plupart des dosages d'insuline sont calibrés avec la première préparation internationale de l'OMS (IRP 66/304). Il s'agit d'une préparation purifiée d'insuline humaine qui n'est pas définie en terme de masse. De ce fait, plusieurs facteurs de conversion des mU en pmol sont utilisés avec un facteur multiplicatif pouvant varier de 6,0 à 7,5 : le dosage Insuline Elecsys utilisé dans la deuxième partie du travail expérimental effectue la conversion avec $1 \text{ mU} = 6,945 \text{ pmol}$ [2].

Pour le dosage de l'insuline, les échantillons sanguins peuvent être prélevés avec ou sans anticoagulant (héparine ou EDTA, pour la plupart des dosages, à l'exception de ceux utilisant la phosphatase alcaline comme marqueur) [271].

La stabilité de l'insuline dans les échantillons conservés à température ambiante est supérieure à 6 heures et à 24 heures à $+4^\circ\text{C}$ [270]. Une étude a montré que les prélèvements effectués sur EDTA peuvent être conservés 24 heures à température ambiante sans centrifugation, l'EDTA ayant probablement un rôle de protection vis-à-vis des protéinases non spécifiques et des insulinasés calcium dépendantes [272].

Avant l'apparition des analogues de l'insuline, le principal problème de spécificité des immunodosages était la réactivité croisée de la proinsuline intacte et la des-31,32 proinsuline qui représentent les principales formes circulantes de proinsuline. La plupart des immunodosages (Tableau 6) reconnaissent la des-64,65 proinsuline dont la concentration sérique est inférieure à 1 pmol/l à jeun ; de ce fait, ces dosages sont considérés comme spécifiques [1, 2].

L'immunodosage de l'insuline est sensible à des interférences décrites communément pour les autres immunodosages : anticorps hétérophiles, facteur rhumatoïde, etc. Les fabricants ajoutent des adjuvants (notamment un excès d'immunoglobulines non spécifiques) aux réactifs pour éliminer la plupart de ces interférences [2].

Les principales sources d'interférences dans les dosages d'insuline sont l'hémolyse et les différents types d'anticorps anti-insuline [1].

Les globules rouges contiennent des concentrations élevées d'IDE (cf. Chapitre 1, 6). Les échantillons hémolysés ne devraient pas être analysés : une hémolyse légère (exprimée en concentration d'hémoglobine : 0,5 g/l) réduit significativement la concentration d'insuline à 20°C et une hémolyse massive (6 g/l) dégrade plus de 90% de l'insuline après une incubation de 1 heure à 37°C [1, 8, 273-275]. L'effet le plus fréquemment observé est une diminution du résultat, que l'immunodosage soit une méthode radio-immunologique compétitive (RIA) ou non compétitive immuno-radiométrique à deux sites (IRMA) [8, 276]. Avec un dosage RIA, lorsque la dégradation enzymatique de l'insuline marquée (traceur du dosage) est importante, on peut observer une fausse élévation du résultat [270]. La reconnaissance de fragments de dégradation de l'insuline par les anticorps polyclonaux des dosages RIA moins spécifiques que les couples d'anticorps, souvent monoclonaux, des dosages immunométriques, pourrait également expliquer cette augmentation [276]. Les paradigmes suivantes peuvent être proposées pour limiter les effets de l'hémolyse : prélèvement et conservation de l'échantillon à +4°C avant congélation et/ou utilisation d'inhibiteurs de protéases à groupements thiol (N-éthylmaléimide ou *p*-chloromercuriphényl sulfonate) [270, 275, 277].

Deux grandes catégories d'anticorps anti-insuline peuvent être retrouvées dans les échantillons sériques ou plasmatiques. D'une part, des auto-anticorps anti-insuline sont décrits chez environ 30% des patients diabétiques de type 1 avant tout traitement insulinique [1, 278-282]. Ces auto-anticorps peuvent être présents pendant la phase préclinique d'un diabète de type 1 et au moment du déclenchement de la maladie [270]. D'autre part, des anticorps anti-insuline sont décrits après insulinothérapie, même lorsqu'il s'agit d'insuline humaine recombinante [1, 270, 278-280, 283]. Ces anticorps ont tendance à avoir une affinité plus importante pour l'insuline que celle des auto-anticorps [2]. Les deux types d'anticorps sont susceptibles d'interférer avec les immunodosages d'insuline.

Seule l'insuline libre (non liée aux anticorps du patient) est disponible pour traverser l'endothélium capillaire et interagir avec son récepteur dans les tissus. Il s'agit de la fraction biologiquement active et donc cliniquement intéressante. En présence d'anticorps, une surestimation du résultat du dosage sérique ou plasmatique par rapport à l'insuline libre peut théoriquement se produire dans 3 circonstances :

- lorsque l’affinité des anticorps du dosage est supérieure à celle des anticorps du patient [1, 284] ; il se produit alors une dissociation des complexes immuns anticorps endogène-insuline en faveur de la formation de complexes anticorps du dosage-insuline ;
- lorsque les conditions d’incubation du dosage sont favorables à une dissociation des complexes immuns anticorps endogène-insuline [10] ;
- et enfin, lorsque la reconnaissance des complexes immuns anticorps endogène-insuline est stériquement possible par les anticorps monoclonaux du dosage [10].

La surestimation peut être très importante. Elle a été évaluée pour les dosages que nous avons utilisés dans notre étude : augmentation d’un facteur multiplicatif allant jusqu’à 16 avec le dosage Bi-insulin IRMA et jusqu’à 96 avec le dosage Insuline Elecsys [10].

L’insuline libre peut être dosée dans le surnageant après précipitation au polyéthylène glycol (PEG) des complexes immuns anticorps endogène-insuline. Cette précipitation doit être effectuée sur le sérum ou le plasma frais, dès que possible après le prélèvement, pour respecter l’équilibre entre insuline libre et insuline liée aux anticorps endogènes [271]. L’insulinémie totale (liée + libre) peut également être dosée : les complexes immuns sont dissociés par acidification avant précipitation au PEG [2].

3.2. Analogues

Les immunodosages spécifiques des analogues de l’insuline sont peu nombreux et, à l’exception de celui de l’insuline lispro, ne sont pas commercialisés [4, 5] ; il s’agit pour la plupart de dosages développés par les fabricants d’analogues pour l’évaluation clinique de leurs molécules. Par exemple, Novo Nordisk, a développé un dosage spécifique de détémir total (libre et lié à l’albumine) ne reconnaissant ni l’insuline humaine ni l’insuline asparte [148]. Un dosage spécifique de l’insuline glargine n’a cependant pas pu être développé : des anticorps spécifiques semblent difficiles à produire.

Les immunodosages non spécifiques de l’insuline humaine (reconnaissant également les analogues) sont encore en 2006 très utilisés pour les études de pharmacocinétique [6, 7]. Ces immunodosages mesurent l’« insuline immunoréactive » à savoir l’insuline humaine endogène, l’insuline humaine recombinante et un ou plusieurs analogue(s) (voire leurs métabolites).

Une étude récente a comparé les réactivités croisées des analogues avec plusieurs dosages automatisés de l'insuline humaine en milieu BSA (Tableau 7) [11].

Tableau 7 : Réactivité croisée des analogues de l'insuline en milieu BSA avec les principaux immunodosages automatisés de l'insuline humaine, concentration des analogues 30 mU/l. D'après Owen et Roberts [11].

	Réactivité croisée (%)					
	Access	Advia Centaur	Count-A- Count	Elecsys	Immulite 2000	
					Lot 122	Lot 151
<i>Lispro</i>	78,7	86,7	37,0	< 0,7	14,7	10,3
<i>Asparte</i>	85,3	120	36,7	< 0,7	14,7	9,3
<i>Glargine</i>	91,7	129	32,0	< 0,7	< 6,7	8,3

Deux approches ont été utilisées pour le calcul de la concentration de l'analogue à partir de l'« insuline immunoréactive » avec les dosages non spécifiques de l'insuline humaine :

- l'estimation de l'insulinémie endogène par des formules tenant compte à la fois de la concentration en peptide C et de l'insulinémie endogène avant administration de l'analogue [285] ; l'insulinémie endogène estimée est ensuite soustraite de l'« insuline immunoréactive » pour calculer une concentration en analogue ;
- la combinaison de deux immunodosages de l'insuline humaine (l'un spécifique de l'insuline de séquence humaine, l'autre non spécifique reconnaissant l'insuline humaine et les analogues) [286] ; la concentration en analogue est obtenue par simple soustraction entre les résultats des deux dosages.

La première partie de notre travail a consisté à évaluer cette deuxième approche.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre 1 : Matériels

1. Insulines

1.1. Spécialités pharmaceutiques

L'insuline humaine utilisée était de l'insuline recombinante, sous forme de solution injectable, Actrapid® 100 UI/ml en cartouche Penfill® (Novo Nordisk, Puteaux, France) produite par la technique de l'ADN recombinant avec *Saccharomyces cerevisiae*. Cette spécialité pharmaceutique contient les excipients suivants : glycérol, *m*-crésol, chlorure de zinc, hydroxyde de sodium et/ou acide chlorhydrique (pour l'ajustement du pH) et eau pour préparations injectables.

L'insuline lispro utilisée, produite par la technique de l'ADN recombinant avec *Escherichia coli*, était sous forme de solution injectable Humalog® 100 U/ml en cartouche (Lilly, Suresnes, France). Cette spécialité pharmaceutique contient les excipients suivants : *m*-crésol (3,15 mg/ml), glycérol, phosphate disodique heptahydraté, oxyde de zinc, acide chlorhydrique et hydroxyde de sodium (pour l'ajustement du pH) et eau pour préparations injectables.

L'insuline aspartate utilisée, produite par la technique de l'ADN recombinant avec *Saccharomyces cerevisiae*, était sous forme de solution injectable Novorapid® 100 U/ml en cartouche Penfill® (Novo Nordisk, Puteaux, France). Cette spécialité pharmaceutique contient les excipients suivants : glycérol, phénol, *m*-crésol, chlorure de zinc, phosphate disodique dihydraté, chlorure de sodium, acide chlorhydrique et/ou hydroxyde de sodium (pour l'ajustement du pH) et eau pour préparations injectables.

L'insuline glargine utilisée, produite par la technique de l'ADN recombinant avec *Escherichia coli* (souches K12), était sous forme de solution injectable Lantus® 100 U/ml en cartouche (Sanofi-Aventis, Paris, France). Cette spécialité pharmaceutique contient les excipients suivants : chlorure de zinc, *m*-crésol, glycérol, acide chlorhydrique et/ou hydroxyde de sodium (pour l'ajustement du pH) et eau pour préparations injectables.

L'insuline détémir utilisée, produite par hémisynthèse après obtention d'un précurseur par la technique de l'ADN recombinant avec *Saccharomyces cerevisiae*, était sous forme de solution injectable Levemir[®] 100 U/ml en stylo FlexPen[®] (Novo Nordisk, Puteaux, France). Cette spécialité pharmaceutique contient les excipients suivants : mannitol, phénol, *m*-crésol, acétate de zinc, phosphate disodique dihydraté, chlorure de sodium, acide chlorhydrique et/ou hydroxyde de sodium (pour l'ajustement du pH) et eau pour préparations injectables.

1.2. Métabolites de l'insuline glargine

Les métabolites M₁ (insuline Gly^{A21} ; MM = 5907 g/mol) et M₂ (insuline Gly^{A21}, des-Thr^{B30} ; MM = 5758 g/mol) de l'insuline glargine ont été fournis par la société Sanofi-Aventis (Pr J. Sandow).

2. Milieux de dilution des insulines

2.1. Tampon

Le tampon PBS-BSA (*Phosphate buffered saline-Bovine serum albumin*), pH 7,4 avec albumine sérique de bœuf, (Sigma-Aldrich, Lyon, France) est composé, une fois reconstitué avec de l'eau distillée, de chlorure de sodium tamponné par du phosphate 10 mmol/l (NaCl 138 mmol/l, KCl 2,7 mmol/l) avec 1,0% d'albumine sérique bovine (m/v).

2.2. Diluant universel Elecsys

Le diluant universel Elecsys (*Elecsys diluent universal* ; Roche Diagnostics, Meylan, France) a été utilisé pour les essais de dilution de l'insuline. Sa composition n'est pas précisément connue : il contient une « matrice protéique » et un conservateur ($\leq 0,1\%$).

2.3. Pools de sérums

Des fonds de tubes non utilisés d'échantillons de sang prélevés sur des patients non traités par l'insuline (insuline humaine recombinante ou insuline analogue) adressés au laboratoire pour un bilan biologique d'endocrinologie-diabétologie ont été réunis pour constituer des pools de sérums. Ces échantillons ont été prélevés à la fois dans des tubes en verre BD Vacutainer[®] SST[™] (contenant un gel séparateur de sérum inerte et un activateur de la coagulation – micro-particule de silice) et dans des tubes en verre siliconé BD Vacutainer[®] Z secs sans additif (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). L'ensemble des prélèvements utilisés n'était pas hémolysé. Après coagulation, le sérum a été séparé par centrifugation à 2000 g pendant 15 minutes. Les sérums ont été mélangés, centrifugés à 2000 g pendant 15 minutes et le surnageant a été aliquoté et congelé à -20°C .

Pour l'étude des différents diluants, un pool de sérums traité au charbon actif a été réalisé. Après mélange des sérums, du charbon végétal a été mélangé avec le pool à raison de 15 g de charbon pour 100 ml de sérum. Le mélange a été maintenu en contact pendant 12 heures à $+4^{\circ}\text{C}$ sous rotation verticale. Le mélange a ensuite été filtré à travers un filtre Millipore[®] 0,22 μm afin d'éliminer toute trace de charbon.

Un autre pool de sérums a été obtenu par mélange de sérums présentant une faible concentration en insuline.

Les pools de sérums ont été conservés à -20°C avant utilisation.

2.4. Sérums et plasmas

Pour les études portant sur la biotransformation de la glargine, les sérums ont été recueillis selon les mêmes conditions que celles du paragraphe précédent. Les plasmas ont été recueillis dans des tubes en verre : tubes BD Vacutainer[®] EDTA K3 liquide 1,8 mg/ml, tubes BD Vacutainer[®] PST[™] LH héparinate de lithium 17 UI/ml avec gel séparateur de plasma et tubes BD Vacutainer[®] 9 NC Citrate Coag citrate de sodium 0,129 mmol/l (3,8%). Les plasmas ont été séparés par centrifugation à 2000 g pendant 15 minutes et congelés à -20°C avant analyse.

Les sujets sains prélevés (à jeun et une heure après un repas) n'étaient pas traités par insuline humaine recombinante ou insuline analogue. Pour l'ensemble des études, les échantillons hémolysés n'ont pas été utilisés.

Les échantillons ont été conservés à -20°C avant utilisation.

3. Trousses de dosage, calibrants et contrôles

Deux trousse de dosage différentes ont été utilisées pour déterminer l'immunoréactivité de l'insuline humaine et de ses analogues (ainsi que des métabolites de la glargine) : la trousse Bi-insulin IRMA (Cis Bio International, Gif/Yvette, France) et la trousse Insuline Elecsys (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les dosages Insuline Elecsys ont été effectués sur l'automate Elecsys 2010 (Roche Diagnostics).

Les taux des anticorps anti-insuline libres ont été déterminés à l'aide de la trousse Anti-insulin RIA (Cis Bio International).

Les mesures de radioactivité ont été effectuées à l'aide du compteur γ automatique Wallac 1470 Wizard[®] (Wallac Oy, Turku, Finlande) connecté à un ordinateur PC utilisant le programme « *Multicalc laboratory data management* ».

Les contrôles (pools de sérums humains lyophilisés utilisés pour le dosage Bi-insulin IRMA (ID 19, ID 20 et ID 21 ; ProBioQual, Lyon, France) ont été repris dans 5 ml d'eau distillée et conservés à -20°C après aliquotage.

Les contrôles PC MA1 (PeciControl MultiAnalyte 1) et PC MA2 (Roche Diagnostics) utilisés pour le dosage Insuline Elecsys ont été repris par 2 ml d'eau distillée et conservés jusqu'à 1 mois à -20°C après aliquotage.

4. Carboxypeptidase B

Une solution stock de carboxypeptidase B (CPB) de pancréas de porc (Sigma, Lyon, France) a été préparée extemporanément par dissolution de 210 unités (soit 1 mg de protéine) dans 210 μ l de PBS-BSA. La solution stock a ensuite été diluée extemporanément successivement dans du PBS-BSA pour obtenir une gamme de concentration comprise entre 0,1 et 10 000 U/l.

5. Inhibiteurs enzymatiques et cations

5.1. Inhibiteurs enzymatiques

Une solution stock d'AEBSF (*4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride* ; MM = 239,7 g/mol ; Sigma-Aldrich, Lyon, France) a été préparée par dissolution de 25 mg dans 1 ml d'eau distillée. La solution stock a été conservée jusqu'à 6 mois à +4°C et diluée extemporanément au 1/5,2^{ème} dans du PBS-BSA pour obtenir une concentration de 20 mmol/l.

Une solution stock d'acide 6 amino-hexanoïque (EACA, acide ϵ -aminocaproïque ; MM = 131,2 g/mol ; Sigma, Lyon, France) a été préparée par dissolution de 2500 mg dans 50 ml de PBS-BSA (concentration 50 mg/ml). La solution stock peut être conservée à +4°C.

Une solution stock de chlorhydrate d'antipainé (MM = 677,6 g/mol ; Sigma, Lyon, France) a été préparée par dissolution de 5 mg dans 100 μ l d'eau distillée. La solution stock est stable 1 mois à -20°C et a été diluée extemporanément au 1/41^{ème} dans du PBS-BSA pour obtenir une concentration de 2 mmol/l. La solution diluée a été conservée sur glace, pas plus d'une journée afin d'éviter une oxydation ou une racémisation de l'aldéhyde terminal.

Une solution stock de chlorhydrate de bestatine (MM = 344,8 g/mol ; Sigma, Lyon, France) a été préparée par dissolution de 5 mg dans 2,5 ml d'eau distillée. La solution stock a été conservée jusqu'à 1 mois à -20°C et diluée extemporanément au 1/7,3^{ème} dans du PBS-BSA pour obtenir une concentration de 800 μ mol/l.

Une solution stock d'E-64 (trans-époxy succinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane ; MM = 357,4 g/mol ; Sigma, Lyon, France) a été préparée par dissolution de 5 mg dans 250 μ l d'eau distillée. La solution stock peut être conservée plusieurs mois à -20°C et a été diluée extemporanément et successivement au 1/10^{ème} puis au 1/28^{ème} dans du PBS-BSA pour obtenir une concentration de 200 μ mol/l.

Une solution stock d'EDTA (acide éthylènediaminetétracétique, sel disodique, dihydraté ; MM = 372,2 g/mol ; Sigma-Aldrich, Lyon, France) a été préparée par dissolution de 5 g dans 100 ml d'eau distillée. La solution stock a été conservée à +4°C et diluée extemporanément au 1/6,7^{ème} dans du PBS-BSA pour obtenir une concentration de 20 mmol/l.

Une solution stock de GEMSA (acide 2-guanidinoéthylmercaptosuccinique ; MM = 235,2 g/mol ; Calbiochem, Darmstadt, Allemagne) a été préparée par dissolution de 5 mg dans 1 ml d'eau distillée. En l'absence de données sur la stabilité du GEMSA en solution, la solution stock a été préparée extemporanément. La solution stock a été diluée extemporanément au 1/11^{ème} dans du PBS-BSA pour obtenir une concentration de 2 mmol/l.

Une solution de NEM (N-éthylmaléimide ; MM = 125,1 g/mol ; Sigma-Aldrich, Lyon, France) a été préparée extemporanément par dissolution de 250,2 mg dans 100 ml de PBS-BSA pour obtenir une concentration de 20 mmol/l.

Une solution stock d'hémisulfate de leupeptine (MM = 475,6 g/mol ; Sigma, Lyon, France) a été préparée par dissolution de 5 mg dans 500 µl d'eau distillée. La solution stock a été conservée jusqu'à 6 mois à -20°C et diluée extemporanément au 1/11^{ème} dans du PBS-BSA pour obtenir une concentration de 2 mmol/l.

Une solution stock de pepstatine A (MM = 685,9 g/mol ; Sigma, Lyon, France) a été préparée par dissolution de 5 mg dans 5 ml d'éthanol. La solution stock a été conservée jusqu'à 1 semaine à +4°C et diluée extemporanément au 1/50^{ème} dans du PBS-BSA pour obtenir une concentration de 20 µg/ml.

Une solution stock de PTCI (*Potato tuber carboxypeptidase inhibitor* ; Sigma, Lyon, France) a été préparée par dissolution de 5 mg dans 1 ml d'eau distillée. En l'absence de données sur la stabilité du PTCI en solution, la solution stock a été préparée extemporanément. La solution stock a été diluée extemporanément au 1/100^{ème} dans du PBS-BSA pour obtenir une concentration de 500 µg/ml.

Une solution stock de SBTI (*Soybean trypsin inhibitor type I-S* ; Sigma, Lyon, France) a été préparée par dissolution de 100 mg dans 10 ml de PBS-BSA. La solution stock a été conservée à -20°C et diluée extemporanément au 1/5^{ème} dans du PBS-BSA pour obtenir une concentration de 2 mg/ml.

Une solution stock de 1,10-phénanthroline (MM = 180,2 g/mol ; Aldrich, Lyon, France) a été préparée par dissolution de 250 mg dans 10 ml d'éthanol. La solution stock a été conservée jusqu'à 3 mois à +4°C et diluée extemporanément au 1/6,9^{ème} dans du PBS-BSA pour obtenir une concentration de 20 mmol/l.

5.2. Cations

Une solution de chlorure de calcium ($MM = 147 \text{ g/mol}$; Sigma-Aldrich, Lyon, France) a été préparée par dissolution de 2,94 g dans 100 ml d'eau distillée. La solution stock a été diluée extemporanément au $1/10^{\text{ème}}$ dans du PBS-BSA pour obtenir une concentration de 20 mmol/l.

Une solution de chlorure de magnésium ($MM = 203,3 \text{ g/mol}$; Sigma, Lyon, France) a été préparée par dissolution de 4,066 g dans 100 ml d'eau distillée. La solution stock a été diluée extemporanément au $1/10^{\text{ème}}$ dans du PBS-BSA pour obtenir une concentration de 20 mmol/l.

Une solution de chlorure de zinc ($MM = 136,3 \text{ g/mol}$; Sigma-Aldrich, Lyon, France) a été préparée par dissolution de 2,726 g dans 100 ml d'eau distillée. La solution stock a été diluée extemporanément au $1/10^{\text{ème}}$ dans du PBS-BSA pour obtenir une concentration de 20 mmol/l.

6. Statistiques

Les logiciels Method Validator 1.1 (P. Marquis, Metz, France) et MedCalc 4.20 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgique) ont été utilisés pour l'analyse statistique.

Chapitre 2 : Méthodes

1. Dosages

1.1. Immunodosages de l'insuline

Un schéma comparatif des deux méthodes de dosage de l'insuline Bi-insulin IRMA et Insuline Elecsys est présenté en Annexe 1.

1.1.1. Bi-insulin IRMA

– Principe

Bi-insulin IRMA est une trousse destinée au dosage de l'insuline sérique. Il s'agit d'une technique radio-immunométrique (technique sandwich). Elle utilise un couple d'anticorps monoclonaux anti-insuline : le premier anticorps monoclonal est adsorbé sur les parois du tube ; le second anticorps monoclonal est marqué à l'iode 125.

Les étapes réactionnelles sont les suivantes :

1. Incubation des étalons ou des échantillons inconnus en présence d'un excès du premier anticorps fixé sur les parois du tube et d'un excès du second anticorps monoclonal marqué à l'iode 125 ;
2. Lavages et mesure de l'activité liée aux tubes, après élimination de la fraction libre.

– Réactifs

- Tubes revêtus d'anticorps anti-insuline (R1), prêts à l'emploi. Anticorps monoclonal de souris anti-insuline, fixé au fond du tube.

- Solution d'anticorps anti-insuline ^{125}I (R3), rouge, prête à l'emploi. Anticorps monoclonal de souris anti-insuline marqué à l'iode 125. L'anticorps est dilué en tampon TRIS (tris-hydroxyméthylaminométhane, 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol), contenant 0,1% d'azoture de sodium. Le flacon contient environ 460 kBq (12,5 μCi) de traceur ^{125}I à la date de marquage et a une activité spécifique d'environ 320 kBq/ μg .
- Solution de lavage (R4). Tampon imidazole concentré, pH 7,4 contenant du Tween 20 et 0,1% d'azoture de sodium. Le contenu du flacon est dilué au 1/40^{ème} dans de l'eau distillée et homogénéisé avant l'emploi.
- Solution de standard 0 / Diluant (S0), bleue, prête à l'emploi. Tampon TRIS additionné de protéines et contenant 0,1% d'azoture de sodium.
- Solutions de standards (S1 à S6), bleues, prêtes à l'emploi. Insuline humaine, diluée avec S0, contenant 0,1% d'azoture de sodium. Concentrations de standards (valeurs cibles) : S1 = 1 mUI/l ; S2 = 5 mUI/l ; S3 = 20 mUI/l ; S4 = 100 mUI/l ; S5 = 250 mUI/l ; S6 = 500 mUI/l.

– Mode opératoire

Tous les réactifs ont été amenés à température ambiante (18-25°C) au moins 30 minutes avant leur utilisation. La reconstitution des réactifs et leur distribution dans les tubes revêtus ont été effectuées à température ambiante. Le dosage a nécessité les tubes revêtus (R1) suivants :

- 2 tubes « T », pour la détermination de l'activité totale ;
- 2 tubes « standard 0 », pour la détermination de la liaison non spécifique ;
- pour chaque concentration de standard, 2 tubes « standard S_x », pour l'établissement de la courbe d'étalonnage ;
- pour chaque sérum de contrôle, 1 tube « contrôle » ;
- 2 tubes « X » pour chaque échantillon à doser.

Les dosages des standards et des échantillons ont été réalisés simultanément.

50 µl de S₀, de standards S₁ à S₆, de contrôles (ID 19, ID 20, ID 21) ou d'échantillons à doser ont été respectivement distribués dans les tubes revêtus (R1) « standard 0 », « standard S_x », « contrôle » et « X ». 300 µl de traceur ¹²⁵I (R3) ont été ajoutés dans tous les tubes. Les tubes « T » ont été bouchés. L'ensemble des tubes a été recouvert de Parafilm® et incubé 2 heures à température ambiante (18-25°C) sous agitation horizontale. Les tubes ont ensuite été lavés de la façon suivante (à l'exception des tubes « T ») : le milieu réactionnel a été éliminé par une aspiration la plus complète possible ; 2,0 ml de solution de lavage (R4 diluée au 1/40^{ème}) ont été ajoutés dans chaque tube ; la solution de lavage a été éliminée par aspiration ; les deux dernières étapes ont été renouvelées 2 fois ; une aspiration finale, la plus complète possible, a permis d'éliminer le liquide résiduel.

L'obtention de résultats sûrs et reproductibles nécessite que les différentes étapes de lavage soient efficaces : l'ajout de la solution de lavage doit être effectuée avec une puissance suffisante pour créer des turbulences dans le tube.

La radioactivité de la fraction liée aux tubes a été mesurée à l'aide du compteur γ réglé pour la mesure de l'iode 125 pendant 1 minute. Les résultats ont été calculés automatiquement par le programme du compteur (B/B_{max} en fonction du logarithme de la concentration; fonction « *spline* »). Le dosage Bi-insulin IRMA est calibré par rapport à la première préparation internationale de l'OMS IRP 66/304.

1.1.2. Insuline Elecsys

– Principe

Insuline Elecsys est une trousse destinée au dosage de l'insuline sérique. Il s'agit d'une technique immunométrique (technique sandwich). La détection s'effectue par électrochimiluminescence (ECLIA, *Electrochemiluminescence Immunoassay*). Le dosage a été effectué sur analyseur Elecsys 2010. Il utilise un couple d'anticorps monoclonaux anti-insuline : le premier anticorps monoclonal est marqué à la biotine ; le second anticorps monoclonal est marqué au ruthénium (Ru(bpy)₃²⁺ : Tris(2,2'-bipyridyl)ruthénium(II)). Lors du dosage, l'anticorps marqué à la biotine se fixe à la phase solide (microparticules tapissées de streptavidine) par l'intermédiaire d'une liaison streptavidine-biotine.

– Réactifs

Le coffret-réactifs (à 3 compartiments), placé dans l'Elecsys 2010, contient les réactifs suivants :

- Microparticules tapissées de streptavidine (M) 0,72 mg/ml, capacité de liaison : 470 ng de biotine / mg de microparticules ;
- Anticorps (R1) monoclonal (de souris) anti-insuline marqué à la biotine 1 mg/l dans du tampon MES (acide 2-morpholinoéthanesulfonique) 50 mmol/l de pH 6,0 ;
- Anticorps (R2) monoclonal (de souris) marqué au ruthénium 1,75 mg/l dans du tampon MES 50 mmol/l de pH 6,0.

– Mode opératoire

La durée totale du cycle analytique est de 18 minutes. L'analyseur effectue automatiquement le prélèvement des échantillons, l'homogénéisation des particules, la distribution des réactifs, l'incubation du mélange réactionnel, son transfert dans la cellule de mesure et la détermination de la concentration en insuline par mesure de la luminescence.

En bref, le cycle analytique débute par une 1^{ère} incubation (9 minutes) de 20 µl de l'échantillon en présence de l'anticorps monoclonal anti-insuline spécifique marqué à la biotine et de l'anticorps marqué au ruthénium. Il se forme alors un sandwich. L'analyse se poursuit par une 2^{ème} incubation (9 minutes) après ajout dans la cuvette réactionnelle des microparticules tapissées de streptavidine. Le complexe immunologique est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine. Enfin, le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure ; les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage d'un liquide (ProCell). Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est amplifiée par un photomultiplicateur à la sortie duquel on recueille un signal électrique fonction de la concentration de l'analyte à mesurer. Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Une courbe de référence est mémorisée dans le code barre du réactif et réajustée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en deux points. Le test Insuline Elecsys est calibré par rapport à la première préparation internationale de l'OMS IRP 66/304. Le domaine de mesure est 0,200-1000 mU/l (1,39-6945 pmol/l).

1.2. Anti-insulin RIA

– Principe

Le principe de détection des anticorps anti-insuline repose sur la mise en évidence d'une liaison spécifique avec de l'insuline marquée à l'iode 125. Les anticorps anti-insuline libres correspondent aux anticorps non complexés à l'insuline circulante. Ils sont dosés selon une technique de radio-immunoprécipitation en phase liquide :

- le sérum contenant les anticorps anti-insuline est incubé 24 heures en présence d'insuline marquée à l'iode 125 ;
- la fraction insuline-¹²⁵I liée aux anticorps anti-insuline du sérum est séparée de la fraction insuline-¹²⁵I libre par une précipitation au PEG ;
- après centrifugation, le comptage de la radioactivité des culots (fraction liée) permet de calculer le pourcentage de liaison aux immunoglobulines du sérum de l'insuline-¹²⁵I.

– Réactifs

- Solution d'insuline humaine ¹²⁵I, prête à l'emploi. Insuline humaine mono-iodée en A14 et purifiée par CLHP, en tampon TRIS additionné de rouge phénol ; contient de l'azoture de sodium à 0,1%. Le flacon contient environ 26 kBq (0,7 µCi) d'insuline ¹²⁵I d'activité spécifique voisine de 111 MBq/µg (300 µCi/µg) au jour du marquage.
- Solution précipitante (R2), bleue, prête à l'emploi. Solution de polyéthylène glycol en tampon phosphate et contenant de l'azoture de sodium à 0,1%.
- Contrôle négatif (C1), lyophilisé. Sérum humain normal contenant 0,1% d'azoture de sodium.
- Contrôle positif (C2), lyophilisé. Echantillon d'origine humaine titré en anticorps anti-insuline libres avec 0,1% d'azoture de sodium.

– Mode opératoire

Tous les réactifs ont été amenés à température ambiante (18-25°C) au moins 30 minutes avant leur utilisation. Le dosage a nécessité les tubes plastiques suivants :

- 2 tubes « T », pour la détermination de l'activité totale ;
- pour chaque sérum de contrôle, 2 tubes « contrôle » ;
- 2 tubes « X » pour chaque échantillon à doser.

Les dosages des contrôles (C1 et C2) et des échantillons ont été réalisés simultanément.

50 µl d'échantillons à doser ou d'échantillons de contrôle (C1 et C2) ont été distribués dans les tubes « X » et « contrôle », respectivement. 100 µl d'insuline ¹²⁵I (R1) ont été ajoutés dans tous les tubes. Les tubes « T » ont été bouchés. L'ensemble des tubes a été revêtu de Parafilm® et, après agitation au Vortex®, incubé 24 heures à température ambiante (18-25°C). 1000 µl de solution précipitante (R2) ont été ajoutés dans tous les tubes (sauf les tubes « T »). Les tubes ont été agités un à un au Vortex® puis incubés 10 minutes à température ambiante (18-25°C). Tous les tubes (sauf « T ») ont été centrifugés à 3000 g pendant 10 minutes à +2/8°C. Le surnageant a été aspiré soigneusement en veillant à ne pas entraîner le précipité. La radioactivité du précipité a été mesurée à l'aide du compteur γ réglé pour la mesure de l'iode 125 pendant 1 minute. Les résultats ont été calculés automatiquement par le programme du compteur :

- la moyenne des cpm des contrôles (C1 et C2) et des échantillons a été effectuée ;
- la capacité de liaison de chaque contrôle et échantillon en pourcentage de radioactivité totale, soit :

$$\frac{\text{Activité liée}}{\text{Activité totale}} = \frac{\text{Radioactivité du tube (cpm)}}{\text{Radioactivité totale (cpm)}} \times 100.$$

Le résultat obtenu avec le contrôle C1 (sérum humain normal) a été déduit de tous les autres résultats. Le seuil de positivité a été fixé à 2,5%.

2. Evaluation analytique des immunodosages d'insuline

2.1. Comparaison de Bi-insulin IRMA et Insuline Elecsys

L'insuline a été dosée sur 47 sérums de patients par la technique Bi-insulin IRMA et par la technique Elecsys.

2.2. Choix d'un diluant

2.2.1. Dosage des diluants potentiels

Les diluants potentiels (tampon PBS-BSA, pool de sérums traité au charbon actif, diluant universel Elecsys, pool de sérums avec une faible concentration en insuline) ont été dosés par les 2 techniques Bi-insulin IRMA et Insuline Elecsys.

2.2.2. Dosage de l'insuline dans différents diluants

Des dilutions initiales du contenu des cartouches d'insuline Actrapid® 100 UI/ml ont été effectuées dans du PBS-BSA suivies d'une dilution finale au 1/10^{ème} dans le diluant à tester pour obtenir différentes concentrations inférieures à 250 mU/l :

- Tampon PBS-BSA ;
- Pool de sérums traité au charbon actif ;
- Diluant universel Elecsys ;
- Pool de sérums de concentration en insuline inférieure à 5 mUI/l.

2.3. Réactivité croisée des analogues

2.3.1. En milieu tampon

L'insuline humaine Actrapid[®] et les analogues (lispro, Humalog[®] ; asparte, Novorapid[®] ; glargine, Lantus[®] ; et détémir, Levemir[®]) contenus dans les cartouches ont été dilués successivement dans du PBS-BSA pour obtenir des concentrations comprises entre 10 et 200 mU/l. L'immunoréactivité des dilutions a été mesurée à l'aide des dosages Bi-insulin IRMA et Insuline Elecsys.

2.3.2. En milieu sérique

Les solutions pharmaceutiques ont été diluées dans du PBS-BSA pour obtenir des concentrations entre 100 et 2000 mU/l, avant dilution dans le pool de sérums.

Un pool de sérum, dont l'insulinémie était inférieure à 10 mU/l et dont les anticorps anti-insuline étaient indétectables, a été utilisé pour effectuer la dilution finale au 1/10^{ème} : pool de sérum / dilution des insulines dans le PBS-BSA 90:10 (v/v ; concentration finale dans le sérum : 10-200 mU/l). Une dilution au 1/10^{ème} du PBS-BSA (sans insuline) dans le pool de sérum a été effectuée dans les mêmes conditions (témoin). L'immunoréactivité des pools de sérums surchargés en insuline ou en analogue a été mesurée à l'aide des dosages Bi-insulin et Insuline Elecsys. Le résultat du témoin (dilution sans insuline) a été retranché pour le calcul de l'immunoréactivité en milieu sérique.

2.4. Effet de l'hémolyse sur les analogues

Un hémolysat concentré a été préparé par un cycle congélation-décongélation sur un culot globulaire plasmatique. Le degré d'hémolyse a été quantifié en mesurant l'absorption à 556 nm de l'hémoglobine. Le même protocole de dilution dans un pool de sérums décrit au paragraphe 2.3. a été effectué avec l'insuline humaine recombinante Actrapid[®] et les analogues (lispro, Humalog[®] ; asparte, Novorapid[®] ; glargine, Lantus[®]) pour obtenir une concentration finale dans le pool de sérums surchargé de 100 mU/l. Des échantillons « hémolysés » et « témoins » sont obtenus par addition de 7 µl d'hémolysat concentré ou 7 µl de PBS-BSA, respectivement, à 200 µl de pool de sérum surchargé en insuline ou analogue. Les échantillons « hémolysés » (concentration finale en hémoglobine : 10 g/l) et « témoins »

ont été incubés pendant 3 heures à température ambiante ($\approx 22^{\circ}\text{C}$) avant dosage par Bi-insulin IRMA.

2.5. Interférence des anticorps anti-insuline

L'interférence des anticorps anti-insuline sur la détermination des concentrations d'analogues avec la technique Bi-insulin IRMA a été étudiée sur 18 sérums avec des taux d'anticorps anti-insuline inférieurs à 2,5% (« sérums sans anticorps ») et 17 sérums avec des taux d'anticorps anti-insuline compris entre 4,4 et 77,2% (« sérums avec anticorps », taux d'anticorps anti-insuline moyen 33%, écart-type 29%).

Dans le but d'obtenir des sérums sans insuline avec ou sans anticorps, 200 μl de réactif d'extraction R3 de la trousse Anti-insuline RIA (réactif d'extraction R3, noir : solution contenant du charbon-dextran en tampon glycine à pH acide, contenant de l'azoture de sodium à 0,1%) prélevés sous agitation ont été ajoutés à 400 μl d'échantillon (« sérums sans anticorps » ou « sérums avec anticorps »). Les mélanges ont été incubés sous agitation pendant 24 heures à $+4^{\circ}\text{C}$. Ceci permet de dissocier les complexes anticorps-insuline (pH acide) avant d'extraire l'insuline totale (libre et liée aux anticorps) du sérum à l'aide de charbon actif. La neutralisation des échantillons a été obtenue en ajoutant 200 μl de tampon de neutralisation (tampon R4 de la trousse Anti-insuline RIA ; tampon barbital, contenant 0,1% d'azoture de sodium). Les échantillons ont ensuite été centrifugés et la concentration en insuline contrôlée sur le surnageant ($< 0,5$ mUI/l).

Des dilutions ont été effectuées dans du PBS-BSA pour obtenir une concentration de 100 mU/l d'insuline humaine recombinante (Actrapid[®]) et d'analogues (lispro, Humalog[®] ; asparte, Novorapid[®] ; glargine, Lantus[®]).

10 μl de dilution d'insuline (100 mU/l) ont été ajoutés à 90 μl de surnageant. Le mélange final (concentration finale en insuline humaine ou analogue : 10 mU/l) a été incubé pendant 24 heures à $+4^{\circ}\text{C}$ sous agitation.

L'immunoréactivité en insuline a été déterminée par dosage Bi-insulin IRMA.

3. Etude de la biotransformation de la glargine *in vitro*

3.1. Réactivité croisée des métabolites

Les métabolites de la glargine M1 et M2 ont été mis en solution dans de l'acide chlorhydrique 0,005 N puis dilués successivement dans du PBS-BSA pour obtenir des concentrations comprises respectivement entre 50 et 1200 pmol/l et entre 50 et 12 000 pmol/l.

Les échantillons ont été dosés par les techniques Bi-insulin IRMA et Insuline Elecsys.

3.2. Biotransformation *in vitro*

Tous les réactifs et échantillons (sérum, plasmas et pools de sérum) ont été amenés à +4°C. Les incubations ont été effectuées dans des godets en polystyrène clair pour automates d'immunoanalyse (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne). Sauf mention contraire, la glargine (Lantus®) diluée dans du PBS-BSA a été ajoutée à l'échantillon (échantillon 90% volume / dilution de glargine 1000 mU/l dans PBS-BSA 10% volume) [échantillon A]. Pour chaque échantillon, le même mélange a été effectué avec du PBS-BSA sans glargine pour déterminer la concentration d'insuline endogène du pool de sérum [échantillon B]. L'incubation a été effectuée à 37°C, sauf mention contraire, et a été stoppée en plaçant les échantillons 5 minutes à +4°C. L'insuline a été dosée dans les échantillons A et B sur Elecsys 2010 avec la trousse Insuline Elecsys. Un seul échantillon à la fois était placé dans l'automate, de façon à ce que celui-ci soit traité avec le même temps d'attente avant l'analyse (1 min 30). M1 est le seul métabolite de la glargine reconnu par Insuline Elecsys (la glargine n'étant pas non plus reconnue). Son immunoréactivité a été calculée par la soustraction [(concentration de A) – (concentration de B)] ; la biotransformation a été exprimée en pmol/l / 100 pmol/l glargine (ou pourcentage de glargine métabolisé en M1, % ; obtenu en divisant le résultat Elecsys exprimé en pmol/l par la réactivité croisée de M1 avec le dosage Insuline Elecsys soit 0,224 et en divisant le résultat par 5,912 puisque 1 mU de glargine = 5,912 pmol/l de glargine, donnée fournie par le Pr J. Sandow, laboratoire Sanofi-Aventis, Allemagne).

3.2.1. Cinétiques

Les expériences de cinétiques ont été effectuées sur un pool de sérum. La glargine (Lantus®) diluée dans du PBS-BSA a été incubée avec des proportions variables de sérum

(0%, 10%, 15%, 30% et 50%), à des concentrations variables (30, 60, 100 et 500 mU/l) et à différentes températures (4°C, 25°C, 37°C et 50°C). La cellule de mesure de l'Elecsys 2010 n'étant pas compatible avec une large variation de pH, le pH optimum de la biotransformation de la glargine n'a pas été étudié.

3.2.2. Effets des anticoagulants et de la prise alimentaire

Le sérum et des plasmas obtenus avec 2 anticoagulants (EDTA et héparinate de lithium) ont été prélevés simultanément chez 3 sujets sains avant et une heure après un repas. Une dilution de glargine a été incubée 30 minutes (partie linéaire de la cinétique) et 2 heures (plateau de la cinétique) à 37°C. La durée d'incubation longue avait été choisie pour s'assurer qu'une éventuelle inhibition catalytique persiste après 2 heures. Les plasmas EDTA ont été incubés en présence et en absence de chlorure de zinc (1 mmol/l).

3.2.3. Variabilité inter-individuelle

Les sérums de 69 patients hospitalisés ou ambulants (à jeun et non à jeun) ont été incubés avec une dilution de glargine pendant 30 minutes à 37°C. Ce temps d'incubation est court de façon à étudier la vitesse initiale de formation du métabolite (partie linéaire de la cinétique).

3.2.4. Caractérisation de l'activité enzymatique

Effets de la carboxypeptidase B sur la glargine

180 µl des différentes solutions de CPB ont été ajoutées à 20 µl d'une solution de glargine (Lantus®) diluée dans du PBS-BSA (1000 mU/l). Le mélange a été incubé 1 heure à 37°C puis placé dans la glace avant dosage par la technique Insuline Elecsys. Un témoin PBS-BSA sans glargine a été incubé dans les mêmes conditions.

Effets d'inhibiteurs enzymatiques et de cations

180 µl d'un pool de sérums (concentration en insuline : 14,2 mU/l) ont été ajoutés à 10 µl d'une dilution de glargine (Lantus®) à 2000 mU/l dans du PBS et à 10 µl d'une série d'inhibiteurs et de cations (cf. paragraphe Matériels). Les mélanges ont été incubés 1 heure à 37°C avant d'être dosés par la technique Insuline Elecsys.

Chapitre 3 : Résultats

1. Evaluation analytique des immunodosages d'insuline

1.1. Comparaison de Bi-insulin IRMA et Insuline Elecsys

La droite de régression des résultats Insuline Elecsys en fonction des résultats Bi-insulin IRMA est représentée sur la Figure 10. La pente est égale à 1,1 et l'intersection à l'origine est égale à 2,4. Le coefficient de corrélation r est égal à 0,99.

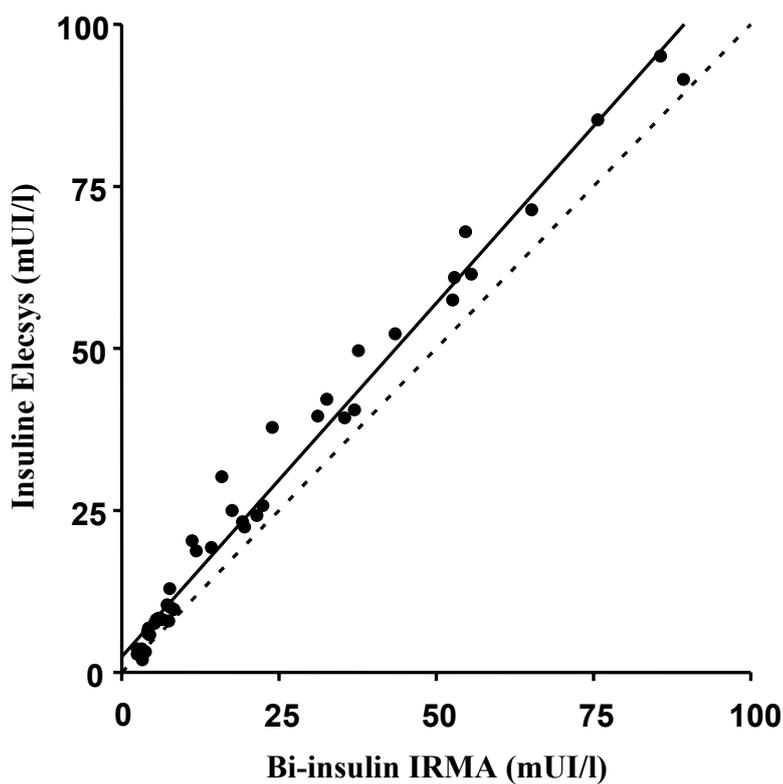


Figure 10 : Droite de régression des résultats Insuline Elecsys en fonction des résultats Bi-insulin IRMA ($n = 47$).

1.2. Choix d'un diluant

1.2.1. Dosage des diluants potentiels

PBS-BSA

Le tampon PBS-BSA a été mesuré par la technique Bi-insulin IRMA 12 fois, sur 4 jours différents. Six valeurs sont différentes de 0 avec une moyenne de 0,215 mUI/l.

Le tampon PBS-BSA a été mesuré par la technique Insuline Elecsys 12 fois, sur 4 jours différents avec deux calibrations différentes. Huit valeurs sont supérieures à la limite inférieure du domaine de mesure (0,200 mUI/l) avec une moyenne de 0,264 mUI/l.

Pool de sérums traité au charbon actif

La concentration en insuline du pool de sérums avant traitement au charbon actif est de 23,2 mUI/l (technique Bi-insulin IRMA).

Après traitement au charbon actif, le résultat est de 0,114 mUI/l avec la technique Bi-insulin IRMA (limite de détection 0,200 mUI/l) et inférieur à la limite inférieure du domaine de mesure (0,200 mUI/l) avec la technique Insuline Elecsys.

Diluant universel Elecsys

Le diluant universel Elecsys donne un nombre de coups par minute inférieur à celui du standard 0 avec le dosage Bi-insulin Elecsys (en moyenne -29%).

Le résultat est inférieur à la limite inférieure du domaine de mesure (0,200 mUI/l) avec la technique Insuline Elecsys.

Pool de sérums avec une concentration faible en insuline

La concentration en insuline du pool de sérums est mesurée à 4,12 mUI/l par la technique Bi-insulin IRMA et à 3,13 mUI/l par le technique Insuline Elecsys.

1.2.2. Dosage de l'insuline dans différents diluants

Les droites de régression des résultats Bi-insulin IRMA ou Insuline Elecsys en fonction de la quantité d'insuline Actrapid® présente dans la dilution sont représentées sur les Figure 11 à Figure 18. Les pentes des droites sont rappelées dans le Tableau 8.

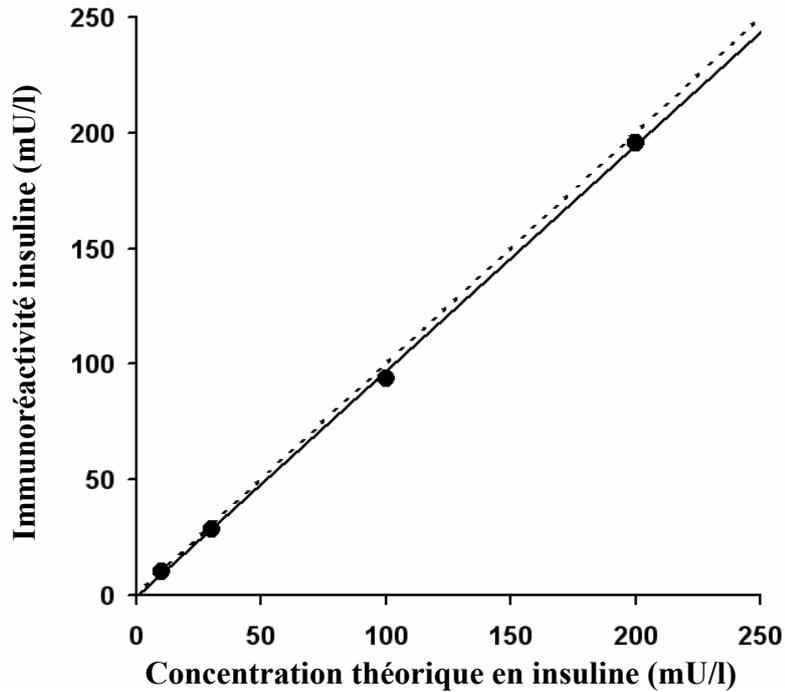


Figure 11 : Droite de régression des résultats Bi-insulin IRMA en fonction des valeurs théoriques (insuline Actrapid®, diluant : PBS 1 % albumine). Pente = 0,98 et ordonnée à l'origine = -1,0 mUI/l.

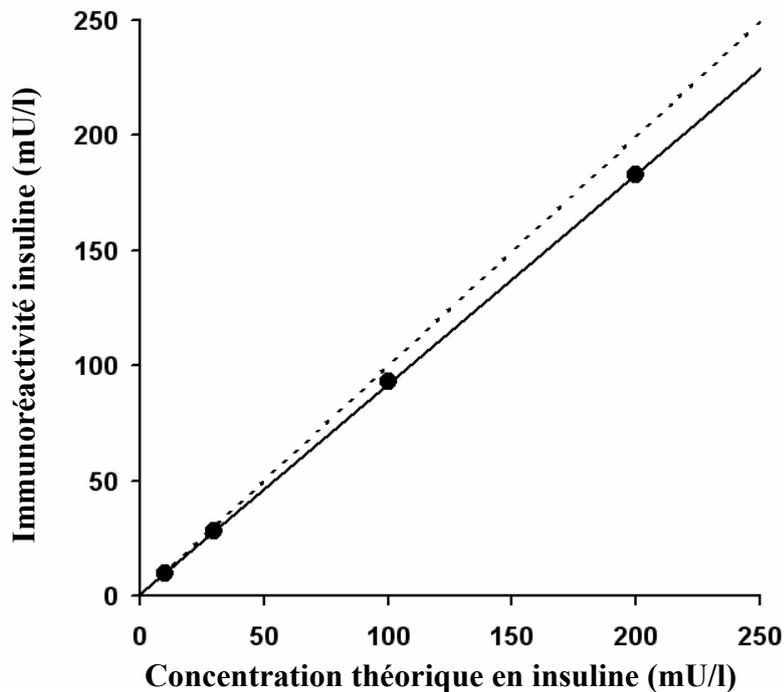


Figure 12 : Droite de régression des résultats Elecsys en fonction des valeurs théoriques (insuline Actrapid®, diluant : PBS 1 % albumine). Pente = 0,91 et ordonnée à l'origine = 0,77 mUI/l.

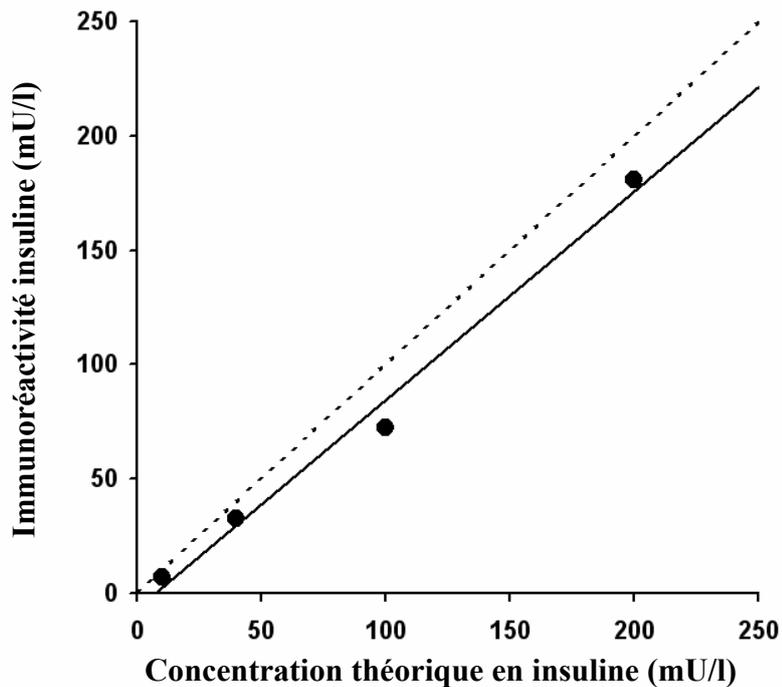


Figure 13 : Droite de régression des résultats Bi-insulin IRMA en fonction des valeurs théoriques (insuline Actrapid®, diluant : 90 % sérum sans insuline + 10 % PBS 1 % albumine). Pente = 0,88 et ordonnée à l'origine = -2,3 mU/l.

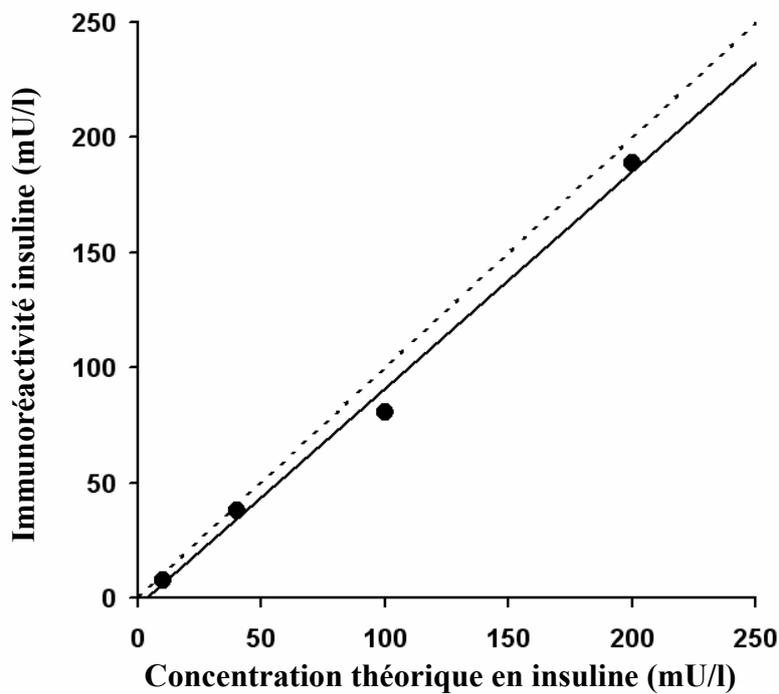


Figure 14 : Droite de régression des résultats Elecsys en fonction des valeurs théoriques (insuline Actrapid®, diluant : 90 % sérum sans insuline + 10 % PBS 1 % albumine). Pente = 0,94 et ordonnée à l'origine = -3,5 mU/l.

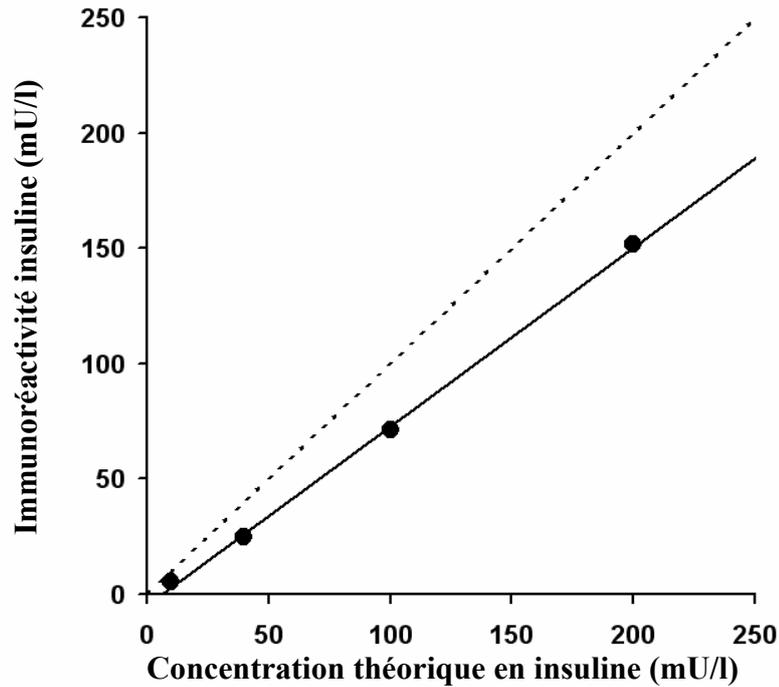


Figure 15 : Droite de régression des résultats Bi-insulin IRMA en fonction des valeurs théoriques (insuline Actrapid®, diluant : 90 % pool sérums + 10 % PBS 1 % albumine), soustraction dans chaque cas de la concentration en insuline endogène du pool de sérums. Pente = 0,78 et ordonnée à l'origine = -4,8 mUI/l.

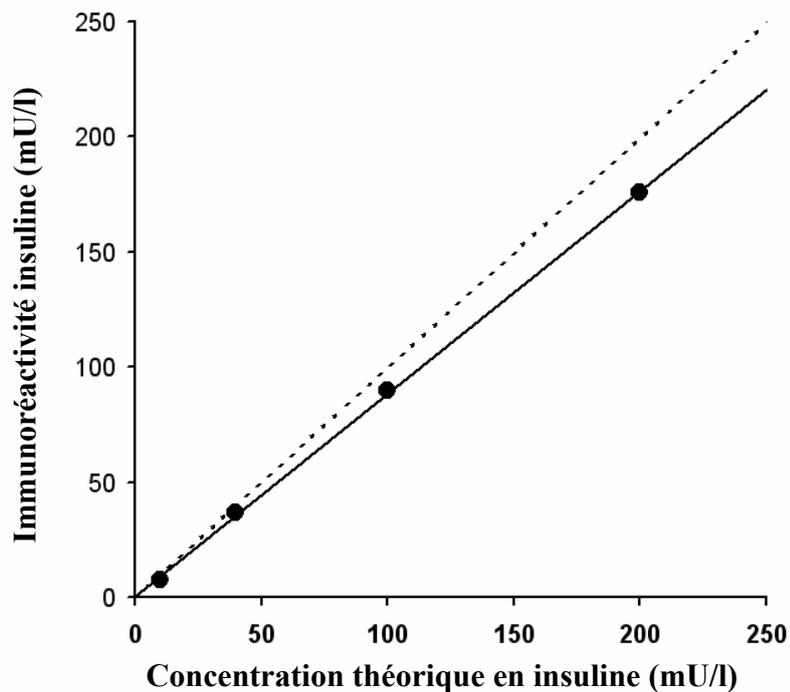


Figure 16 : Droite de régression des résultats Elecsys en fonction des valeurs théoriques (insuline Actrapid®, diluant : 90 % pool sérums + 10 % PBS 1 % albumine), soustraction dans chaque cas de la concentration en insuline endogène du pool de sérums. Pente = 0,88 et ordonnée à l'origine = 0,62 mUI/l.

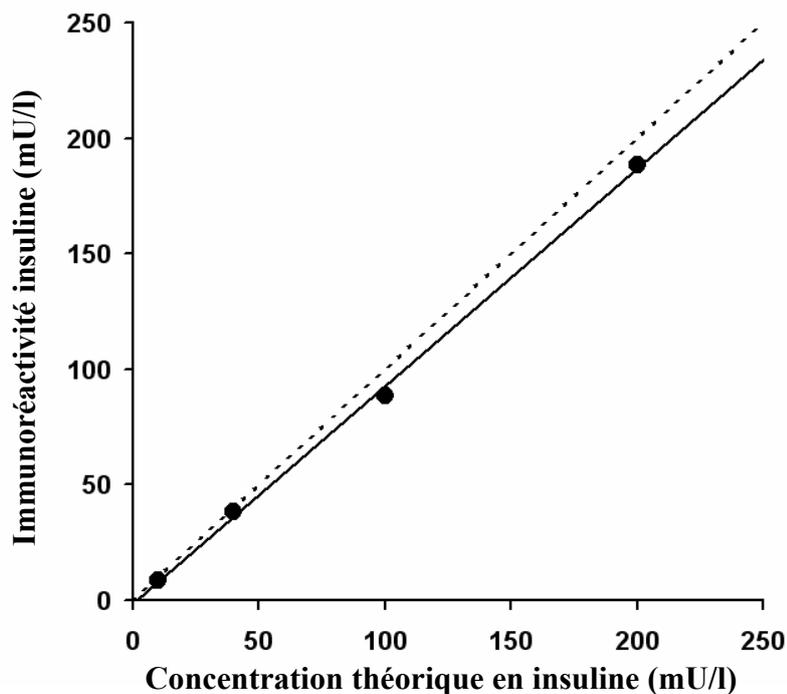


Figure 17 : Droite de régression des résultats Bi-insulin IRMA en fonction des valeurs théoriques (insuline Actrapid®, diluant : 90 % diluant universel Elecsys + 10 % PBS 1 % albumine). Pente = 0,94 et ordonnée à l'origine = -1,2 mUI/l.

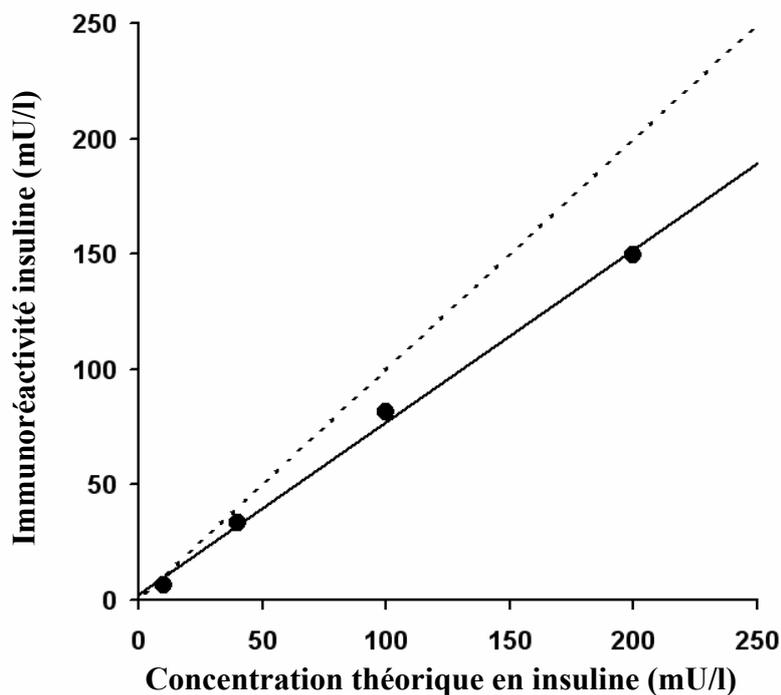


Figure 18 : Droite de régression des résultats Elecsys en fonction des valeurs théoriques (insuline Actrapid®, diluant : 90 % diluant universel Elecsys + 10 % PBS 1 % albumine). Pente = 0,75 et ordonnée à l'origine = 2,4 mUI/l.

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des **pentés des droites de régression** valeur théorique de la concentration en insuline en fonction du résultat par dosage Bi-insulin IRMA ou Insuline Elecsys avec différents diluants.

	Bi-insulin IRMA	Insuline Elecsys
PBS 1 % albumine	0,98	0,91
Pool de sérums sans insuline	0,91	0,94
Pool de sérums avec insuline	0,78	0,88
Diluant universel Elecsys	0,94	0,75

Notre étude est poursuivie avec les diluants PBS-BSA et sérum.

1.3. Réactivité croisée des analogues

L'insuline glulisine n'était pas encore commercialisée au moment de la réalisation de ce travail et n'a pas pu être testée.

1.3.1. En milieu tampon

Dosage Bi-insulin IRMA

Dans le tampon, les réactivités croisées des analogues de l'insuline sont linéaires pour des concentrations d'analogue comprises entre 10 et 200 mU/l (Figure 19 à Figure 22). Les réactivités croisées (pour une concentration « physiologique » de 30 mU/l) calculées à partir de l'équation de régression linéaire entre 10 et 200 mU/l sont respectivement de 104% ; 92%, 145% et 224%¹ pour l'insuline lispro, l'insuline asparte, l'insuline glargine et l'insuline

¹ Une réactivité croisée supérieure à 100% pourrait paraître surprenante si l'on suppose que chaque molécule d'insuline (100% de l'insuline présente dans la prise d'essai) est prise en sandwich entre un anticorps lié à la phase solide (tube) et un anticorps marqué (les deux anticorps sont présents en excès). Cela ne semble pas être le cas. En effet, après incubation pendant 2 heures à température ambiante dans un tube du dosage Bi-insulin IRMA de sérum (en suivant le même protocole que pour le dosage, concentration de l'insuline dans le sérum : 9,8 mUI/l), nous avons prélevé le liquide pour le doser à l'aide d'un nouveau tube revêtu d'anticorps anti-insuline. La quantité d'insuline non retenue par le premier tube est équivalente à 80% (7,8 mUI/l) de la concentration présente au départ. La proportion d'insuline liée à l'anticorps de la phase solide pendant l'incubation du dosage n'est donc que de 20%. Il existe un équilibre entre insuline libre (80%) et insuline liée à la phase solide (20%) pendant l'incubation du dosage. La première hypothèse permettant d'envisager une réactivité croisée supérieure à 100% avec les analogues lents (insulines glargine et détémir) serait une affinité plus importante de ces molécules pour les anticorps de la phase solide. Le rapport analogue lié à la phase solide / analogue libre serait alors >1/4 conduisant à une réactivité croisée >100%. Ce rapport pourrait également être plus élevé en cas d'interaction non spécifique d'un analogue avec la phase solide par interaction hydrophobe notamment. En effet, l'insuline détémir est plus hydrophobe que l'insuline (chaîne latérale acide gras). Enfin, une affinité des analogues plus importante pour l'anticorps marqué est également envisageable.

détémir (Annexe 2). Le pourcentage de recouvrement de l'insuline humaine (Actrapid®) calculé d'une façon identique est de 95%.

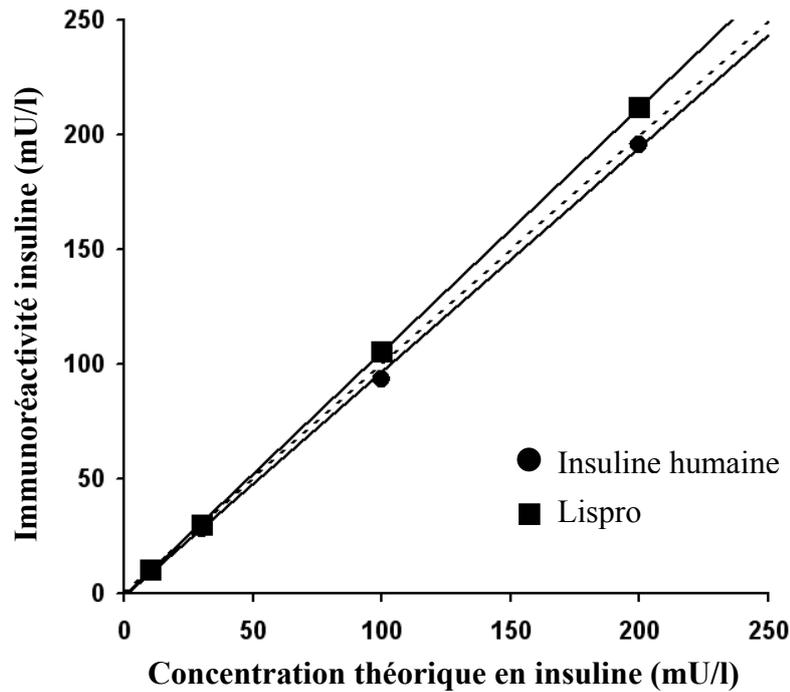


Figure 19 : Droite de régression de l'immunoréactivité de la trousse Bi-insuline IRMA vis-à-vis de l'insuline humaine et de l'insuline lispro en fonction de leurs concentrations théoriques (diluant : PBS-BSA). Insuline humaine : pente = 0,98 et ordonnée à l'origine = -1,0 mU/l. Insuline lispro : pente = 1,1 et ordonnée à l'origine = -0,99 mU/l.

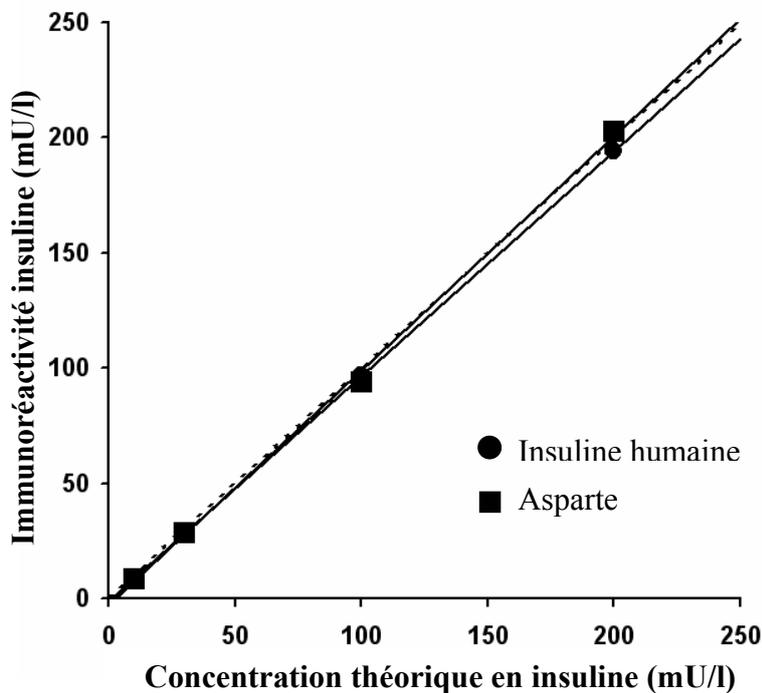


Figure 20 : Droite de régression de l'immunoréactivité de la trousse Bi-insuline IRMA vis-à-vis de l'insuline humaine et de l'insuline aspartate en fonction de leurs concentrations théoriques (diluant : PBS-BSA). Insuline humaine : pente = 0,98 et ordonnée à l'origine = -1,0 mU/l. Insuline aspartate : pente = 1,0 et ordonnée à l'origine = -2,9 mU/l.

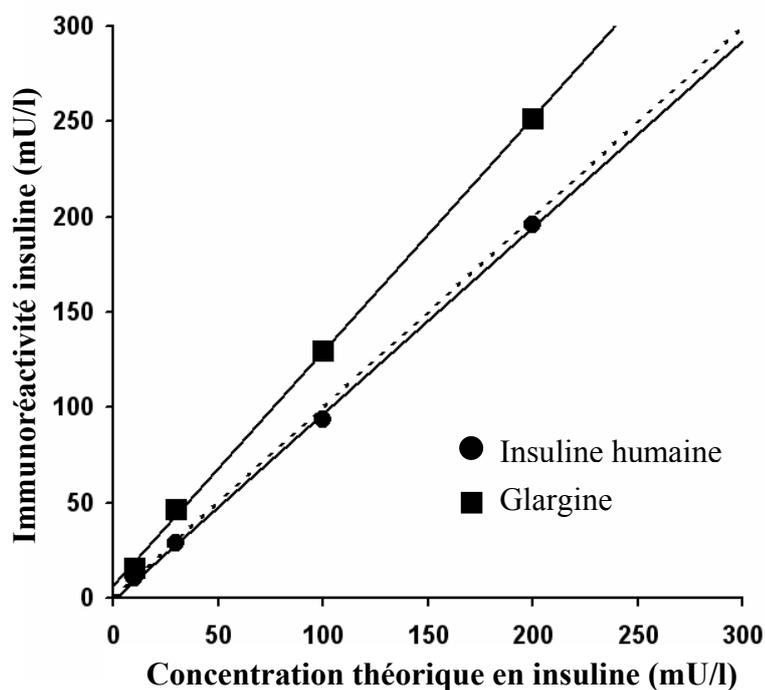


Figure 21 : Droite de régression de l'immunoréactivité de la trousse Bi-insuline IRMA vis-à-vis de l'insuline humaine et de l'insuline glargine en fonction de leurs concentrations théoriques (diluants : PBS-BSA). Insuline humaine : pente = 0,98 et ordonnée à l'origine = -1,0 mUI/l. Insuline glargine : pente = 1,2 et ordonnée à l'origine = 6,5 mU/l.

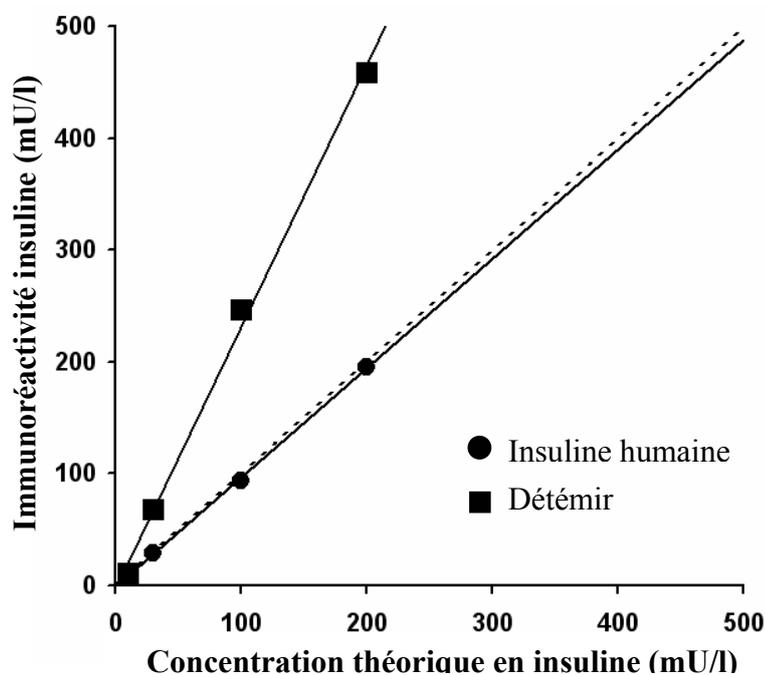


Figure 22 : Droite de régression de l'immunoréactivité de la trousse Bi-insuline IRMA vis-à-vis de l'insuline humaine et de l'insuline détémir en fonction de leurs concentrations théoriques (diluants : PBS-BSA). Insuline humaine : pente = 0,98 et ordonnée à l'origine = -1,0 mUI/l. Insuline détémir : pente = 2,3 et ordonnée à l'origine = -2,9 mU/l.

Le dosage Bi-insulin IRMA reconnaît les analogues rapides avec une réactivité croisée comparable à celle de l'insuline Actrapid® (proche de 100%) et les analogues lents avec une réactivité croisée supérieure à 140%.

Dosage Insuline Elecsys

En milieu tampon PBS-BSA, aucun des analogues testés (lispro, asparte, glargine et détémir) n'est détectable avec la technique Insuline Elecsys jusqu'à une concentration de 200 mU/l (Annexe 2).

1.3.2. En milieu sérique

Dosage Bi-insulin IRMA

En milieu sérique, les réactivités croisées des analogues de l'insuline sont linéaires pour des concentrations d'analogue comprises entre 10 et 200 mU/l (Figure 23 à Figure 25). Les réactivités croisées (pour une concentration « physiologique » de 30 mU/l) calculées à partir de l'équation de régression linéaire entre 10 et 200 mU/l sont respectivement de 74%, 68% et 199% pour l'insuline lispro, l'insuline asparte et l'insuline détémir (Annexe 2). La réactivité croisée de l'insuline glargine n'a pas été déterminée en milieu sérique ; un métabolisme, étudié dans la deuxième partie de ce travail, se produit rapidement après addition de glargine dans le sérum conduisant à un mélange de glargine et de métabolites. Le pourcentage de recouvrement de l'insuline humaine (Actrapid®) calculé d'une façon identique est de 62%.

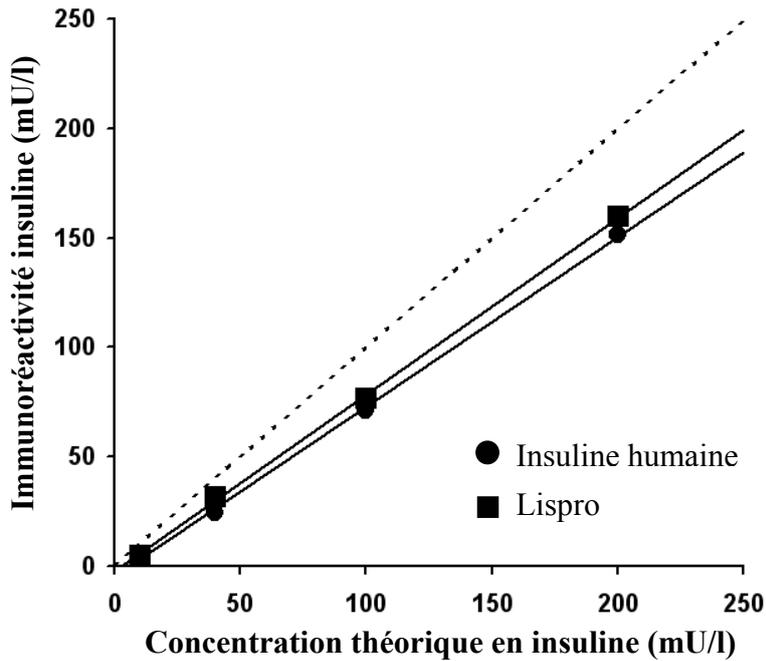


Figure 23 : Droite de régression de l'immunoréactivité de la trousse Bi-insuline IRMA vis-à-vis de l'insuline humaine et de l'insuline lispro en fonction de leurs concentrations théoriques (diluant : pool de sérums 90% / PBS-BSA 10%). Insuline humaine : pente = 0,78 et ordonnée à l'origine = -4,8 mU/l. Insuline lispro : pente = 0,81 et ordonnée à l'origine = -2,0 mU/l.

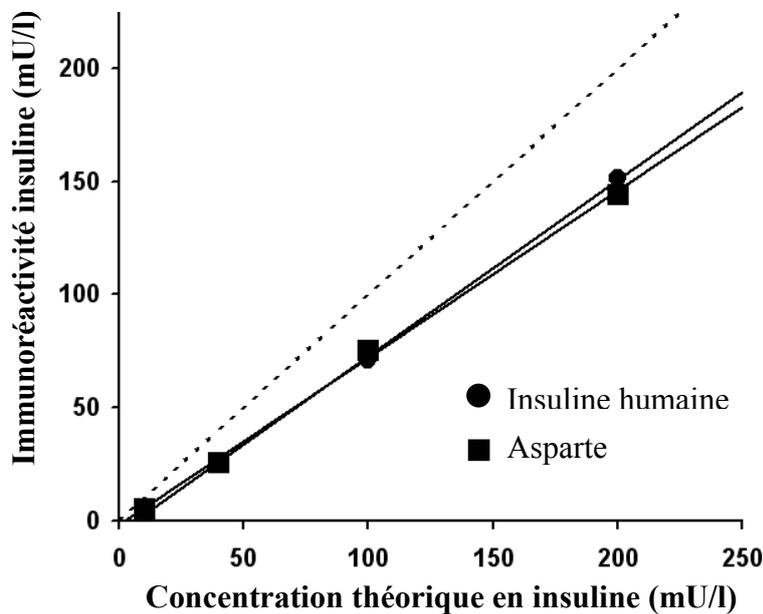


Figure 24 : Droite de régression de l'immunoréactivité de la trousse Bi-insuline IRMA vis-à-vis de l'insuline humaine et de l'insuline aspartate en fonction de leurs concentrations théoriques (diluant : pool de sérums 90% / PBS-BSA 10%). Insuline humaine : pente = 0,78 et ordonnée à l'origine = -4,8 mU/l. Insuline aspartate : pente = 0,74 et ordonnée à l'origine = -1,7 mU/l.

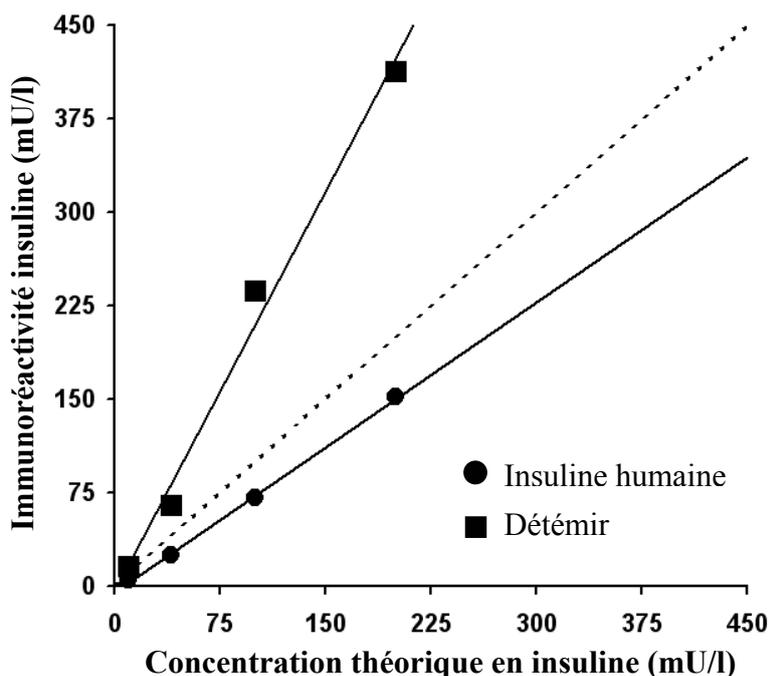


Figure 25 : Droite de régression de l'immunoréactivité de la trousse Bi-insuline IRMA vis-à-vis de l'insuline humaine et de l'insuline détémir en fonction de leurs concentrations théoriques (diluant : pool de sérums 90% / PBS-BSA 10%). Insuline humaine : pente = 0,78 et ordonnée à l'origine = -4,8 mU/l. Insuline détémir : pente = 2,1 et ordonnée à l'origine = -4,3 mU/l.

Avec le dosage Bi-insulin IRMA, en milieu sérique, la réactivité croisée des analogues rapides diminue de moins de 30% par rapport à la réactivité croisée en milieu tampon (diminution comparable à celle de l'insuline recombinante) et de 11% pour l'insuline détémir.

Dosage Insuline Elecsys

En milieu sérique, aucun des analogues testés (lispro, asparte et détémir) n'est détectable avec la technique Insuline Elecsys jusqu'à une concentration de 200 mU/l (Annexe 2).

1.4. Effet de l'hémolyse sur l'insuline humaine et les analogues

Comme l'indique le Tableau 9, l'incubation à température ambiante d'un pool de sérums « hémolysé » surchargé avec de l'insuline humaine et certains analogues conduit à une disparition presque complète de l'immunoréactivité avec la technique Bi-insulin IRMA. Dans le cas de la glargine, sont présents dans le pool de sérums en proportions non déterminées de la glargine et ses métabolites M1 et M2 qui sont globalement reconnus d'une façon peu différente par le dosage Bi-insulin IRMA (réactivités croisées de la glargine, de M1 et de

M2 : 145%, 137% et 126%, respectivement ; cf 2.1). Les métabolites éventuellement formés sont donc également détruits par l'hémolyse. Le détémir n'a pas été testé : il n'était pas commercialisé au moment de la réalisation de ce travail.

Tableau 9 : Effet de l'hémolyse sur l'immunoréactivité de l'insuline et des analogues pour le dosage Bi-insulin IRMA

	Insuline humaine	Lispro	Asparte	Glargine
Immunoréactivité –insuline (mU/l)				
Echantillons hémolysés (10 g/l)	< 0,5	3,7	3,1	< 0,5
Contrôles sans hémolyse	75,7	73,7	76,4	115,1
Dégradation de l'insuline provoquée par l'hémolyse (%)	> 99	95	96	> 99

1.5. Interférence des anticorps anti-insuline

Les « sérums sans anticorps » anti-insuline surchargés avec de l'insuline humaine, lispro, asparte et glargine (concentration en insuline ou en analogue de 10 mU/l) présentent respectivement une immunoréactivité moyenne (avec le dosage Bi-insulin IRMA) de 7,0 mUI/l (écart-type 0,6 mUI/l), 7,1 mU/l (écart-type 0,4 mU/l), 6,8 mU/l (écart-type 0,4 mU/l) et 8,4 mU/l (écart-type 0,5 mU/l) ; les « sérums avec anticorps » anti-insuline présentent une immunoréactivité moyenne de 5,2 mUI/l (écart-type 2,2 mUI/l), 5,4 mU/l (écart-type 2,2 mU/l), 5,2 mU/l (écart-type 2,1 mU/l) et 6,7 mU/l (écart-type 0,5 mU/l), respectivement.

Les réactivités croisées qui pourraient être calculées à partir de ces données sont probablement différentes (milieu différent du sérum) de celles précédemment calculées en milieu sérique.

Les immunoréactivités des « sérums sans anticorps » et des « sérums avec anticorps » sont significativement différentes pour l'insuline humaine, lispro, asparte et glargine (test U de Mann et Whitney, $p = 0,003$; $0,003$; $0,004$ et $0,015$, respectivement). L'immunoréactivité en insuline est corrélée à la concentration en anticorps anti-insuline (coefficient de corrélation de rang de Spearman $r = -0,86$; $-0,89$; $-0,88$ et $-0,88$; $p = 0,001$; $< 0,001$; $< 0,001$ et $< 0,001$; respectivement) (Figure 26 à Figure 29).

Dans le cas de la glargine, l'interférence détectée concerne la glargine et ses métabolites (cf. paragraphe 1.4).

Le détémir n'a pas été testé : il n'était pas commercialisé au moment de la réalisation de ce travail.

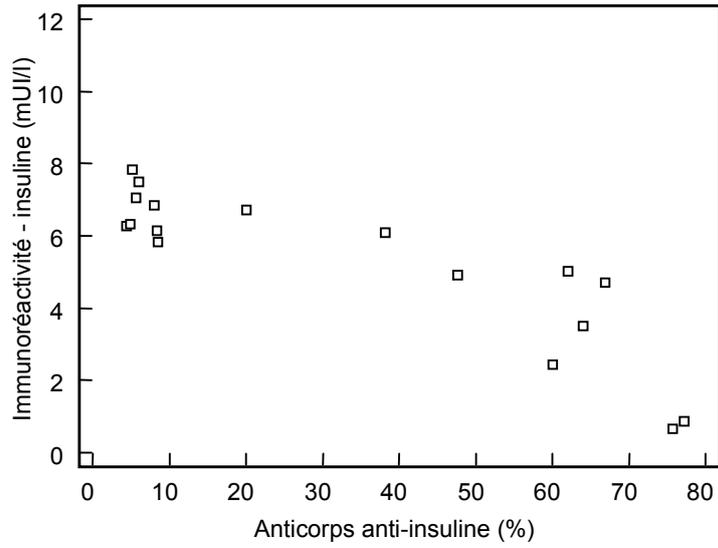


Figure 26 : Relation entre taux d'anticorps anti-insuline libre et immunoréactivité (Bi-insulin IRMA) : sérums surchargés avec de l'insuline humaine (Actrapid®), 10 mUI/l).

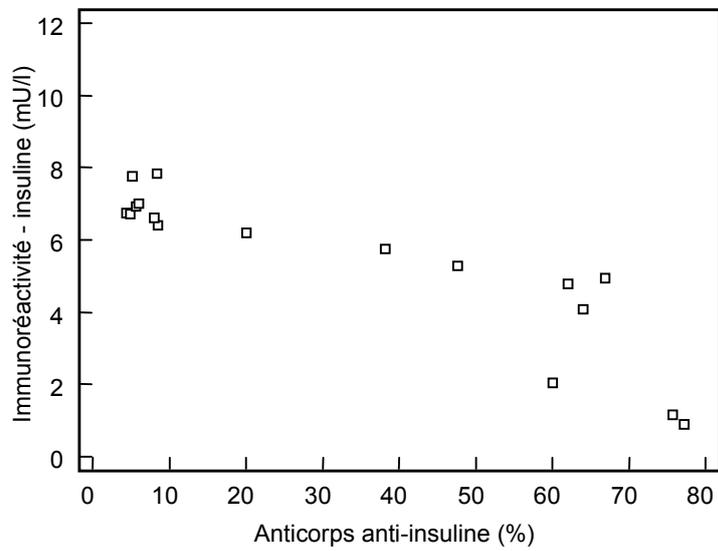


Figure 27 : Relation entre taux d'anticorps anti-insuline libre et immunoréactivité (Bi-insulin IRMA) : sérums surchargés avec de l'insuline lispro (10 mUI/l).

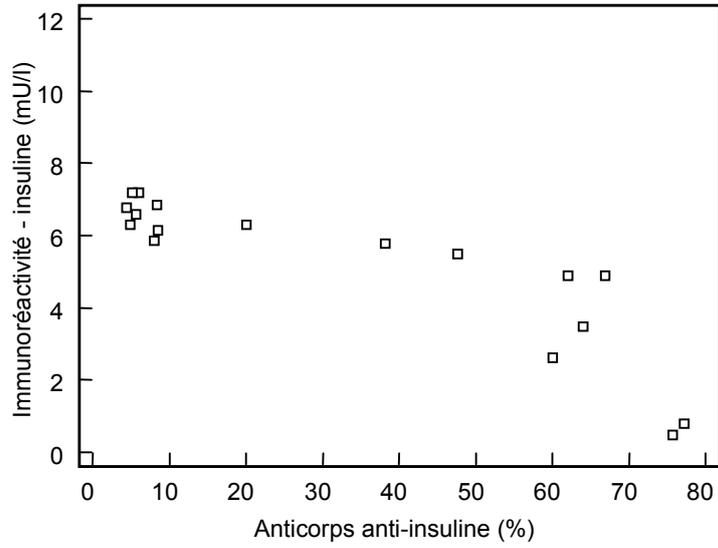


Figure 28 : Relation entre taux d'anticorps anti-insuline libre et immunoréactivité (Bi-insulin IRMA) : sérums surchargés avec de l'insuline aspartate (10 mU/l).

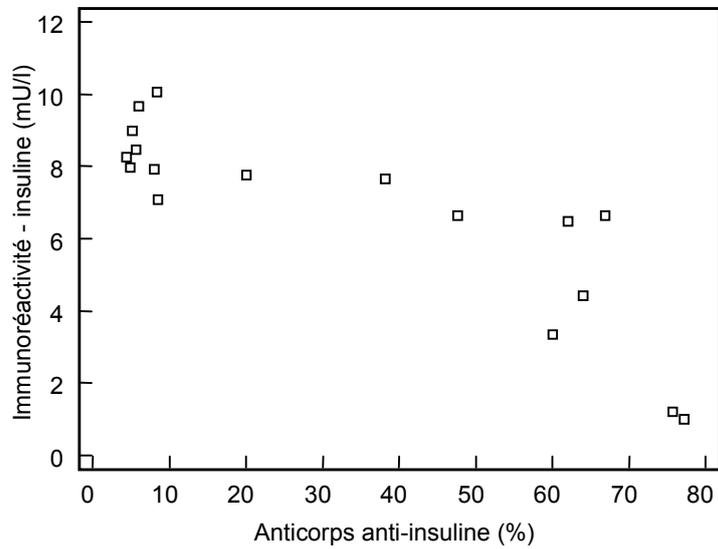


Figure 29 : Relation entre taux d'anticorps anti-insuline libre et immunoréactivité (Bi-insulin IRMA) : sérums surchargés avec de l'insuline glargine (10 mU/l).

2. Etude de la biotransformation de la glargine in vitro

2.1. Réactivité croisée des métabolites

Dosage Bi-insulin IRMA

Dans le tampon, les réactivités croisées avec le dosage Bi-insulin IRMA des métabolites de la glargine sont linéaires pour des concentrations de métabolites comprises entre 50 et 1200 pmol/l (Figure 30). Les réactivités croisées (pour une concentration de 200 pmol/l) calculées à partir de l'équation de régression linéaire sont respectivement de 137% et 126% pour M1 et M2 (Annexe 2).

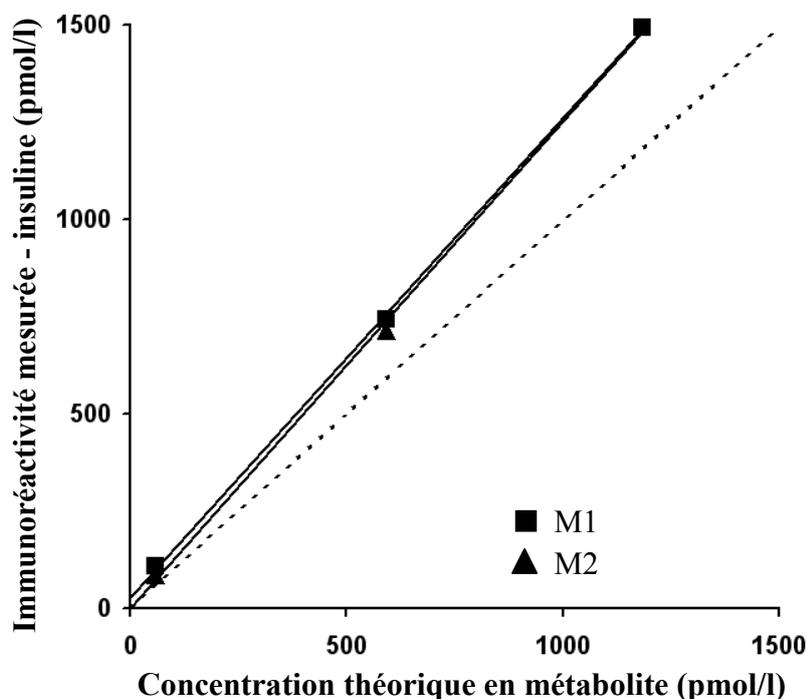


Figure 30 : Droite de régression de l'immunoréactivité de la trousse Bi-insuline IRMA vis-à-vis des métabolites de la glargine M1 et M2 en fonction de leurs concentrations théoriques (diluant : PBS-BSA). Métabolite M1 : pente = 1,2 et ordonnée à l'origine = 27 pmol/l. Métabolite M2 : pente = 1,3 et ordonnée à l'origine = 0,52 pmol/l.

Dosage Insuline Elecsys

Dans le tampon, les réactivités croisées avec le dosage Insuline Elecsys des métabolites de la glargine sont linéaires pour des concentrations de métabolites comprises

entre 50 et 1200 pmol/l avec le métabolite M1 (Figure 31) et entre 1000 et 12 000 pmol/l avec le métabolite M2. La réactivité croisée du métabolite M1 avec le dosage Insuline Elecsys (pour une concentration de 200 pmol/l) calculée à partir de l'équation de régression linéaire est de 22% pour M1. Le Tableau 10 représente la réactivité croisée du métabolite M2 en fonction de sa concentration avec le dosage Insuline Elecsys. Elle peut en pratique être considérée comme négligeable puisque inférieure à 0,200 mU/l (Annexe 2).

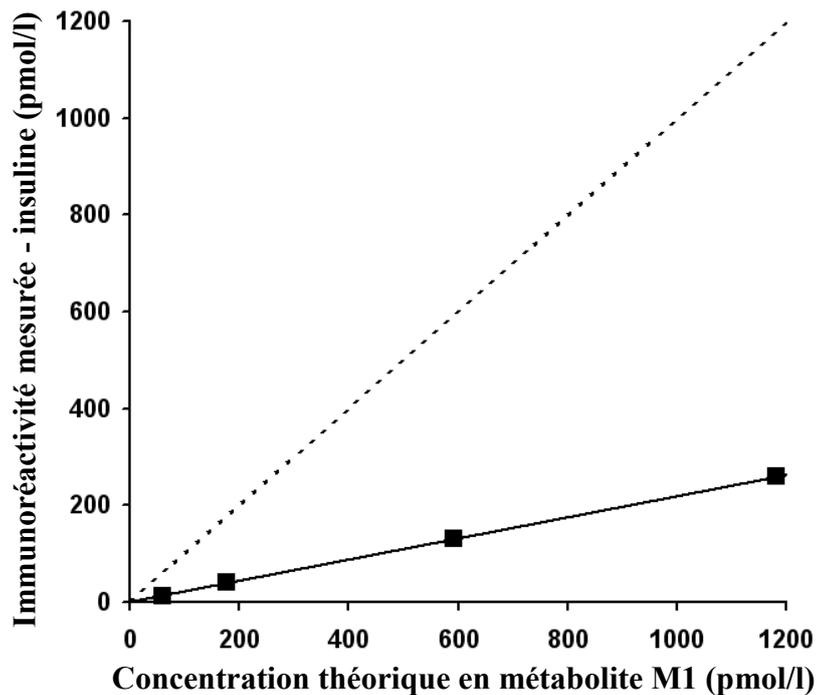


Figure 31 : Droite de régression de l'immunoréactivité de la trousse Insuline Elecsys vis-à-vis du métabolite de la glargine M1 en fonction de sa concentration théorique (diluant : PBS-BSA). Métabolite M1 : pente = 0,22 et ordonnée à l'origine = 1,0 pmol/l.

Tableau 10 : Immunoréactivité de la trousse Insuline Elecsys vis-à-vis du métabolite de la glargine M2 en fonction de sa concentration théorique (diluant : PBS-BSA).

Concentration de métabolite M2 (pmol/l)	Réactivité croisée (%)
59,1	< 2,4
177	< 0,8
591	< 0,2
1182	0,16
5911	0,12
11823	0,12

Les métabolites de la glargine (M1 et M2) présentent une réactivité croisée pour le dosage Bi-insuline IRMA proche de celle de la glargine en milieu tampon. Le dosage Insuline Elecsys ne reconnaît ni la glargine, ni le métabolite M2. Le métabolite M1 présente une réactivité croisée significative avec ce dosage, permettant d'envisager son utilisation pour la détermination spécifique de sa concentration dans un milieu biologique contenant la glargine et ses métabolites.

2.2. Biotransformation *in vitro*

2.2.1. Cinétiques

Un contrôle, constitué d'une solution de glargine de concentration 100 mU/l (591,2 pmol/l) diluée dans du PBS-BSA et incubée pendant 2 heures à 37°C, est dosé par la technique Insuline Elecsys. La valeur de l'immunoréactivité est restée inférieure à 0,200 mU/l (< 1,39 pmol/l ; limite de détection analytique du dosage).

La vitesse initiale de formation du métabolite M1 augmente avec la proportion de sérum additionné au milieu et atteint un maximum lorsque 30% de sérum sont ajoutés au milieu (Figure 32).

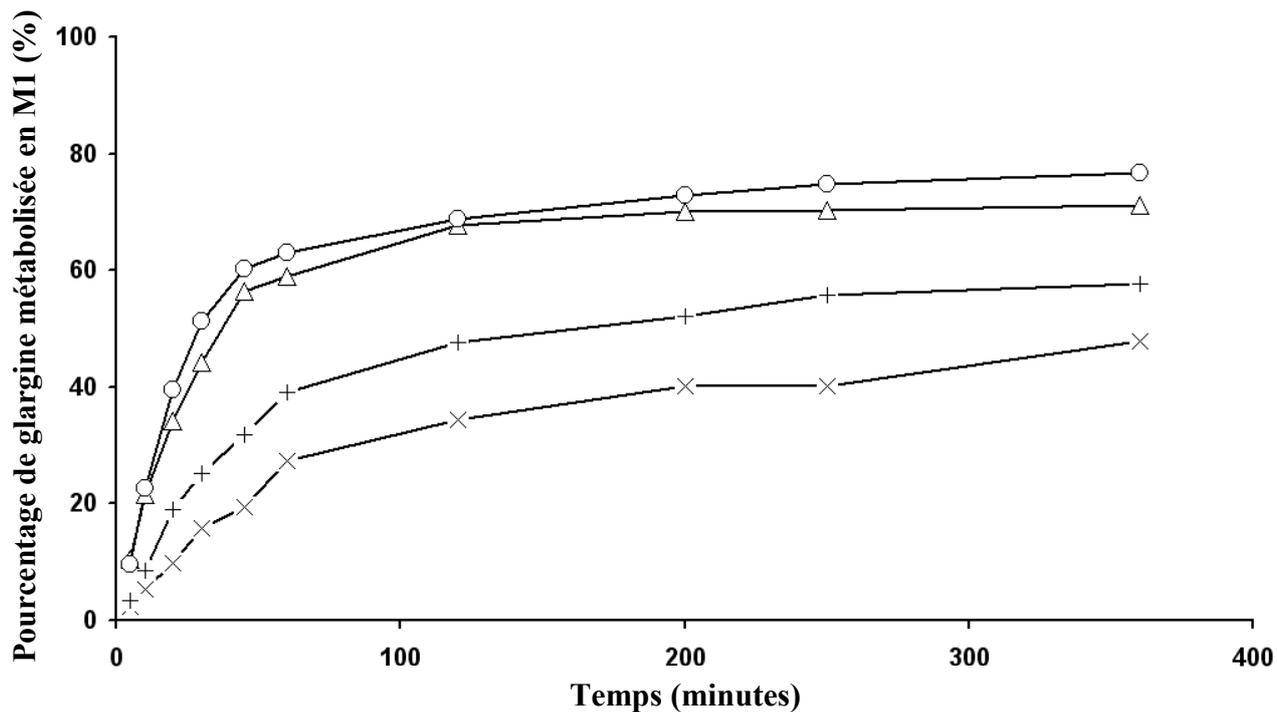


Figure 32 : Cinétique de biotransformation de la glargine mesurée par la technique Insuline Elecsys. Proportion de sérum : (°) 50%, (Δ) 30%, (+) 15%, (X) 10%. Concentration de glargine au temps 0 : 100 mU/l (591,2 pmol/l). Température d'incubation : 37°C.

La quantité de substrat (concentration en glargine) est augmentée sans phénomène de saturation jusqu'à 500 mU/l (2956 pmol/l) : la quantité de métabolite M1 augmente avec la concentration en glargine (Figure 33).

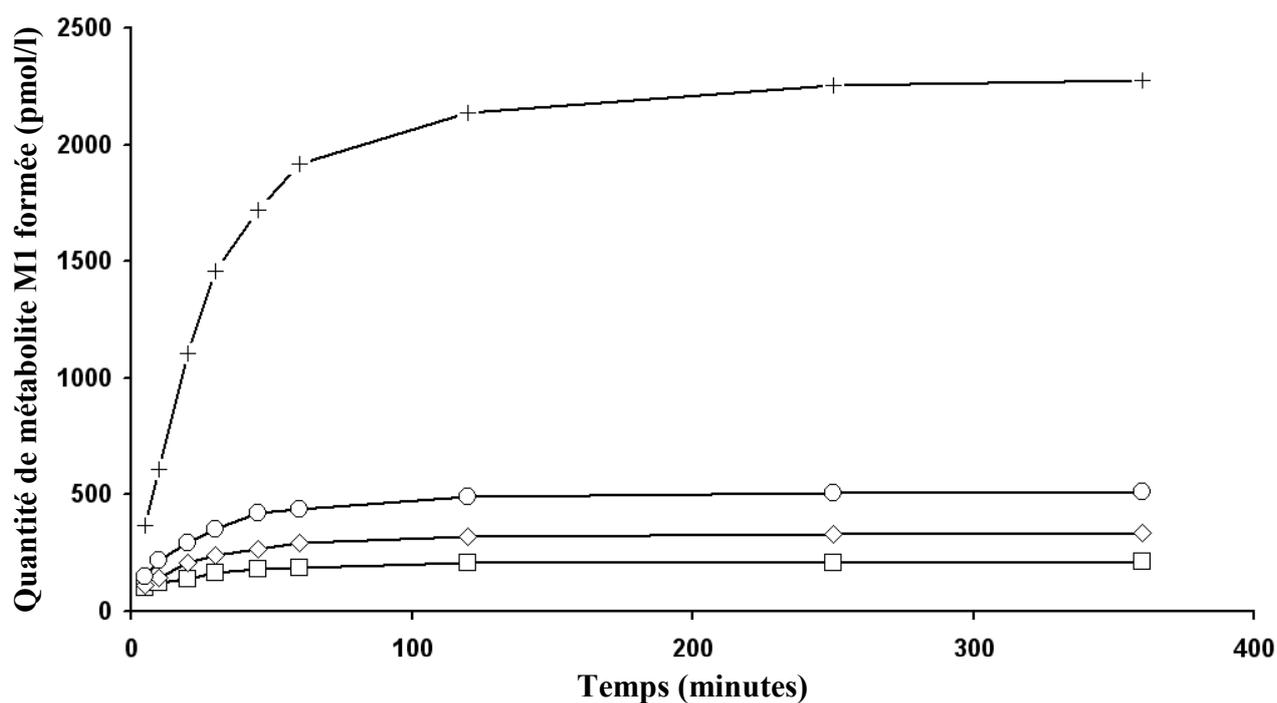


Figure 33 : Cinétique de biotransformation de la glargine mesurée par la technique Insuline Elecsys. Concentration de glargine au temps 0 : (+) 500 mU/l (2956 pmol/l), (°) 100 mU/l (591,2 pmol/l), (⋄) 60 mU/l (354,7 pmol/l), (□) 30 mU/l (177,3 pmol/l). Proportion de sérum : 30%. Température d'incubation : 37°C.

La vitesse initiale de formation du métabolite M1 augmente avec la température jusqu'à un maximum pour 37°C. A 50°C, la vitesse initiale de formation du métabolite est la même qu'à 37°C mais dans un deuxième temps la quantité de métabolite diminue, la glargine n'étant pas stable à 50°C (Figure 34).

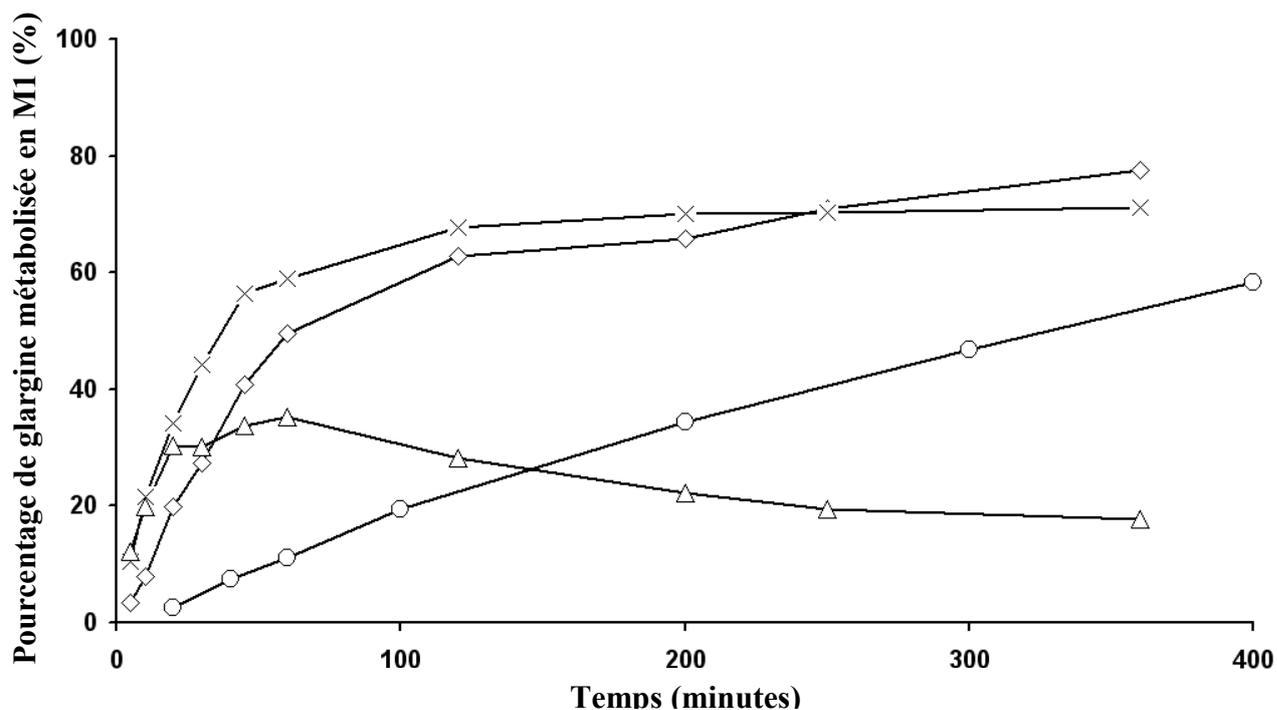


Figure 34 : Cinétique de biotransformation de la glargine mesurée par la technique Insuline Elecsys. Température d'incubation : (°) 4°C, (◇) 25°C, (X) 37°C, (Δ) 50°C. Concentration de glargine au temps 0 : 100 mU/l (591,2 pmol/l). Proportion de sérum : 30%.

2.2.2. Effets des anticoagulants et de la prise alimentaire

En moyenne, entre 7,9 et 79% de la glargine, incubée 30 minutes avec des sérums et plasmas de sujets sains, est transformée en métabolite M1 (Tableau 11). L'effectif trop petit de cette étude préliminaire ne permet aucune statistique.

Tableau 11 : Effet des anticoagulants, de la prise de nourriture et du temps d'incubation sur la biotransformation de la glargine par le sérum ou le plasma in vitro. 100 mU/l (591,2 pmol/l) de glargine sont incubés avec 90% de sérum ou de plasma pendant 30 minutes ou 2 heures à 37°C. Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) de glargine transformée en métabolite M1.

Incubation : 30 minutes								
Sujet	Sérum		Plasma Héparinate		Plasma EDTA		Plasma EDTA + Zn Cl ₂ 1 mmol/l	
	A jeun	Post-prandial	A jeun	Post-prandial	A jeun	Post-prandial	A jeun	Post-prandial
1	84,3	78,3	26,3	41,3	4,4	5,8	14,0	10,8
2	89,6	87,4	50,2	55,4	9,9	1,1	34,0	36,3
3	62,3	62,6	56,9	57,2	15,0	16,7	34,4	33,2
Moyenne	78,8	76,1	44,5	51,3	9,8	7,9	27,5	26,8
Ecart-type	14,5	12,5	16,1	8,7	5,3	8,0	11,7	13,9
Incubation : 2 heures								
Sujet	Sérum		Plasma Héparinate		Plasma EDTA			
	A jeun		A jeun		A jeun			
1	78,8		72,1		8,9			
2	79,1		79,1		21,6			
3	61,9		88,3		25,2			
Moyenne	73,3		79,8		18,5			
Ecart-type	9,8		8,2		8,6			

La prise de nourriture ne semble pas avoir d'influence sur la biotransformation de la glargine. La biotransformation sanguine de la glargine est moins importante dans des plasmas EDTA de sujets sains à jeun que dans les sérums des mêmes sujets. L'ajout de chlorure de zinc (1 mmol/l) au plasma EDTA des sujets sains à jeun lève partiellement l'inhibition de la biotransformation par l'EDTA. D'autre part, la biotransformation sanguine de glargine est plus faible dans le plasma (héparinate) que dans le sérum. Une cohorte plus importante de sujets sains est nécessaire pour le confirmer. Après 2 heures d'incubation à 37°C, les différences entre les expériences sur le sérum et le plasma des 3 sujets sont contradictoires ; ceci nécessite là encore des études complémentaires. Le sujet 3, en particulier, semble présenter un profil de biotransformation différent de celui des 2 autres sujets.

2.2.3. Variabilité inter-individuelle

Le pourcentage moyen de glargine métabolisée en M1 après 30 minutes d'incubation de 100 mU/l de glargine dans le sérum (Figure 35) est de 72% (écart-type : 11% ; intervalle : 46-98% ; n = 69). La distribution est normale ($p = 0,69$; test du χ^2). L'intervalle du 5^{ème} au 95^{ème} percentile va de 53% à 87%.

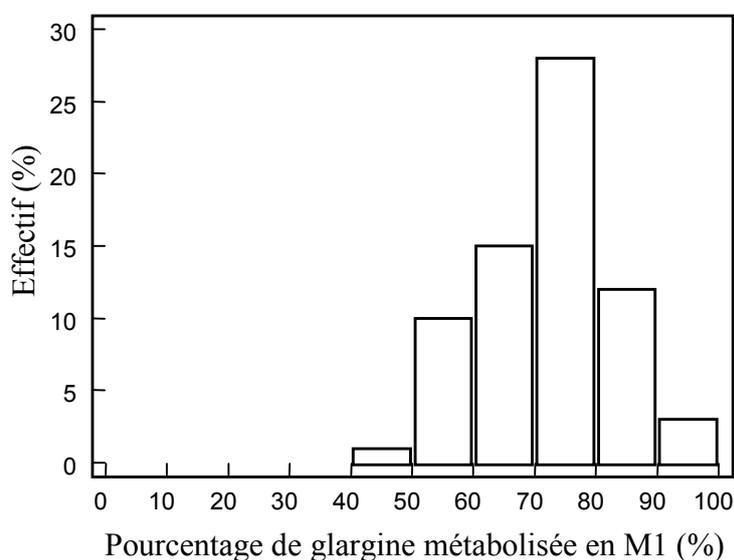


Figure 35 : Distribution de la biotransformation de glargine en métabolite M1 après 30 minutes d'incubation à 37°C de 69 sérums surchargés avec 100 mU/l (591,2 pmol/l ; 90% sérum / 10% glargine 1000 mU/l diluée dans PBS-BSA ; V/V).

2.2.4. Caractérisation de l'activité enzymatique

Effets de la carboxypeptidase B sur la glargine

La CPB est capable de transformer, en milieu tampon PBS-BSA, la glargine en une ou plusieurs molécules reconnues par le dosage Insuline Elecsys. En supposant, qu'il ne se forme que du métabolite M1, 9 U/l de CPB sont suffisantes pour dégrader en 1 heure 100% de 100 mU/l de glargine (Tableau 12).

Tableau 12 : Dégradation de l'insuline glargine par la carboxypeptidase B en milieu tampon PBS-BSA après 1 heure d'incubation à 37°C.

Carboxypeptidase B (U/l)	Pourcentage de glargine transformée en métabolite M1 (%)
9000	92
900	109
90	105
9	108
0,9	23
0,09	0,92

Effets d'inhibiteurs enzymatiques et de cations

Aux concentrations d'inhibiteur testées (concentrations élevées selon la littérature et/ou la limite de solubilité de l'inhibiteur), seuls les agents chélatants (EDTA, 1,10-phénanthroline) et les inhibiteurs de carboxypeptidase (EACA, GEMSA, PTCI) inhibent partiellement la biotransformation sérique de la glargine (Tableau 13). Le critère arbitraire retenu pour définir l'inhibition est une activité relative (pourcentage de glargine transformée en présence d'inhibiteur ou de cation / pourcentage de glargine transformée dans le contrôle ; exprimée en pourcentage) inférieure à 90%.

Tableau 13 : Effets des inhibiteurs de protéases et des cations sur la biotransformation de glargine en métabolite M1 *in vitro*. L'activité relative est déterminée en doublets après incubation à 37°C pendant 1 heure de 100 mU/l de glargine dans un pool de sérums (90%) et du PBS-BSA (10%) en présence d'inhibiteurs et de cations et exprimée en pourcentage de contrôles effectués dans les mêmes conditions en l'absence d'inhibiteurs et de cations.

	Concentration	Activité relative (%)
Inhibiteurs enzymatiques		
<i>Inhibiteurs des cystéine protéases</i>		
E-64	10 µmol/l	92
NEM	1 mmol/l	118
<i>Inhibiteurs des sérine protéases</i>		
AEBSF	1 mmol/l	118
SBTI	100 µg/ml	110
<i>Inhibiteurs des Cys/Sér protéases</i>		
Antipaine	100 µmol/l	133
Leupeptine	100 µmol/l	129
<i>Inhibiteur des aminopeptidases</i>		
Bestatine	40 µmol/l	96
<i>Inhibiteurs des carboxypeptidases</i>		
EACA	5 mg/ml	26
GEMSA	100 µmol/l	54
PTCI	500 µg/ml	64
<i>Inhibiteur des protéases aspartiques</i>		
Pepstatine A	1 µg/ml	115
<i>Agents chélatants</i>		
EDTA	1 mmol/l	85
1,10-phénanthroline	1 mmol/l	61
Cations		
Chlorure de calcium	1 mmol/l	106
Chlorure de magnésium	1 mmol/l	107
Chlorure de zinc	1 mmol/l	91

E-64: trans-époxy succinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane; NEM: N-éthylmaléimide; AEBSF: 4-(2-aminoéthyl) benzenesulfonyl fluorure hydrochlorure; SBTI: soybean trypsin inhibitor; EACA: ε-aminocaproic acid ou acide ε-aminocaproïque; GEMSA: 2-guanidinoéthylmercaptosuccinic acid ou acide 2-guanidinoéthylmercaptosuccinique ; PTCI: potato tuber carboxypeptidase inhibitor.

Chapitre 4 : Discussion

1. Evaluation analytique des immunodosages d'insuline

Les résultats des études précédentes sur les immunodosages de l'insuline laissaient envisager la possibilité de leur utilisation pour le dosage des analogues de l'insuline [11, 12, 287]. Notre étude conforte ces résultats. Parmi les immunodosages de l'insuline humaine précédemment testés, les dosages Bi-insulin IRMA et Insuline Elecsys sont particulièrement intéressants par leur complémentarité : le dosage Bi-insulin IRMA présente une réactivité croisée proche de 100% pour l'insuline lispro et aspart (en milieu tampon) et le dosage Insuline Elecsys est très spécifique de l'insuline humaine (en milieu tampon). Notre travail se propose d'étudier la faisabilité de la détermination de la concentration en analogue par simple soustraction entre le résultat du dosage non spécifique (Bi-insulin IRMA) et le résultat du dosage spécifique (Insuline Elecsys).

1.1. Comparaison Bi-insulin IRMA et Insuline Elecsys

Les techniques Bi-insulin IRMA et Insuline Elecsys sont sensiblement équivalentes lorsque la comparaison est menée sur des sérums et plasmas de patients non traités par insuline ou analogue : la pente de la droite de régression des résultats du dosage Bi-insulin IRMA en fonction des résultats du dosage Insuline Elecsys est de 1,1 et l'ordonnée à l'origine de 2,4 mU/l.

1.2. Choix d'un diluant

Le choix d'un diluant pour effectuer les essais de dilution d'insuline et d'analogues est difficile. Il est souhaitable de se placer dans un milieu le plus proche possible du sérum humain. Le tampon PBS-BSA seul donne des résultats parfois modérément supérieurs à la limite inférieure du domaine de mesure avec les 2 techniques. Lorsque ce tampon est utilisé, un témoin effectué dans les mêmes conditions sans insuline permet de s'affranchir de ce biais minime. Le pool de sérums traité au charbon actif semble donner des résultats plus proches de

0 par les deux techniques. Cependant, il n'est pas certain que de fines particules microscopiques de charbon invisibles à l'œil nu ne subsistent et perturbent les dosages. Le diluant Elecsys diminue le nombre de coups par minute d'environ 29% par rapport au standard de la trousse dans le dosage Bi-insulin IRMA. Enfin, le pool de sérums avec une concentration faible en insuline présente le désavantage de contenir une petite quantité d'insuline humaine.

Le milieu permettant d'obtenir dans toutes les régressions effectuées avec l'insuline humaine recombinante une pente la plus proche possible de 1 est le tampon PBS-BSA. L'utilisation de pools de sérums avec ou sans insuline paraît plus décevante, notamment avec le dosage Bi-insulin IRMA. Le diluant universel Elecsys présente les résultats les plus défavorables. Les études de réactivité croisée ont donc été menées en milieu tampon PBS-BSA et en milieu sérique (sérums non traités par le charbon actif).

1.3. Réactivité croisée des analogues

En milieu tampon PBS-BSA, le dosage Bi-insulin IRMA présente une réactivité croisée pour les analogues rapides de l'insuline humaine plus proche de 100% que les autres immunodosages testés par Owen et Robert en milieu BSA (une partie des résultats de cette étude est présentée dans le Tableau 7) : la réactivité croisée des analogues est comprise entre 8,9 et 126% selon les concentrations testées [11]. La réactivité croisée avec le dosage Bi-insulin IRMA est plus importante pour les analogues lents (> 140%) que pour les analogues rapides (proche de 100%). Les analogues lents et rapides partagent des modifications de leur structure dans la partie C-terminale de la chaîne B. Les analogues rapides (lispro et asparte) présentent des substitutions d'acides aminés alors que les analogues lents sont allongés soit par l'addition d'acides aminés (glargine) soit d'un acide gras (détémir). Toutes ces modifications (substitution et allongement) n'entravent pas la reconnaissance des analogues par le dosage Bi-insulin IRMA mais empêchent toute reconnaissance en milieu tampon par le dosage Insuline Elecsys. La substitution d'un acide aminé à l'extrémité C-terminale de la chaîne A de la glargine ne semble pas jouer un rôle significatif dans la reconnaissance par l'immunodosage. Les données des fabricants sont en accord avec nos résultats : pour le dosage Bi-insulin IRMA, l'anticorps anti-insuline mAb 19 est spécifique de la région A10-A17 de la molécule d'insuline (l'immunoréactivité de l'anticorps anti-insuline mAb P10 n'est pas connue) ; pour le dosage Insuline Elecsys, l'anticorps anti-insuline MAK-Bi (R1) est spécifique de la région A7-A10 et l'anticorps anti-insuline Fab-Ru est spécifique de

l'extrémité C-terminale de la chaîne B. Un nouvel analogue de l'insuline (glulisine) vient d'être commercialisé ; il sera intéressant de tester cette molécule qui est modifiée aux extrémités N- et C-terminales de la chaîne B. Les effets sur l'immunoréactivité de modifications à l'extrémité N-terminale de la chaîne B ne sont pas connues alors que les changements apportés à l'extrémité C-terminale de la chaîne B semblent préserver l'immunoréactivité vis-à-vis du dosage Bi-insulin IRMA et empêcher la reconnaissance par le dosage Insuline Elecsys. Ces hypothèses sont confortées par le profil d'immunoréactivité des métabolites M1 et M2 de la glargine en milieu tampon. En effet, le métabolite M2 est modifié par rapport à l'insuline à son extrémité C-terminale de la chaîne B : il est reconnu par le dosage Bi-insulin IRMA et non détecté par le dosage Insuline Elecsys. Le métabolite M1, reconnu par les 2 immunodosages, est semblable à l'insuline humaine à l'extrémité C-terminale de la chaîne B.

En milieu sérique, seules les insulines lispro, asparte et détémir ont été étudiées. En effet, après injection, la glargine subit un métabolisme conduisant à la formation de métabolites (M1 et M2 essentiellement) [232]. La ou les enzyme(s) participant à ce métabolisme pourraient être présente(s) dans le sérum : cette étude fait l'objet de la seconde partie de ce travail. Il semble donc difficile d'envisager de doser spécifiquement l'insuline glargine avec un ou une combinaison de deux immunodosage(s). Malgré l'intérêt certain de disposer d'un dosage spécifique, le laboratoire commercialisant l'insuline glargine n'a pas réussi à produire des anticorps spécifiques de cette molécule. Des études cliniques pour son évaluation dans le diabète de type 2 sont envisagées ; la ou les technique(s) de dosage et la fraction à doser (insuline totale, glargine intacte ou glargine avec ses métabolites) seront des paramètres importants.

En milieu sérique, la réactivité croisée des 3 analogues vis-à-vis du dosage Insuline Elecsys n'est pas modifiée. Par contre, le dosage Bi-insulin IRMA semble sensible à un effet matrice qui diminue la réactivité croisée de l'ensemble des molécules testées. Cette diminution de l'immunoréactivité est inférieure à 30% avec les analogues rapides testés et de 11% avec le détémir.

1.4. Effet de l'hémolyse sur les analogues

L'IDE (*insulin-degrading enzyme* ; EC 3.4.24.56) contenue dans les globules rouges contamine le sérum en cas d'hémolyse et catalyse la dégradation de l'insuline dans

l'échantillon. Ainsi, l'hémolyse est un piège reconnu du dosage de l'insuline humaine sérique, conduisant habituellement à des résultats faussement abaissés pour les dosages immunométriques, comme cela a été démontré avec le dosage Bi-insulin IRMA [8]. Notre étude a montré que l'immunoréactivité des analogues lispro, asparte et glargine ne devrait pas être déterminée dans des échantillons hémolysés.

1.5. Interférence des anticorps anti-insuline

Une majorité de patients traités par insuline humaine peuvent développer des anticorps anti-insuline [288]. Le profil immunologique des patients traités par analogue comprend des anticorps anti-insuline non spécifiques (le sérum du patient réagit à la fois avec les analogues et l'insuline humaine), des anticorps spécifiques de l'insuline humaine et des anticorps spécifiques des analogues [185, 289]. L'interférence des anticorps anti-insuline a déjà été décrite avec le dosage Bi-insulin IRMA pour l'insuline lispro [287]. Notre étude a révélé que cette interférence est également retrouvée avec les analogues asparte et glargine. Il est donc recommandé de déterminer l'immunoréactivité de l'insuline libre chez les patients diabétiques après précipitation au PEG des anticorps anti-insuline éventuellement présents.

La quantification de l'insuline sérique en pratique clinique courante est effectuée à l'aide d'immunodosages. Des difficultés sont apparues depuis que les analogues ont été commercialisés. Les immunodosages de l'insuline humaine souffrent d'un manque de spécificité. La réactivité croisée des analogues de l'insuline établie en milieu tampon semblait montrer que seul l'immunodosage Insuline Elecsys était spécifique de l'insuline humaine [11]. En réalité, notre étude a montré que l'un des métabolites principaux (M1) de l'insuline glargine est également reconnu par ce dosage.

Les immunodosages de l'insuline humaine commercialement disponibles sont largement utilisés pour la détermination des concentrations des analogues de l'insuline dans les études de pharmacocinétique. Dans ces études impliquant des analogues, l'« insuline immunoréactive » (comprenant l'insuline endogène, l'insuline humaine recombinante, les analogues et leurs éventuels métabolites) est fréquemment mesurée. Un tel procédé implique

une immunoréactivité et une bioactivité équivalentes pour toutes les insulines présentes dans le sérum.

Puisque les immunodosages de l'insuline humaine sont largement utilisés, Owen et Roberts [11] ont suggéré que l'estimation de la concentration sérique d'analogue puisse être effectuée par combinaison d'un immunodosage spécifique de l'insuline humaine (exemple, Insuline Elecsys) et d'un immunodosage non spécifique de l'insuline. Ce procédé semble impossible avec la glargine qui est métabolisée en molécules plus ou moins immunoréactives avec les différents immunodosages. Un facteur correctif tenant compte de la réactivité croisée du détémir devra être utilisé pour l'insuline détémir qui présente un profil d'immunoréactivité très dissemblable de celui de l'insuline humaine. Du fait d'une réactivité croisée proche de celle de l'insuline humaine avec le dosage Bi-insulin IRMA, les concentrations des analogues rapides (lispro et asparte) pourraient être déterminées directement par soustraction des résultats de deux dosages.

L'annexe 3 présente un modèle de fiche de renseignements qu'il serait utile que le prescripteur remplisse lorsqu'une demande de dosage d'insuline est formulée pour un patient sous insulinothérapie. D'autre part, les annexes 4, 5 et 6 proposent des modèles de fiches de prescription de dosage d'insuline lispro, asparte et détémir, respectivement.

2. Etude de la biotransformation de la glargine *in vitro*

Alors que la réactivité croisée de l'insuline glargine avec le dosage Insuline Elecsys est indétectable en milieu tampon, les essais de sa détermination en milieu sérique ont échoué : l'immunoréactivité mesurée avec ce dosage n'était absolument pas reproductible lorsque la durée d'incubation de la glargine en milieu sérique et la température n'étaient pas contrôlées. Puisque l'insuline glargine est métabolisée *in vivo*, nous avons suspecté la persistance *in vitro* d'une activité métabolique résiduelle. L'étude de la réactivité croisée des principaux métabolites M1 (insuline Gly^{A21}) et M2 (insuline Gly^{A21}, des-Thr^{B30}) en milieu tampon a permis de conforter cette hypothèse puisque M1 présente une réactivité croisée de 22,4% pour le dosage Insuline Elecsys. Nous avons mis à profit ce manque de spécificité pour étudier la biotransformation sérique et plasmatique de la glargine en métabolite M1 *in vitro*.

Aucune immunoréactivité n'a pu être détectée avec le dosage Insuline Elecsys lorsque la glargine est incubée sans sérum humain, confirmant ainsi la nécessité de la présence de composant(s) sérique(s) pour effectuer la transformation de la glargine. La biotransformation est inhibée lorsque le sang est prélevé sur EDTA (9,8% au lieu de 45% dans le plasma hépariné) ; l'EDTA semble inhiber l'activité de ce(s) composant(s). Un mécanisme enzymatique a ainsi été envisagé. En conséquence, le temps d'incubation et la température ont été contrôlés. La cinétique d'apparition du métabolite M1 est sensible à la concentration en enzyme (proportion de sérum dans le milieu), à la concentration en substrat (concentration de glargine dans le milieu) et à la température. La vitesse initiale maximale de formation du métabolite est atteinte avec 30% de sérum dans le milieu d'incubation. Aucune limite de la capacité de catalyse n'a pu être déterminée jusqu'à une concentration « supra-physiologique » de 500 mU/l. Ces résultats suggèrent que la formation du métabolite M1 *in vivo* n'est pas susceptible d'être saturée aux concentrations thérapeutiques de glargine.

Dans les études cliniques, les prélèvements sanguins veineux en vue du dosage de la glargine intacte pourraient être effectués sur EDTA (pour limiter la biotransformation *in vitro* de la glargine) et congelés immédiatement puisqu'une biotransformation se produit également à 4°C. Ce procédé pourrait se révéler insuffisant pour stabiliser la concentration de glargine intacte. En effet, d'une part le dosage Insuline Elecsys ne permettant pas de déterminer les concentrations en métabolite M2, les conditions de sa formation *in vitro* sont inconnues ;

d'autre part, la biotransformation en métabolite M1 se poursuit très probablement pendant l'incubation du dosage.

Malgré l'utilisation de concentrations élevées, un inhibiteur complet du mécanisme enzymatique n'a pas pu être décrit : il n'a donc pas été possible de contrôler de façon précise le temps d'incubation et les constantes enzymatiques n'ont pu être calculées (la glargine continue probablement à se transformer en M1 pendant l'incubation du dosage Insuline Elecsys). Une inhibition complète permettrait une détermination précise des valeurs des constantes catalytiques.

L'inhibition de la biotransformation par l'EDTA et la 1,10-phénanthroline suggèrent la participation d'une métalloprotéase-zinc à la biotransformation de la glargine. De plus, l'inhibition de l'EDTA est partiellement antagonisée par l'ion Zn^{2+} . Les métallocarboxypeptidases catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques à l'extrémité C-terminale des protéines et des peptides [290].

Parmi les métallocarboxypeptidases, la carboxypeptidase H (E.C. 3.4.17.10, ou carboxypeptidase E, CPH, CPE), extraite d'un insulinoïde, est capable de retirer les acides aminés basiques de l'extrémité C-terminale de la diarginyl-insuline (insuline avec 2 résidus arginine aux positions B31 et B32), produit intermédiaire de la transformation de la proinsuline en insuline. Cependant, le pH optimum de la CPH est de l'ordre de 5-6 et cette enzyme a une faible activité à un pH supérieur à 6,5 [291]. De plus, la CPH est principalement localisée dans les tissus endocrines (pancréas) et neuroendocrines. D'autre part, nous avons montré *in vitro* en milieu tampon que la CPB extraite de pancréas de porc, enzyme présente essentiellement dans le système digestif catalysant le clivage préférentiel des lysines et arginines à l'extrémité C-terminale des peptides, est capable de dégrader l'insuline glargine en une ou plusieurs molécule(s) reconnue(s) par le dosage Insuline Elecsys. La probabilité que la/les forme(s) moléculaire(s) reconnue(s) dans cette étude soi(en)t le métabolite M1, est élevée. Les arguments principaux sont le profil de reconnaissance des analogues par ce dosage et la transformation de la diarginyl-insuline en insuline *in vivo*.

Dans le plasma, 2 métallocarboxypeptidases sont présentes : la carboxypeptidase U (EC 3.4.17.20, carboxypeptidase R, CPU, CPR, *activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*) et la carboxypeptidase N (E.C. 3.4.17.3, ou CPN, lysine carboxypeptidase, *anaphylatoxin inactivator*, kininase I) [292, 293]. Les deux carboxypeptidases peuvent retirer les résidus lysine et arginine à l'extrémité C-terminale des protéines et des peptides. La CPU a

une préférence pour l'arginine C-terminale par rapport à la lysine alors que la CPN est plus spécifique de la lysine [294].

La procarboxypeptidase U plasmatique, proenzyme de la CPU, est présente dans le plasma à une concentration de 4-10 µg/ml et a récemment été renommée TAFI (*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*) du fait de son rôle dans la coagulation et la fibrinolyse [293]. TAFI est activée protéolytiquement au cours de la coagulation sanguine par le complexe thrombine-thrombomoduline. Ainsi, l'activité de TAFI n'est pas détectable dans le plasma humain, mais apparaît après la coagulation du sang. L'activité enzymatique de la forme activée de TAFI (TAFIa, CPU) est très sensible à la température (demi-vie de TAFIa : 10 minutes à 37°C, 45 minutes à 30°C, plusieurs heures à 22°C et stable à 0°C) [293]. Ainsi, la participation de TAFIa à la biotransformation sérique et plasmatique *in vitro* de la glargine est possible. En effet, après prélèvement dans un tube sec, le sang coagule produisant probablement TAFIa dans le sérum. Après acheminement, décantation, aliquotage et mélange des sérums pour former un pool, la quantité résiduelle de TAFIa permettrait d'expliquer au moins en partie la différence de biotransformation avec le plasma. La participation de la CPU est possible *in vivo* (demi-vie très brève) mais reste à démontrer. L'activité de TAFIa peut être stabilisée par des agents comme l'héparine [293]. Une étude récente [295] a montré que la concentration plasmatique et l'activité de TAFI sont significativement plus élevées chez les patients diabétiques de type 2. Aubert *et coll.* [296] ont établi que les concentrations sériques de TAFI sont plus élevées chez le sujet obèse sans rapport avec la résistance à l'insuline. Toutefois, puisque le patient diabétique présente une coagulation perturbée [297], TAFIa pourrait avoir une importance chez les patients obèses diabétiques.

La CPN est sécrétée par le foie dans la circulation où elle est présente à forte concentration (30 µg/ml). La CPN est constitutivement active, stable dans le plasma et joue un rôle majeur de régulation comme inactivateur d'une grande variété de peptides et protéines puissantes telles que les kinines et les anaphylatoxines [290]. La CPN est le meilleur candidat pour une participation au processus de biotransformation *in vitro* de la glargine en métabolite M1.

Toutefois, les inhibiteurs de carboxypeptidases (EACA, GEMSA, PTCI) n'inhibent pas entièrement la biotransformation de la glargine dans les conditions expérimentales suggérant une forte activité de ces enzymes dans le sérum ou la participation d'autre(s) enzyme(s). Le sujet sain 3 (Tableau 11) présente un profil de biotransformation différent des

2 autres sujets sains en fonction du mode de prélèvement (avec ou sans héparine). Ce résultat est cohérent avec une participation de plusieurs enzymes à la biotransformation de glargine en métabolite M1.

La variabilité inter-individuelle de la glargine a été étudiée dans la littérature [298] : chez 18% des patients diabétiques de type 1, une injection par jour de glargine n'est pas suffisante pour maintenir la normoglycémie. La bioactivité pharmacologique des métabolites de la glargine n'est pas connue chez l'homme, même si elle est comparable à celle de la glargine chez l'animal. Des différences de l'activité enzymatique dans la population diabétique pourraient en partie expliquer la variabilité inter-individuelle. *In vitro*, la biotransformation de glargine en M1 représente de 46% à 98% de la glargine après 30 minutes d'incubation à 37°C. *In vivo*, la glargine sous forme précipitée dans le dépôt sous-cutané est probablement en grande partie protégée de tout métabolisme ; de plus, une proportion importante de la glargine sanguine est vraisemblablement éliminée avant métabolisme (même si l'élimination de la glargine est plus lente que celle de l'insuline humaine). L'activité enzymatique mesurée ici *in vitro* et sa variabilité inter-individuelle sont assez importantes mais ne représentent pas la totalité du métabolisme *in vivo*. En effet, d'une part, il existe un autre métabolite (M2) et, d'autre part, après dissolution la glargine est également métabolisée dans les tissus sous-cutanés.

La population de l'étude de variabilité inter-individuelle était composée de patients non diabétiques ambulants et hospitalisés. Ces données devront être confirmées dans une population de patients diabétiques et la bioactivité chez l'homme devra être déterminée avant de conclure à la pertinence clinique de la variabilité du métabolisme de la glargine.

Ces résultats préliminaires devront être complétés par des études pour caractériser le métabolisme de la glargine notamment chez le patient diabétique ou dans des situations cliniques particulières (traitement par inhibiteur enzymatique, par héparine, etc.).

CONCLUSION

Nous avons évalué deux dosages immunométriques de l'insuline humaine (Bi-insulin IRMA et Insuline Elecsys) en vue de leur utilisation pour la détermination des concentrations sériques ou plasmatiques en analogues de l'insuline au cours des études de pharmacocinétique.

D'une part, un dosage peu spécifique permet de déterminer un résultat que nous appellerons « insuline immunoréactive » incluant l'insuline de séquence humaine (endogène ou recombinante) et l'analogue. Un tel dosage devrait si possible reconnaître les 2 insulines avec de préférence une réactivité croisée du même ordre de grandeur. Le dosage Bi-insulin IRMA répond parfaitement à ce critère pour les analogues rapides (lispro et asparte). Pour les analogues lents (glargine et détémir), la réactivité croisée étant différente de celle de l'insuline, un facteur correctif pourrait éventuellement être utilisé. De plus, la glargine est transformée *in vivo* et *in vitro* en métabolites, ce qui rend encore plus difficile toute détermination. Les pièges rencontrés pour le dosage de l'insuline (hémolyse et anticorps anti-insuline) sont valables également pour la détermination des analogues avec le dosage Bi-insulin IRMA.

D'autre part, un dosage plus spécifique permet de mesurer l'insuline de séquence humaine. Le dosage Insuline Elecsys, spécifique de l'insuline humaine ne reconnaît aucun des analogues. Néanmoins, avec ce dosage également, il sera difficile en présence de glargine de doser spécifiquement l'insuline humaine. En effet, l'un des métabolites principaux de la glargine (M1) croise significativement avec ce dosage.

Au total, le calcul de la concentration des analogues rapides est possible, dans le sérum de patients ne recevant qu'un seul analogue, par simple soustraction entre les résultats des deux dosages. Ce calcul est difficilement envisageable pour l'insuline glargine (métabolisme). Le détémir est lié à plus de 98% à l'albumine sérique. Seule la fraction libre (non liée) est biologiquement active. Avant d'envisager son dosage, la fraction cliniquement pertinente (libre ou totale) devra être clarifiée.

Les limites de cette méthode de calcul sont les mêmes que celles de la détermination de l'insuline humaine. En effet, au cours de l'hémolyse les hématies libèrent l'IDE (Insulin Degrading Enzyme) qui détruit l'insuline mais également les analogues de l'insuline. Ceci conduira le biologiste à écarter tout échantillon présentant des traces d'hémolyse.

Les anticorps anti-insuline, présents chez une majorité de patients diabétiques de type 1, interfèrent avec le dosage de l'insuline mais également avec celui des analogues de l'insuline. Une étape pré-analytique de précipitation de ces anticorps avec du polyéthylène glycol (PEG) permettra d'éviter l'interférence éventuelle de ces anticorps.

Enfin, notre méthode de calcul devra être validée définitivement sur des prélèvements de patients traités par comparaison avec une technique de référence qui n'existe pas actuellement pour le dosage dans le sérum. Une seule publication [252] fait état de la détermination des analogues de l'insuline dans le sérum après extraction par CLHP couplée à la spectrométrie de masse. Cette technique n'est pour le moment que qualitative (contrôle dans des cas de dopage). Les immunodosages de l'insuline humaine, contrairement à ce type de techniques, sont largement disponibles et leur utilisation est envisageable sur de grandes séries dans des études multicentriques.

*

* *

Le défaut de spécificité du dosage Insuline Elecsys, nous a permis d'évaluer *in vitro* la biotransformation de l'insuline glargine. La technique Elecsys a permis la mise en évidence et la caractérisation d'une biotransformation sérique de la glargine qui se révèle être un processus enzymatique impliquant probablement une ou des carboxypeptidase(s) sérique(s). La formation du métabolite M1 est rapide et non négligeable. L'amplitude de la variabilité des résultats de la biotransformation au sein d'une population non diabétique ne reflète probablement qu'une partie de l'ensemble de la variabilité du métabolisme de la glargine. Cette variabilité inter-individuelle devra être confirmée *in vivo* par des études pharmacocinétiques avec des patients diabétiques traités par insuline glargine et corrélée aux besoins en insuline glargine des patients. L'étape préalable aux études de pharmacocinétique chez l'homme de l'insuline glargine est la synthèse ou la sélection d'un inhibiteur total (ou d'un mélange d'inhibiteurs) des enzymes sériques (carboxypeptidases) impliquées dans son

métabolisme pour bloquer sa biotransformation après prélèvement sanguin. Nos travaux devraient faciliter cette mise au point.

En conclusion, nos travaux valident deux immunodosages ayant un profil d'immunoréactivité différent en vue de leur utilisation dans l'étude des analogues de l'insuline *in vitro* (notamment pour des études de biotransformation) ou *in vivo* (pour des études de pharmacocinétique).

BIBLIOGRAPHIE

1. Chevenne, D., F. Trivin, et D. Porquet, Insulin assays and reference values. *Diabetes Metab*, 1999. 25: p. 459-76.
2. Clark, P.M., Assays for insulin, proinsulin(s) and C-peptide. *Ann Clin Biochem*, 1999. 36: p. 541-64.
3. Crowther, N.J.etI.P. Gray, Immunometric assays of insulin and its precursors. *Journal of Clinical Ligand Assay*, 1996. 19: p. 112-20.
4. Bowsher, R.R., R.A. Lynch, P. Brown-Augsburger, P.F. Santa, W.E. Legan, J.R. Woodworth, et R.E. Chance, Sensitive RIA for the specific determination of insulin lispro. *Clin Chem*, 1999. 45: p. 104-10.
5. Andersen, L., P.N. Jorgensen, L.B. Jensen, et D. Walsh, A new insulin immunoassay specific for the rapid-acting insulin analog, insulin aspart, suitable for bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Clin Biochem*, 2000. 33: p. 627-33.
6. Rave, K.M., L. Nosek, A. de-la-Pena, M. Seger, C.S. Ernest, 2nd, L. Heinemann, R.P. Batycky, et D.B. Muchmore, Dose response of inhaled dry-powder insulin and dose equivalence to subcutaneous insulin lispro. *Diabetes care*, 2005. 28: p. 2400-5.
7. Griffen, S.C., K. Oostema, K.L. Stanhope, J. Graham, D.M. Styne, N. Glaser, D.E. Cummings, M.H. Connors, et P.J. Havel, Administration of Lispro Insulin with Meals Improves Glycemic Control, Increases Circulating Leptin, and Suppresses Ghrelin, Compared with Regular/NPH Insulin in Female Patients with Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. 91: p. 485-91.
8. Chevenne, D., A. Letailleur, F. Trivin, et D. Porquet, Effect of hemolysis on the concentration of insulin in serum determined by RIA and IRMA. *Clin Chem*, 1998. 44: p. 354-6.
9. El Kenz, H.etP. Bergmann, Evaluation of immunochemiluminometric assays for the measurement of insulin and C-peptide using the ADVIA Centaur. *Clin Lab*, 2004. 50: p. 171-4.
10. Sapin, R., The interference of insulin antibodies in insulin immunometric assays. *Clin Chem Lab Med*, 2002. 40: p. 705-8.
11. Owen, W.E.etW.L. Roberts, Cross-reactivity of three recombinant insulin analogs with five commercial insulin immunoassays. *Clin Chem*, 2004. 50: p. 257-9.
12. Moriyama, M., N. Hayashi, C. Ohyabu, M. Mukai, S. Kawano, et S. Kumagai, Performance evaluation and cross-reactivity from insulin analogs with the ARCHITECT insulin assay. *Clin Chem*, 2006. 52: p. 1423-6.

13. Laguesse, E., Sur la formation des îlots de Langerhans dans le pancréas. *Comptes rendus hebdomadaires des séances et mémoires de la société de biologie*, 1893. 5: p. 819-20.
14. von Mering, J.etO. Minkowski, Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 1890. 26: p. 371-87.
15. Opie, E.L., The relation of diabetes mellitus to lesions of the pancreas. Hyaline degeneration of the islands of Langerhans. *J Exp Med*, 1900. 5: p. 527-40.
16. Rosenfeld, L., Insulin: discovery and controversy. *Clin Chem*, 2002. 48: p. 2270-88.
17. Schäfer, E.A., An introduction to the study of th endocrine glands and internal secretions. 1914, Stanford, Calif.: The University. 94p.
18. De Meyer, J., Action de la sécrétion interne du pancréas sur différents organes et en particulier sur la sécrétion rénale. *Arch Fisiol*, 1909. 7: p. 96-9.
19. Zuelzer, G., Versuche einer spezifischen Fermenttherapie des Diabetes. *Für experimentelle Pathologie und Therapie*, 1908. 5: p. 307-18.
20. Scott, E.L., On the influence of intravenous injections of an extract of the pancreas on experimental pancreatic diabetes. *Am J Physiol*, 1912. 29: p. 306-10.
21. Kleiner, I.S., The action of intravenous injections of pancreas emulsions in experimental diabetes. *J Biol Chem*, 1919. 40: p. 153-70.
22. Murlin, J.R.etB. Kramer, The influence of pancreatic and duodenal extracts on the glycosuria and the respiratory metabolism of depancreatized dogs. *J Biol Chem*, 1913. 15: p. 365-83.
23. Paulesco, N.C., Action de l'extrait pancréatique injecté dans le sang, chez un animal diabétique. *C R Seances Soc Biol Fil*, 1921. 85: p. 555-9.
24. Barron, M., The relation of the islets of Langerhans to diabetes with special reference to cases of pancreatic lithiasis. *Surg Gynec Obstet*, 1920. 31: p. 437-48.
25. Ssobolew, L.W., Zur normalen und pathologischen Morphologie der inneren Secretion der Bauchspeicheldrüse. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 1902. 168: p. 91-128.
26. Banting, F.G., The history of insulin. *Edinburgh Med J*, 1929. 36: p. 1-18.
27. Banting, F.G.etC.H. Best, The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med*, 1922. 7: p. 251-66.
28. Banting, F.G., C.H. Best, et J.J.R. Mcleod, The internal secretion of the pancreas [Résumé]. *Am J Physiol*, 1922. 59: p. 479.
29. Banting, F.G., C.H. Best, J.B. Collip, W.R. Campbell, et A.A. Fletcher, Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. Preliminary report. *Can Med Assoc J*, 1922. 12: p. 141-6.

30. Banting, F.G., C.H. Best, J.B. Collip, W.R. Campbell, A.A. Fletcher, J.J.R. Macleod, et E.C. Noble, The effect produced on diabetes by extracts of pancreas. *Trans Assoc Am Physicians*, 1922. 186: p. 654.
31. Collip, J.B., The original method as used for the isolation of insulin in semipure form for the treatment of the first clinical cases [Résumé]. *J Biol Chem*, 1923. 55: p. xl.
32. Best, C.H.etD.A. Scott, The preparation of insulin. *J Biol Chem*, 1923. 57: p. 709-23.
33. Best, C.H., The first clinical use of insulin. *Diabetes*, 1956. 5: p. 65-7.
34. Hagedorn, H.C., B.N. Jensen, N.B. Krarup, et I. Wodstrup, Protamine insulinate. *JAMA*, 1936. 106: p. 177-80.
35. Gualandi-Signorini, A.M.etG. Giorgi, Insulin formulations--a review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2001. 5: p. 73-83.
36. Sanger, F., Sequences, sequences, and sequences. *Annu Rev Biochem*, 1988. 57: p. 1-28.
37. Zahn, H., My journey from wool research to insulin. *J Pept Sci*, 2000. 6: p. 1-10.
38. Katsoyannis, P.G., Synthetic insulins. *Recent Prog Horm Res*, 1967. 23: p. 505-63.
39. Du, Y.C., Y.S. Zhang, Z.X. Lu, et C.L. Tsou, Resynthesis of insulin from its glyceryl and phenylalanyl chains. *Sci Sin*, 1961. 10: p. 84-104.
40. De-Meyts, P., Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays*, 2004. 26: p. 1351-62.
41. Yalow, R.S.etS.A. Berson, Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, 1959. 184 (Suppl 21): p. 1648-9.
42. Yalow, R.S.etS.A. Berson, Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest*, 1960. 39: p. 1157-75.
43. Dunn, M.F., Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer -- a review. *Biometals*, 2005. 18: p. 295-303.
44. Baker, E.N., T.L. Blundell, J.F. Cutfield, S.M. Cutfield, E.J. Dodson, G.G. Dodson, D.M. Hodgkin, R.E. Hubbard, N.W. Isaacs, C.D. Reynolds, et et al., The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1988. 319: p. 369-456.
45. Blundell, T.L., G.G. Dodson, D.C. Hodgkin, et D.A. Mercola, Insulin: the structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology. *Adv Protein Chem*, 1972. 26: p. 279-402.
46. Dodson, G.G.etJ.L. Whittingham, Insulin: sequence, structure and function - a story of surprises, in *Insulin and related proteins - structure to function and pharmacology*, M. Federwisch, M.L. Dieken, et P. De Meyts, Editors. 2002, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Boston, London. p. 29-39.
47. Chang, X., A.M. Jorgensen, P. Bardrum, et J.J. Led, Solution structures of the R6 human insulin hexamer. *Biochemistry*, 1997. 36: p. 9409-22.

48. Wollmer, A., T-R transition, in *Insulin and related proteins - structure to function and pharmacology*, M. Federwisch, M.L. Dieken, et P. De Meyts, Editors. 2002, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Boston, London. p. 77-89.
49. Bloom, C.R., N.C. Kaarsholm, J. Ha, et M.F. Dunn, Half-site reactivity, negative cooperativity, and positive cooperativity: quantitative considerations of a plausible model. *Biochemistry*, 1997. 36: p. 12759-65.
50. Nussey, S.etS. Whitehead, *Endocrinology. An integrated approach*. 2001, Oxford: Bios scientific.
51. Orci, L., J.D. Vassalli, et A. Perrelet, La production de l'insuline. *Pour la science*, 1988. 133: p. 36-47.
52. Steiner, D.F.etP.E. Oyer, The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc Nalt Acad Sci USA*, 1967. 57: p. 473-80.
53. Rhodes, C.J., S. Shoelson, et P.A. Halban, Insulin biosynthesis, processing, and chemistry, in *Joslin's diabetes mellitus*, C.R. Kahn, G.L. King, A.C. Moses, G.C. Weir, A.M. Jacobson, et R.J. Smith, Editors. 2005, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 65-76.
54. Csorba, T.R., Proinsulin: biosynthesis, conversion, assay methods and clinical studies. *Clin Biochem*, 1991. 24: p. 447-54.
55. Dodson, G.etD. Steiner, The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol*, 1998. 8: p. 189-94.
56. Marques, R.G., M.J. Fontaine, et J. Rogers, C-peptide: much more than a byproduct of insulin biosynthesis. *Pancreas*, 2004. 29: p. 231-8.
57. Halban, P.A., Proinsulin processing in the regulated and the constitutive secretory pathway. *Diabetologia*, 1994. 37 (Suppl 2): p. S65-72.
58. Bataille, D., Mécanismes moléculaires de l'insulinosécrétion. *Diabetes Metab*, 2002. 28 (6 Suppl): p. 4S7-13.
59. Goodge, K.A.etJ.C. Hutton, Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic beta-cell. *Semin Cell Dev Biol*, 2000. 11: p. 235-42.
60. Steiner, D.F., The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol*, 1998. 2: p. 31-9.
61. Rouille, Y., S.J. Duguay, K. Lund, M. Furuta, Q. Gong, G. Lipkind, A.A. Oliva, Jr., S.J. Chan, et D.F. Steiner, Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Front Neuroendocrinol*, 1995. 16: p. 322-61.
62. Seidah, N.G., M. Chretien, et R. Day, The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie*, 1994. 76: p. 197-209.
63. Rorsman, P.etE. Renstrom, Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 2003. 46: p. 1029-45.

64. Michael, D.J., R.A. Ritzel, L. Haataja, et R.H. Chow, Pancreatic beta-cells secrete insulin in fast- and slow-release forms. *Diabetes*, 2006. 55: p. 600-7.
65. Gerber, S.H.etT.C. Sudhof, Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes*, 2002. 51 (Suppl 1): p. S3-11.
66. Henquin, J.C., Cell biology of insulin secretion, in *Joslin's diabetes mellitus*, C.R. Kahn, G.L. King, A.C. Moses, G.C. Weir, A.M. Jacobson, et R.J. Smith, Editors. 2005, Lippincott Williams & Willkins: Philadelphia. p. 84-102.
67. Deeney, J.T., M. Prentki, et B.E. Corkey, Metabolic control of beta-cell function. *Semin Cell Dev Biol*, 2000. 11: p. 267-75.
68. Nesher, R., E. Anteby, M. Yedovizky, N. Warwar, N. Kaiser, et E. Cerasi, Beta-cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose. *Diabetes*, 2002. 51 (Suppl 1): p. S68-73.
69. Mears, D., Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca(2+)channels. *J Membr Biol*, 2004. 200: p. 57-66.
70. Gilon, P., M.A. Ravier, J.C. Jonas, et J.C. Henquin, Control mechanisms of the oscillations of insulin secretion in vitro and in vivo. *Diabetes*, 2002. 51 (Suppl 1): p. S144-51.
71. Poitout, V., D. Hagman, R. Stein, I. Artner, R.P. Robertson, et J.S. Harmon, Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr*, 2006. 136: p. 873-876.
72. Duckworth, W.C., R.G. Bennett, et F.G. Hamel, Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev*, 1998. 19: p. 608-24.
73. Goldstein, B.J.etJ.N. Livingston, Insulin degradation by insulin target cells. *Metabolism*, 1981. 30: p. 825-35.
74. Hersh, L.B., The insulysin (insulin degrading enzyme) enigma. *Cell Mol Life Sci*, 2006. *sous presse*.
75. Becker, K.L.etJ.P. Bilezikian, Principles and practice of endocrinology and metabolism. 3rd ed. 2001, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. xxxiv, 2477 p.
76. Mirsky, I.A., Insulinase, insulinase-inhibitors, and diabetes mellitus. *Recent Prog Horm Res*, 1957. 13: p. 429-65; discussion 465-71.
77. Song, E.S., M.A. Juliano, L. Juliano, et L.B. Hersh, Substrate activation of insulin-degrading enzyme (insulysin). A potential target for drug development. *J Biol Chem*, 2003. 278: p. 49789-94.
78. Hamel, F.G., R.G. Bennett, et W.C. Duckworth, Regulation of multicatalytic enzyme activity by insulin and the insulin-degrading enzyme. *Endocrinology*, 1998. 139: p. 4061-6.
79. Kido, Y., J. Nakae, et D. Accili, Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86: p. 972-9.

80. Ottensmeyer, F.P., D.R. Beniac, R.Z. Luo, et C.C. Yip, Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor. *Biochemistry*, 2000. 39: p. 12103-12.
81. Yip, C.C.etP. Ottensmeyer, Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor. *J Biol Chem*, 2003. 278: p. 27329-32.
82. Perz, M.etT. Torlinska, Insulin receptor--structural and functional characteristics. *Med Sci Monit*, 2001. 7: p. 169-77.
83. Magnan, C.etA. Ktorza, Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique. *EMC - Endocrinologie*, 2005. 2: p. 241-64.
84. Capeau, J., C. Desbois-Mouthon, J. Magre, M. Caron, C. Vigouroux, O. Lascols, et G. Cherqui, Mécanismes moléculaires et cellulaires de l'action de l'insuline. Application à la physiologie et à la pathologie. *Nutr Clin Métabol*, 1996. 10 (4 Suppl): p. 231-42.
85. Verge, D., Insulinothérapie: Nouvelles molécules et voies d'administration. *Med Sci (Paris)*, 2004. 20: p. 986-998.
86. DCCT, The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med*, 1993. 329: p. 977-86.
87. UKPDS, Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*, 1998. 352: p. 837-53.
88. Guillausseau, P.J.etM. Laloi-Michelin, Physiopathologie du diabète de type 2. *Rev Med Interne*, 2003. 24: p. 730-7.
89. American Diabetes Association, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2006. 29 (Suppl 1): p. S43-8.
90. American Diabetes Association, Standards of medical care in diabetes - 2006. *Diabetes Care*, 2006. 29 (Suppl 1): p. S4-42.
91. Bennett, P.H.etW.C. Knowler, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and glucose homeostasis, in *Joslin's diabetes mellitus*, C.R. Kahn, G.L. King, A.C. Moses, G.C. Weir, A.M. Jacobson, et R.J. Smith, Editors. 2005, Lippincott Williams & Willkins: Philadelphia. p. 331-8.
92. Cheng, A.Y.etB. Zinman, Principles of insulin therapy, in *Joslin's diabetes mellitus*, C.R. Kahn, G.L. King, A.C. Moses, G.C. Weir, A.M. Jacobson, et R.J. Smith, Editors. 2005, Lippincott Williams & Willkins: Philadelphia. p. 659-68.
93. Home, P.D., Therapeutic targets in the management of Type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 2002. 18 (Suppl 1): p. S7-13.
94. Gerich, J.E., The importance of tight glycemic control. *Am J Med*, 2005. 118 (Suppl 9A): p. 7S-11S.

95. Selvin, E., S. Marinopoulos, G. Berkenblit, T. Rami, F.L. Brancati, N.R. Powe, et S.H. Golden, Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med*, 2004. 141: p. 421-31.
96. Coutinho, M., H.C. Gerstein, Y. Wang, et S. Yusuf, The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care*, 1999. 22: p. 233-40.
97. Khaw, K.T., N. Wareham, S. Bingham, R. Luben, A. Welch, et N. Day, Association of hemoglobin A1c with cardiovascular disease and mortality in adults: the European prospective investigation into cancer in Norfolk. *Ann Intern Med*, 2004. 141: p. 413-20.
98. Khaw, K.T., N. Wareham, R. Luben, S. Bingham, S. Oakes, A. Welch, et N. Day, Glycated haemoglobin, diabetes, and mortality in men in Norfolk cohort of european prospective investigation of cancer and nutrition (EPIC-Norfolk). *BMJ*, 2001. 322: p. 15-8.
99. Nathan, D.M., P.A. Cleary, J.Y. Backlund, S.M. Genuth, J.M. Lachin, T.J. Orchard, P. Raskin, et B. Zinman, Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*, 2005. 353: p. 2643-53.
100. Ostenson, C.G., The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. *Acta Physiol Scand*, 2001. 171: p. 241-7.
101. DeWitt, D.E.etI.B. Hirsch, Outpatient insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus: scientific review. *JAMA*, 2003. 289: p. 2254-64.
102. Stratton, I.M., A.I. Adler, H.A. Neil, D.R. Matthews, S.E. Manley, C.A. Cull, D. Hadden, R.C. Turner, et R.R. Holman, Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*, 2000. 321: p. 405-12.
103. Adler, A.I., I.M. Stratton, H.A. Neil, J.S. Yudkin, D.R. Matthews, C.A. Cull, A.D. Wright, R.C. Turner, et R.R. Holman, Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ*, 2000. 321: p. 412-9.
104. Hermans, M.P.etM. Buysschaert, Pharmacological treatment of type 2 diabetes. *Acta Clin Belg*, 2004. 59: p. 59-66.
105. Jermendy, G., Optimal insulin treatment for patients with type 2 diabetes Basal or prandial insulin supplementation? *Diabetes Res Clin Pract*, 2006. 74 (2 Suppl 1): p. S20-9.
106. Rungby, J., B. Brock, et O. Schmitz, New strategies in insulin treatment: Analogues and noninvasive routes of administration. *Fundam Clin Pharmacol*, 2005. 19: p. 127-32.
107. Owens, D.R., B. Zinman, et G. Bolli, Alternative routes of insulin delivery. *Diabet Med*, 2003. 20: p. 886-98.

108. Heinemann, L., A. Pflutzner, et T. Heise, Alternative routes of administration as an approach to improve insulin therapy: update on dermal, oral, nasal and pulmonary insulin delivery. *Curr Pharm Des*, 2001. 7: p. 1327-51.
109. Vidal : le dictionnaire des médicaments. 82e ed. 2006: Vidal.
110. Gin, H.etH. Hanaire-Broutin, Reproducibility and variability in the action of injected insulin. *Diabetes Metab*, 2005. 31: p. 7-13.
111. Guerci, B.etJ.P. Sauvanet, Subcutaneous insulin: Pharmacokinetic variability and glycemic variability. *Diabetes Metab*, 2005. 31: p. 4S7-24.
112. Liberatore, R.D.etD. Damiani, Insulin pump therapy in type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr (Rio J)*, 2006. 82: p. 249-54.
113. Lenhard, M.J.etG.D. Reeves, Continuous subcutaneous insulin infusion: a comprehensive review of insulin pump therapy. *Arch Intern Med*, 2001. 161: p. 2293-300.
114. Bode, B.W., H.T. Sabbah, T.M. Gross, L.P. Fredrickson, et P.C. Davidson, Diabetes management in the new millennium using insulin pump therapy. *Diabetes Metab Res Rev*, 2002. 18 (Suppl 1): p. S14-20.
115. Micossi, P., M. Cristallo, M.C. Librenti, G. Petrella, G. Galimberti, M. Melandri, L. Monti, D. Spotti, M. Scavini, V. Di Carlo, et et al., Free-insulin profiles after intraperitoneal, intramuscular, and subcutaneous insulin administration. *Diabetes care*, 1986. 9: p. 575-8.
116. Scavini, M., A. Pincelli, G. Petrella, G. Galimberti, P.G. Zager, M. Torri, et G. Pozza, Intraperitoneal insulin absorption after long-term intraperitoneal insulin therapy. *Diabetes care*, 1995. 18: p. 56-9.
117. Lassmann-Vague, V., P. Belicar, C. Alessis, D. Raccah, B. Vialettes, et P. Vague, Insulin kinetics in type I diabetic patients treated by continuous intraperitoneal insulin infusion: influence of anti-insulin antibodies. *Diabet Med*, 1996. 13: p. 1051-5.
118. Jeandidier, N.etS. Boivin, Current status and future prospects of parenteral insulin regimens, strategies and delivery systems for diabetes treatment. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999. 35: p. 179-198.
119. Gin, H., E. Renard, V. Melki, S. Boivin, P. Schaepelynck-Belicar, B. Guerci, J.L. Selam, J.M. Brun, J.P. Riveline, B. Estour, et B. Catargi, Combined improvements in implantable pump technology and insulin stability allow safe and effective long term intraperitoneal insulin delivery in type 1 diabetic patients: the EVADIAC experience. *Diabetes Metab*, 2003. 29: p. 602-7.
120. Gin, H., V. Melki, B. Guerci, et B. Catargi, Clinical evaluation of a newly designed compliant side port catheter for an insulin implantable pump: the EVADIAC experience. Evaluation dans le Diabete du Traitement par Implants Actifs. *Diabetes care*, 2001. 24: p. 175.
121. Boivin, S., P. Belicar, et V. Melki, Assessment of in vivo stability of a new insulin preparation for implantable insulin pumps. A randomized multicenter prospective

- trial. EVADIAC Group. Evaluation Dans le diabete du Traitement par Implants Actifs. *Diabetes care*, 1999. 22: p. 2089-90.
122. Broussolle, C., N. Jeandidier, et H. Hanaire-Broutin, French multicentre experience of implantable insulin pumps. The EVADIAC Study Group. Evaluation of Active Implants in Diabetes Society. *Lancet*, 1994. 343: p. 514-5.
 123. Catargi, B., L. Meyer, V. Melki, E. Renard, et N. Jeandidier, Comparison of blood glucose stability and HbA1C between implantable insulin pumps using U400 HOE 21PH insulin and external pumps using lispro in type 1 diabetic patients: a pilot study. *Diabetes Metab*, 2002. 28: p. 133-7.
 124. Pinget, M. et N. Jeandidier, Long term safety and efficacy of intraperitoneal insulin infusion by means of implantable pumps. *Horm Metab Res*, 1998. 30: p. 475-86.
 125. Jeandidier, N., J.L. Selam, E. Renard, B. Guerci, V. Lassman-Vague, L. Rocher, et H. Hanaire-Broutin, Decreased severe hypoglycemia frequency during intraperitoneal insulin infusion using programmable implantable pumps. Evadiac Study Group. *Diabetes Care*, 1996. 19: p. 780.
 126. Jeandidier, N., S. Boullu, M.S. Busch-Brafin, G. Chabrier, R. Sapin, F. Gasser, et M. Pinget, Comparison of antigenicity of Hoechst 21PH insulin using either implantable intraperitoneal pump or subcutaneous external pump infusion in type 1 diabetic patients. *Diabetes care*, 2002. 25: p. 84-8.
 127. Gannslén, M., Über inhalation von insulin. *Klin Wochenschr*, 1925. 4: p. 71.
 128. Gomez-Perez, F.J. et J.A. Rull, Insulin therapy: current alternatives. *Arch Med Res*, 2005. 36: p. 258-72.
 129. Wigley, F.W., J.H. Londono, S.H. Wood, J.C. Shipp, et R.H. Waldman, Insulin across respiratory mucosae by aerosol delivery. *Diabetes*, 1971. 20: p. 552-6.
 130. Himmelmann, A., J. Jendle, A. Mellen, A.H. Petersen, U.L. Dahl, et P. Wollmer, The impact of smoking on inhaled insulin. *Diabetes care*, 2003. 26: p. 677-82.
 131. Henry, R.R., S.R. Mudaliar, W.C. Howland, 3rd, N. Chu, D. Kim, B. An, et R.R. Reinhardt, Inhaled insulin using the AERx Insulin Diabetes Management System in healthy and asthmatic subjects. *Diabetes care*, 2003. 26: p. 764-9.
 132. Grevenstuck, A. et E. Laquer, Insulin. Seine Darstellung, physiologische und pharmakologische Wirkung mit besonderer Berücksichtigung seiner Wertbestimmung (Eichung). 1925, München: Bergmann.
 133. Vajo, Z., J. Fawcett, et W.C. Duckworth, Recombinant DNA technology in the treatment of diabetes: insulin analogs. *Endocr Rev*, 2001. 22: p. 706-17.
 134. Hirsch, I.B., Insulin analogues. *N Engl J Med*, 2005. 352: p. 174-83.
 135. Ratner, R.E., T.M. Phillips, et M. Steiner, Persistent cutaneous insulin allergy resulting from high-molecular-weight insulin aggregates. *Diabetes*, 1990. 39: p. 728-33.

136. Robbins, D.C., S.M. Cooper, S.E. Fineberg, et P.M. Mead, Antibodies to covalent aggregates of insulin in blood of insulin-using diabetic patients. *Diabetes*, 1987. 36: p. 838-41.
137. Robbins, D.C.etP.M. Mead, Free covalent aggregates of therapeutic insulin in blood of insulin-dependent diabetics. *Diabetes*, 1987. 36: p. 147-51.
138. Brange, J., The new era of biotech insulin analogues. *Diabetologia*, 1997. 40 (Suppl 2): p. S48-53.
139. Overmann, H.etL. Heinemann, Injection-meal interval: recommendations of diabetologists and how patients handle it. *Diabetes Res Clin Pract*, 1999. 43: p. 137-42.
140. Hordern, S.V.etD.L. Russell-Jones, Insulin detemir, does a new century bring a better basal insulin? *Int J Clin Pract*, 2005. 59: p. 730-9.
141. Gerich, J.E., Insulin glargine: long-acting basal insulin analog for improved metabolic control. *Curr Med Res Opin*, 2004. 20: p. 31-7.
142. Chatterjee, S., J.R. Tringham, et M.J. Davies, Insulin glargine and its place in the treatment of Types 1 and 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Pharmacother*, 2006. 7: p. 1357-71.
143. Carroll, M.F.etD.S. Schade, The dawn phenomenon revisited: implications for diabetes therapy. *Endocr Pract*, 2005. 11: p. 55-64.
144. Soran, H.etN. Younis, Insulin detemir: a new basal insulin analogue. *Diabetes Obes Metab*, 2006. 8: p. 26-30.
145. Wang, F., J.M. Carabino, et C.M. Vergara, Insulin glargine: a systematic review of a long-acting insulin analogue. *Clin Ther*, 2003. 25: p. 1541-77, discussion 1539-40.
146. Vaag, A., A. Handberg, M. Lauritzen, J.E. Henriksen, K.D. Pedersen, et H. Beck-Nielsen, Variation in absorption of NPH insulin due to intramuscular injection. *Diabetes Care*, 1990. 13: p. 74-6.
147. Jehle, P.M., C. Micheler, D.R. Jehle, D. Breitig, et B.O. Boehm, Inadequate suspension of neutral protamine Hagedorn (NPH) insulin in pens. *Lancet*, 1999. 354: p. 1604-7.
148. Danne, T., K. Lupke, K. Walte, W. Von-Schuetz, et M.A. Gall, Insulin detemir is characterized by a consistent pharmacokinetic profile across age-groups in children, adolescents, and adults with type 1 diabetes. *Diabetes care*, 2003. 26: p. 3087-92.
149. Vajo, Z.etW.C. Duckworth, Genetically engineered insulin analogs: diabetes in the new millenium. *Pharmacol Rev*, 2000. 52: p. 1-9.
150. Pullen, R.A., D.G. Lindsay, S.P. Wood, I.J. Tickle, T.L. Blundell, A. Wollmer, G. Krail, D. Brandenburg, H. Zahn, J. Gliemann, et S. Gammeltoft, Receptor-binding region of insulin. *Nature*, 1976. 259: p. 369-73.

151. Derewenda, U., Z. Derewenda, E.J. Dodson, G.G. Dodson, X. Bing, et J. Markussen, X-ray analysis of the single chain B29-A1 peptide-linked insulin molecule : A completely inactive analogue. *J Mol Biol*, 1991. 220: p. 425-33.
152. Bhatnagar, S., D. Srivastava, M.S. Jayadev, et A.K. Dubey, Molecular variants and derivatives of insulin for improved glycemic control in diabetes. *Prog Biophys Mol Biol*, 2006. 91: p. 199-228.
153. Conlon, J.M., Evolution of the insulin molecule: insights into structure-activity and phylogenetic relationships. *Peptides*, 2001. 22: p. 1183-93.
154. Kristensen, C., T. Kjeldsen, F.C. Wiberg, L. Schaffer, M. Hach, S. Havelund, J. Bass, D.F. Steiner, et A.S. Andersen, Alanine scanning mutagenesis of insulin. *J Biol Chem*, 1997. 272: p. 12978-83.
155. Schaffer, L., A model for insulin binding to the insulin receptor. *Eur J Biochem*, 1994. 221: p. 1127-32.
156. Hansen, B.F., G.M. Danielsen, K. Drejer, A.R. Sorensen, F.C. Wiberg, H.H. Klein, et A.G. Lundemose, Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. *Biochem J*, 1996. 315 (Pt 1): p. 271-9.
157. Kurtzhals, P., L. Schaffer, A. Sorensen, C. Kristensen, I. Jonassen, C. Schmid, et T. Trub, Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. *Diabetes*, 2000. 49: p. 999-1005.
158. Slieker, L.J., G.S. Brooke, R.D. DiMarchi, D.B. Flora, L.K. Green, J.A. Hoffmann, H.B. Long, L. Fan, J.E. Shields, K.L. Sundell, P.L. Surface, et R.E. Chance, Modifications in the B10 and B26-30 regions of the B chain of human insulin alter affinity for the human IGF-I receptor more than for the insulin receptor. *Diabetologia*, 1997. 40 (Suppl 2): p. S54-61.
159. Costantino, H.R., R. Langer, et A.M. Klibanov, Moisture-induced aggregation of lyophilized insulin. *Pharm Res*, 1994. 11: p. 21-9.
160. Brange, J. et A. Vølund, Insulin analogs with improved pharmacokinetic profiles. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999. 35: p. 307-35.
161. Derewenda, U., Z. Derewenda, E.J. Dodson, G.G. Dodson, C.D. Reynolds, G.D. Smith, C. Sparks, et D. Swenson, Phenol stabilizes more helix in a new symmetrical zinc insulin hexamer. *Nature*, 1989. 338: p. 594-6.
162. Kaarsholm, N.C., H.C. Ko, et M.F. Dunn, Comparison of solution structural flexibility and zinc binding domains for insulin, proinsulin, and miniproinsulin. *Biochemistry*, 1989. 28: p. 4427-35.
163. Rahuel-Clermont, S., C.A. French, N.C. Kaarsholm, M.F. Dunn, et C.I. Chou, Mechanisms of stabilization of the insulin hexamer through allosteric ligand interactions. *Biochemistry*, 1997. 36: p. 5837-45.
164. Schwartz, G.P., G.T. Burke, et P.G. Katsoyannis, A superactive insulin: [B10-aspartic acid]insulin(human). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84: p. 6408-11.

165. Hamel, F.G., G.L. Siford, J. Fawcett, R.E. Chance, B.H. Frank, et W.C. Duckworth, Differences in the cellular processing of AspB10 human insulin compared with human insulin and LysB28ProB29 human insulin. *Metabolism*, 1999. 48: p. 611-7.
166. Milazzo, G., L. Sciacca, V. Papa, I.D. Goldfine, et R. Vigneri, ASPB10 insulin induction of increased mitogenic responses and phenotypic changes in human breast epithelial cells: evidence for enhanced interactions with the insulin-like growth factor-I receptor. *Mol Carcinog*, 1997. 18: p. 19-25.
167. Drejer, K., The bioactivity of insulin analogues from in vitro receptor binding to in vivo glucose uptake. *Diabetes Metab Rev*, 1992. 8: p. 259-85.
168. Jørgensen, L.N.etL.H. Dideriksen, Preclinical studies of rapid-acting insulin analogues, in *Frontiers in insulin pharmacology*, M. Berger et F.A. Gries, Editors. 1993, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 110-7.
169. Bolli, G.B., R.D. Di-Marchi, G.D. Park, S. Pramming, et V.A. Koivisto, Insulin analogues and their potential in the management of diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1999. 42: p. 1151-67.
170. Di Marchi, R.D., R.E. Chance, H.B. Long, J.E. Shields, et L.J. Slieker, Preparation of an insulin with improved pharmacokinetics relative to human insulin through consideration of structural homology with insulin-like growth factor I. *Horm Res*, 1994. 41 (Suppl 2): p. S93-6.
171. Brems, D.N., L.A. Alter, M.J. Beckage, R.E. Chance, R.D. DiMarchi, L.K. Green, H.B. Long, A.H. Pekar, J.E. Shields, et B.H. Frank, Altering the association properties of insulin by amino acid replacement. *Protein Eng*, 1992. 5: p. 527-33.
172. Ciszak, E., J.M. Beals, B.H. Frank, J.C. Baker, N.D. Carter, et G.D. Smith, Role of C-terminal B-chain residues in insulin assembly: the structure of hexameric LysB28ProB29-human insulin. *Structure*, 1995. 3: p. 615-22.
173. Bakaysa, D.L., J. Radziuk, H.A. Havel, M.L. Brader, S. Li, S.W. Dodd, J.M. Beals, A.H. Pekar, et D.N. Brems, Physicochemical basis for the rapid time-action of LysB28ProB29-insulin: Dissociation of a protein-ligand complex. *Protein Sci*, 1996. 5: p. 2521-2531.
174. Birnbaum, D.T., M.A. Kilcomons, M.R. DeFelippis, et J.M. Beals, Assembly and dissociation of human insulin and LysB28ProB29-insulin hexamers: a comparison study. *Pharm Res*, 1997. 14: p. 25-36.
175. Avignon, A., Analogues de l'insuline. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 2001. 13: p. 292-300.
176. Holleman, F.etJ.B. Hoekstra, Insulin lispro. *N Engl J Med*, 1997. 337: p. 176-83.
177. Howey, D.C., R.R. Bowsher, R.L. Brunelle, et J.R. Woodworth, [Lys(B28), Pro(B29)]-human insulin. A rapidly absorbed analogue of human insulin. *Diabetes*, 1994. 43: p. 396-402.
178. Torlone, E., C. Fanelli, A.M. Rambotti, G. Kassi, F. Modarelli, A. Di Vincenzo, L. Epifano, M. Ciofetta, S. Pampanelli, P. Brunetti, et et al., Pharmacokinetics, pharmacodynamics and glucose counterregulation following subcutaneous injection of

- the monomeric insulin analogue [Lys(B28),Pro(B29)] in IDDM. *Diabetologia*, 1994. 37: p. 713-20.
179. Woodworth, J., D. Howey, R. Bowsher, S. Lutz, P. Santa, et P. Brady, [Lys(B28), Pro(B29)] human insulin (K): dose-ranging vs. Humulin R (H) [Résumé]. *Diabetes*, 1993. 42 (Suppl 1): p. 55A.
 180. Anderson, J.H., Jr., R.L. Brunelle, V.A. Koivisto, A. Pfoetzner, M.E. Trautmann, L. Vignati, et R. DiMarchi, Reduction of postprandial hyperglycemia and frequency of hypoglycemia in IDDM patients on insulin-analog treatment. Multicenter Insulin Lispro Study Group. *Diabetes*, 1997. 46: p. 265-70.
 181. Brunelle, B.L., J. Llewelyn, J.H. Anderson, Jr., E.A. Gale, et V.A. Koivisto, Meta-analysis of the effect of insulin lispro on severe hypoglycemia in patients with type 1 diabetes. *Diabetes care*, 1998. 21: p. 1726-31.
 182. Pfoetzner, A., E. Kustner, T. Forst, B. Schulze-Schleppinghoff, M.E. Trautmann, M. Haslbeck, H. Schatz, et J. Beyer, Intensive insulin therapy with insulin lispro in patients with type 1 diabetes reduces the frequency of hypoglycemic episodes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1996. 104: p. 25-30.
 183. Persson, B., M.L. Swahn, R. Hjertberg, U. Hanson, E. Nord, E. Nordlander, et L.O. Hansson, Insulin lispro therapy in pregnancies complicated by type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 2002. 58: p. 115-21.
 184. Mecacci, F., L. Carignani, R. Cioni, E. Bartoli, E. Parretti, P. La Torre, G. Scarselli, et G. Mello, Maternal metabolic control and perinatal outcome in women with gestational diabetes treated with regular or lispro insulin: comparison with non-diabetic pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003. 111: p. 19-24.
 185. Fineberg, N.S., S.E. Fineberg, J.H. Anderson, M.A. Birkett, R.G. Gibson, et S. Hufferd, Immunologic effects of insulin lispro [Lys (B28), Pro (B29) human insulin] in IDDM and NIDDM patients previously treated with insulin. *Diabetes*, 1996. 45: p. 1750-4.
 186. Fineberg, S.E., J. Huang, R. Brunelle, K.S. Gulliya, et J.H. Anderson, Jr., Effect of long-term exposure to insulin lispro on the induction of antibody response in patients with type 1 or type 2 diabetes. *Diabetes care*, 2003. 26: p. 89-96.
 187. Colquitt, J., P. Royle, et N. Waugh, Are analogue insulins better than soluble in continuous subcutaneous insulin infusion? Results of a meta-analysis. *Diabet Med*, 2003. 20: p. 863-6.
 188. Raskin, P., J.H. Holcombe, W.V. Tamborlane, J.I. Malone, S. Strowig, J.A. Ahern, et F. Lavent, A comparison of insulin lispro and buffered regular human insulin administered via continuous subcutaneous insulin infusion pump. *J Diabetes Complications*, 2001. 15: p. 295-300.
 189. Renner, R., A. Pfoetzner, M. Trautmann, O. Harzer, K. Sauter, et R. Landgraf, Use of insulin lispro in continuous subcutaneous insulin infusion treatment. Results of a multicenter trial. German Humalog-CSII Study Group. *Diabetes care*, 1999. 22: p. 784-8.

190. Zinman, B., H. Tildesley, J.L. Chiasson, E. Tsui, et T. Strack, Insulin lispro in CSII: results of a double-blind crossover study. *Diabetes*, 1997. 46: p. 440-3.
191. Bode, B., R. Weinstein, D. Bell, J. McGill, D. Nadeau, P. Raskin, J. Davidson, R. Henry, W.C. Huang, et R.R. Reinhardt, Comparison of insulin aspart with buffered regular insulin and insulin lispro in continuous subcutaneous insulin infusion: a randomized study in type 1 diabetes. *Diabetes care*, 2002. 25: p. 439-44.
192. Pen, P., C. Hinselmann, A. Pflutzner, et M. Dreyer, Catheter disconnection in type 1 diabetes treated with CSII: comparison of insulin lispro and human regular insulin (Abstract). *Diabetologia*, 1996. 39 (Suppl 1): p. A847.
193. Attia, N., T.W. Jones, J. Holcombe, et W.V. Tamborlane, Comparison of human regular and lispro insulins after interruption of continuous subcutaneous insulin infusion and in the treatment of acutely decompensated IDDM. *Diabetes Care*, 1998. 21: p. 817-21.
194. Gerich, J.E., Novel insulins: expanding options in diabetes management. *Am J Med*, 2002. 113: p. 308-16.
195. Kang, S., F.M. Creagh, J.R. Peters, J. Brange, A. Volund, et D.R. Owens, Comparison of subcutaneous soluble human insulin and insulin analogues (AspB9, GluB27; AspB10; AspB28) on meal-related plasma glucose excursions in type I diabetic subjects. *Diabetes Care*, 1991. 14: p. 571-7.
196. Home, P.D., A. Lindholm, et A. Riis, Insulin aspart vs. human insulin in the management of long-term blood glucose control in Type 1 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *Diabet Med*, 2000. 17: p. 762-70.
197. Heinemann, L., C. Kapitza, A.A. Starke, et T. Heise, Time-action profile of the insulin analogue B28Asp. *Diabet Med*, 1996. 13: p. 683-4.
198. Home, P.D., L. Barriocanal, et A. Lindholm, Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the novel rapid-acting insulin analogue, insulin aspart, in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*, 1999. 55: p. 199-203.
199. Plank, J., A. Wutte, G. Brunner, A. Siebenhofer, B. Semlitsch, R. Sommer, S. Hirschberger, et T.R. Pieber, A direct comparison of insulin aspart and insulin lispro in patients with type 1 diabetes. *Diabetes care*, 2002. 25: p. 2053-7.
200. Ottesen, J.L., P. Nilsson, J. Jami, D. Weilguny, M. Duhrkop, D. Bucchini, S. Havelund, et J.M. Fogh, The potential immunogenicity of human insulin and insulin analogues evaluated in a transgenic mouse model. *Diabetologia*, 1994. 37: p. 1178-85.
201. Bode, B., K. McCulloch, et P. Strange, Insulin aspart efficacy and safety compared to buffered regular insulin (Velosulin®) for continuous subcutaneous insulin infusion [Résumé]. *Diabetes*, 2000. 49 (Suppl 1): p. A98.
202. Jacobsen, L.V., B. Sogaard, et A. Riis, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a premixed formulation of soluble and protamine-retarded insulin aspart. *Eur J Clin Pharmacol*, 2000. 56: p. 399-403.
203. Garg, S.K., New insulin analogues. *Diabetes Technol Ther*, 2005. 7: p. 813-7.

204. Dailey, G., J. Rosenstock, R.G. Moses, et K. Ways, Insulin glulisine provides improved glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2004. 27: p. 2363-8.
205. Burks, D.J.etM.F. White, IRS proteins and beta-cell function. *Diabetes*, 2001. 50 (Suppl 1): p. S140-5.
206. Rakatzi, I., G. Seipke, et J. Eckel, [LysB3, GluB29] insulin: a novel insulin analog with enhanced beta-cell protective action. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 310: p. 852-9.
207. Rakatzi, I., S. Ramrath, D. Ledwig, O. Dransfeld, T. Bartels, G. Seipke, et J. Eckel, A novel insulin analog with unique properties: LysB3,GluB29 insulin induces prominent activation of insulin receptor substrate 2, but marginal phosphorylation of insulin receptor substrate 1. *Diabetes*, 2003. 52: p. 2227-38.
208. Hennige, A.M., R. Lehmann, C. Weigert, K. Moeschel, M. Schauble, E. Metzinger, R. Lammers, et H.U. Haring, Insulin glulisine: insulin receptor signaling characteristics in vivo. *Diabetes*, 2005. 54: p. 361-6.
209. Ciaraldi, T.P., S.A. Phillips, L. Carter, V. Aroda, S. Mudaliar, et R.R. Henry, Effects of the rapid-acting insulin analog glulisine on cultured human skeletal muscle cells: comparisons with insulin and insulin-like growth factor I. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90: p. 5551-8.
210. Roskamp, R.H.etG. Park, Long-acting insulin analogs. *Diabetes care*, 1999. 22 (Suppl 2): p. B109-13.
211. Jorgensen, S., A. Vaag, L. Langkjaer, P. Hougaard, et J. Markussen, NovoSol Basal: pharmacokinetics of a novel soluble long acting insulin analogue. *BMJ*, 1989. 299: p. 415-9.
212. Grau, U., Insulin-Arg², a new retardation principle based on a natural proinsulin-derived processing intermediate [Résumé]. *Diabetes Res Clin Pract*, 1985. 1: p. 204.
213. Berchtold, H.etR. Hilgenfeld, Binding of phenol to R6 insulin hexamers. *Biopolymers*, 1999. 51: p. 165-72.
214. Madsbad, S., Insulin analogues: have they changed insulin treatment and improved glycaemic control? *Diabetes Metab Res Rev*, 2002. 18 (Suppl 1): p. S21-8.
215. Ciaraldi, T.P., L. Carter, G. Seipke, S. Mudaliar, et R.R. Henry, Effects of the long-acting insulin analog insulin glargine on cultured human skeletal muscle cells: comparisons to insulin and IGF-I. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86: p. 5838-47.
216. Berti, L., M. Kellerer, B. Bossenmaier, E. Seffer, G. Seipke, et H.U. Haring, The long acting human insulin analog HOE 901: characteristics of insulin signalling in comparison to Asp(B10) and regular insulin. *Horm Metab Res*, 1998. 30: p. 123-9.
217. Bahr, M., T. Kolter, G. Seipke, et J. Eckel, Growth promoting and metabolic activity of the human insulin analogue [GlyA21,ArgB31,ArgB32]insulin (HOE 901) in muscle cells. *Eur J Pharmacol*, 1997. 320: p. 259-65.

218. Stammberger, I., A. Bube, B. Durchfeld-Meyer, H. Donaubaueer, et G. Troschau, Evaluation of the carcinogenic potential of insulin glargine (LANTUS) in rats and mice. *Int J Toxicol*, 2002. 21: p. 171-9.
219. Markussen, J., S. Havelund, P. Kurtzhals, A.S. Andersen, J. Halstrom, E. Hasselager, U.D. Larsen, U. Ribel, L. Schaffer, K. Vad, et I. Jonassen, Soluble, fatty acid acylated insulins bind to albumin and show protracted action in pigs. *Diabetologia*, 1996. 39: p. 281-8.
220. Rosenstock, J., S.L. Schwartz, C.M. Clark, Jr., G.D. Park, D.W. Donley, et M.B. Edwards, Basal insulin therapy in type 2 diabetes: 28-week comparison of insulin glargine (HOE 901) and NPH insulin. *Diabetes care*, 2001. 24: p. 631-6.
221. Zib, I.etP. Raskin, Novel insulin analogues and its mitogenic potential. *Diabetes Obes Metab*, 2006. 8: p. 611-20.
222. Heinemann, L., R. Linkeschova, K. Rave, B. Hompesch, M. Sedlak, et T. Heise, Time-action profile of the long-acting insulin analog insulin glargine (HOE901) in comparison with those of NPH insulin and placebo. *Diabetes care*, 2000. 23: p. 644-9.
223. Dreyer, M., M. Pein, B. Schmidt, B. Heidtmann, M. Schlunzen, et R. Roskamp, Comparison of the pharmacokinetics/dynamics of GLY(A21)-ARG(B31, B32)-human-insulin (HOE71GT) with NPH-insulin following subcutaneous injection by using euglycemic clamp technique [Résumé]. *Diabetologia*, 1994. 37 (Suppl 1): p. A78.
224. Lepore, M., S. Pampanelli, C. Fanelli, F. Porcellati, L. Bartocci, A. Di-Vincenzo, C. Cordoni, E. Costa, P. Brunetti, et G.B. Bolli, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of subcutaneous injection of long-acting human insulin analog glargine, NPH insulin, and ultralente human insulin and continuous subcutaneous infusion of insulin lispro. *Diabetes*, 2000. 49: p. 2142-8.
225. Fritsche, A., M.A. Schweitzer, et H.U. Haring, Glimepiride combined with morning insulin glargine, bedtime neutral protamine hagedorn insulin, or bedtime insulin glargine in patients with type 2 diabetes. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*, 2003. 138: p. 952-9.
226. Hamann, A., S. Matthaehi, C. Rosak, et L. Silvestre, A randomized clinical trial comparing breakfast, dinner, or bedtime administration of insulin glargine in patients with type 1 diabetes. *Diabetes care*, 2003. 26: p. 1738-44.
227. Massi Benedetti, M., E. Humburg, A. Dressler, et M. Ziemer, A one-year, randomised, multicentre trial comparing insulin glargine with NPH insulin in combination with oral agents in patients with type 2 diabetes. *Horm Metab Res*, 2003. 35: p. 189-96.
228. Rossetti, P., S. Pampanelli, C. Fanelli, F. Porcellati, E. Costa, E. Torlone, L. Scionti, et G.B. Bolli, Intensive replacement of basal insulin in patients with type 1 diabetes given rapid-acting insulin analog at mealtime: a 3-month comparison between administration of NPH insulin four times daily and glargine insulin at dinner or bedtime. *Diabetes care*, 2003. 26: p. 1490-6.

229. Murphy, N.P., S.M. Keane, K.K. Ong, M. Ford-Adams, J.A. Edge, C.L. Acerini, et D.B. Dunger, Randomized cross-over trial of insulin glargine plus lispro or NPH insulin plus regular human insulin in adolescents with type 1 diabetes on intensive insulin regimens. *Diabetes care*, 2003. 26: p. 799-804.
230. Schober, E., E. Schoenle, J. Van Dyk, et K. Wernicke-Panten, Comparative trial between insulin glargine and NPH insulin in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes care*, 2001. 24: p. 2005-6.
231. Scholtz, H.E., S.G. Pretorius, D.H. Wessels, B.H. Meyer, N. Van Niekerk, M. Comm, et B. Rosenkranz, An assessment of the variability in the pharmacodynamics (glucose lowering effect) on HOE901 compared to NPH and ultralente human insulins using the euglycaemic clamp technique [Résumé]. *Clin Pharmacol Ther*, 2000. 67: p. 123.
232. Kuerzel, G.U., U. Shukla, H.E. Scholtz, S.G. Pretorius, D.H. Wessels, C. Venter, M.A. Potgieter, A.M. Lang, T. Koose, et E. Bernhardt, Biotransformation of insulin glargine after subcutaneous injection in healthy subjects. *Curr Med Res Opin*, 2003. 19: p. 34-40.
233. Rosenstock, J., G. Park, et J. Zimmerman, Basal insulin glargine (HOE 901) versus NPH insulin in patients with type 1 diabetes on multiple daily insulin regimens. U.S. Insulin Glargine (HOE 901) Type 1 Diabetes Investigator Group. *Diabetes care*, 2000. 23: p. 1137-42.
234. Pieber, T.R., I. Eugene-Jolchine, et E. Derobert, Efficacy and safety of HOE 901 versus NPH insulin in patients with type 1 diabetes. The European Study Group of HOE 901 in type 1 diabetes. *Diabetes care*, 2000. 23: p. 157-62.
235. Ratner, R.E., I.B. Hirsch, J.L. Neifing, S.K. Garg, T.E. Mecca, et C.A. Wilson, Less hypoglycemia with insulin glargine in intensive insulin therapy for type 1 diabetes. U.S. Study Group of Insulin Glargine in Type 1 Diabetes. *Diabetes care*, 2000. 23: p. 639-43.
236. Raskin, P., L. Klaff, R. Bergenstal, J.P. Halle, D. Donley, et T. Mecca, A 16-week comparison of the novel insulin analog insulin glargine (HOE 901) and NPH human insulin used with insulin lispro in patients with type 1 diabetes. *Diabetes care*, 2000. 23: p. 1666-71.
237. Yki-Jarvinen, H., A. Dressler, et M. Ziemer, Less nocturnal hypoglycemia and better post-dinner glucose control with bedtime insulin glargine compared with bedtime NPH insulin during insulin combination therapy in type 2 diabetes. HOE 901/3002 Study Group. *Diabetes care*, 2000. 23: p. 1130-6.
238. Kurtzhals, P., How to achieve a predictable basal insulin? *Diabetes Metab*, 2005. 31: p. 4S25-33.
239. Dea, M.K., M. Hamilton-Wessler, M. Ader, D. Moore, L. Schaffer, M. Loftager, A. Volund, et R.N. Bergman, Albumin binding of acylated insulin (NN304) does not deter action to stimulate glucose uptake. *Diabetes*, 2002. 51: p. 762-9.
240. Havelund, S., A. Plum, U. Ribbel, I. Jonassen, A. Volund, J. Markussen, et P. Kurtzhals, The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin. *Pharm Res*, 2004. 21: p. 1498-504.

241. Whittingham, J.L., S. Havelund, et I. Jonassen, Crystal structure of a prolonged-acting insulin with albumin-binding properties. *Biochemistry*, 1997. 36: p. 2826-31.
242. Heinemann, L., K. Sinha, C. Weyer, M. Loftager, S. Hirschberger, et T. Heise, Time-action profile of the soluble, fatty acid acylated, long-acting insulin analogue NN304. *Diabet Med*, 1999. 16: p. 332-8.
243. Heise, T., L. Nosek, B.B. Ronn, L. Endahl, L. Heinemann, C. Kapitza, et E. Draeger, Lower within-subject variability of insulin detemir in comparison to NPH insulin and insulin glargine in people with type 1 diabetes. *Diabetes*, 2004. 53: p. 1614-20.
244. Kurtzhals, P. et M. Colding-Jorgensen, Albumin binding of insulin detemir reduces the risk for hypoglycaemic events [Résumé]. *Diabetes*, 2004. 53: p. A477 (Résumé 1995-PO).
245. Hamilton-Wessler, M., M. Ader, M. Dea, D. Moore, P.N. Jorgensen, J. Markussen, et R.N. Bergman, Mechanism of protracted metabolic effects of fatty acid acylated insulin, NN304, in dogs: retention of NN304 by albumin. *Diabetologia*, 1999. 42: p. 1254-63.
246. Yang, Y.J., I.D. Hope, M. Ader, et R.N. Bergman, Insulin transport across capillaries is rate limiting for insulin action in dogs. *J Clin Invest*, 1989. 84: p. 1620-8.
247. Yang, Y.J., I. Hope, M. Ader, R.A. Poulin, et R.N. Bergman, Dose-response relationship between lymph insulin and glucose uptake reveals enhanced insulin sensitivity of peripheral tissues. *Diabetes*, 1992. 41: p. 241-53.
248. Castillo, C., C. Bogardus, R. Bergman, P. Thuillez, et S. Lillioja, Interstitial insulin concentrations determine glucose uptake rates but not insulin resistance in lean and obese men. *J Clin Invest*, 1994. 93: p. 10-6.
249. Jansson, P.A., J.P. Fowelin, H.P. von-Schenck, U.P. Smith, et P.N. Lonroth, Measurement by microdialysis of the insulin concentration in subcutaneous interstitial fluid. Importance of the endothelial barrier for insulin. *Diabetes*, 1993. 42: p. 1469-73.
250. Miles, P.D., M. Levisetti, D. Reichart, M. Khoursheed, A.R. Moossa, et J.M. Olefsky, Kinetics of insulin action in vivo. Identification of rate-limiting steps. *Diabetes*, 1995. 44: p. 947-53.
251. Poulin, R.A., G.M. Steil, D.M. Moore, M. Ader, et R.N. Bergman, Dynamics of glucose production and uptake are more closely related to insulin in hindlimb lymph than in thoracic duct lymph. *Diabetes*, 1994. 43: p. 180-90.
252. Thevis, M., A. Thomas, P. Delahaut, A. Bosseloir, et W. Schanzer, Qualitative determination of synthetic analogues of insulin in human plasma by immunoaffinity purification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for doping control purposes. *Anal Chem*, 2005. 77: p. 3579-85.
253. Thevis, M., A. Thomas, P. Delahaut, A. Bosseloir, et W. Schanzer, Doping control analysis of intact rapid-acting insulin analogues in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 2006. 78: p. 1897-903.
254. Cao, Z., E. Sinclair, K. Kannan, R. Rej, et T. Rosano, Identification of insulin and its analogs using HPLC-MS [Résumé]. *Clin Chem*, 2005. 51 (Suppl 6): p. A25.

255. Hamel, F.G., D.E. Peavy, M.P. Ryan, et W.C. Duckworth, HPLC analysis of insulin degradation products from isolated hepatocytes. Effects of inhibitors suggest intracellular and extracellular pathways. *Diabetes*, 1987. 36: p. 702-8.
256. Hoyer, G.L., P.E. Nolan, Jr., J.H. LeDoux, et L.A. Moore, Selective stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay for recombinant human regular insulin. *J Chromatogr A*, 1995. 699: p. 383-8.
257. Hvass, A., M. Hach, et M.U. Jars, Complementary analytical HPLC methods for insulin-related degradation products. *Am Biotechnol Lab*, 2003. 21: p. 8-12.
258. Jars, M.U., A. Hvass, et D. Waaben, Insulin aspart (AspB28 human insulin) derivatives formed in pharmaceutical solutions. *Pharm Res*, 2002. 19: p. 621-8.
259. Kalant, D., J.C. Crawhall, et B.I. Posner, Separation of biological variant insulin molecules from different species by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). *Biochem Med*, 1985. 34: p. 230-40.
260. Khaksa, G., K. Nalini, M. Bhat, et N. Udupa, High-performance liquid chromatographic determination of insulin in rat and human plasma. *Anal Biochem*, 1998. 260: p. 92-5.
261. Kippen, A.D., F. Cerini, L. Vadas, R. Stocklin, L. Vu, R.E. Offord, et K. Rose, Development of an isotope dilution assay for precise determination of insulin, C-peptide, and proinsulin levels in non-diabetic and type II diabetic individuals with comparison to immunoassay. *J Biol Chem*, 1997. 272: p. 12513-22.
262. Lougheed, W.D., B. Zinman, T.R. Strack, L.J. Janis, A.B. Weymouth, E.A. Bernstein, A.M. Korbas, et B.H. Frank, Stability of insulin lispro in insulin infusion systems. *Diabetes care*, 1997. 20: p. 1061-5.
263. Moslemi, P., A.R. Najafabadi, et H. Tajerzadeh, A rapid and sensitive method for simultaneous determination of insulin and A21-desamido insulin by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, 2003. 33: p. 45-51.
264. Oliva, A., J. Farina, et M. Llabres, Development of two high-performance liquid chromatographic methods for the analysis and characterization of insulin and its degradation products in pharmaceutical preparations. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000. 749: p. 25-34.
265. Ostrega, D., K. Polonsky, D. Nagi, J. Yudkin, L.J. Cox, P.M. Clark, et C.N. Hales, Measurement of proinsulin and intermediates. Validation of immunoassay methods by high-performance liquid chromatography. *Diabetes*, 1995. 44: p. 437-40.
266. Sakura, H., Y. Iwamoto, Y. Sakamoto, T. Kuzuya, et H. Hirata, Structurally abnormal insulin in a diabetic patient. Characterization of the mutant insulin A3 (Val----Leu) isolated from the pancreas. *J Clin Invest*, 1986. 78: p. 1666-72.
267. Seino, S., A. Funakoshi, Z.Z. Fu, et A. Vinik, Identification of insulin variants in patients with hyperinsulinemia by reversed-phase, high-performance liquid chromatography. *Diabetes*, 1985. 34: p. 1-7.
268. Stickelmeyer, M.P., C.J. Graf, B.H. Frank, R.L. Ballard, et S.M. Storms, Stability of U-10 and U-50 dilutions of insulin lispro. *Diabetes Technol Ther*, 2000. 2: p. 61-6.

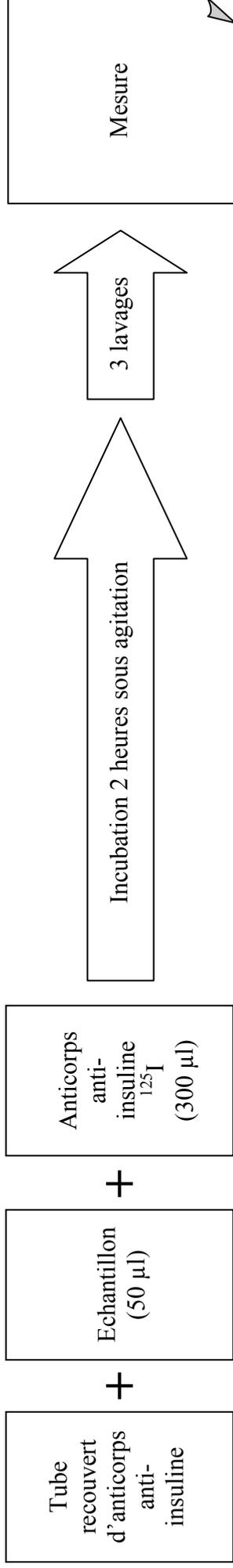
269. Stocklin, R., L. Vu, L. Vadas, F. Cerini, A.D. Kippen, R.E. Offord, et K. Rose, A stable isotope dilution assay for the in vivo determination of insulin levels in humans by mass spectrometry. *Diabetes*, 1997. 46: p. 44-50.
270. Sapin, R.etC. Demangeat, Aspects analytiques des dosages d'insuline, peptide-C, proinsulines et glucagon. *Médecine Nucléaire - Imagerie Fonctionnelle et Métabolique*, 2001. 25: p. 73-9.
271. Sapin, R., Insulin assays: previously known and new analytical features. *Clin Lab*, 2003. 49: p. 113-21.
272. Vogeser, M.etK.G. Parhofer, Limited preanalytical requirements for insulin measurement. *Clin Biochem*, 2005. 38: p. 572-5.
273. Brodal, B.P., The influence of haemolysis on the radioimmunoassay of insulin. *Scand J Clin Lab Invest*, 1971. 28: p. 287-90.
274. O'Rahilly, S., M.A. Burnett, R.F. Smith, J.H. Darley, et R.C. Turner, Haemolysis affects insulin but not C-peptide immunoassay. *Diabetologia*, 1987. 30: p. 394-6.
275. Sapin, R., J.C. Ongagna, F. Gasser, et D. Grucker, Insulin measurements in haemolysed serum: influence of insulinase inhibitors. *Clin Chim Acta*, 1998. 274: p. 111-7.
276. Sapin, R., Interférence de l'hémolyse et de l'hémoglobine : exemple du dosage de l'insuline. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2001. 59: p. 113-4.
277. Sapin, R., F. Gasser, et D. Grucker, Prévention des effets de l'hémolyse sur le dosage de l'insuline. *Immunoanal Biol Spé*, 1997. 12: p. 206-8.
278. Van Haefen, T.W., Clinical significance of insulin antibodies in insulin-treated diabetic patients. *Diabetes care*, 1989. 12: p. 641-8.
279. Greenbaum, C.J.etJ.P. Palmer, Insulin antibodies and insulin autoantibodies. *Diabet Med*, 1991. 8: p. 97-105.
280. Schernthaner, G., Immunogenicity and allergenic potential of animal and human insulins. *Diabetes care*, 1993. 16 (Suppl 3): p. 155-65.
281. Wilkin, T., P.J. Hoskins, M. Armitage, M. Rodier, C. Casey, J.L. Diaz, D.A. Pyke, et R.D. Leslie, Value of insulin autoantibodies as serum markers for insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*, 1985. 1: p. 480-1.
282. Bingley, P.J., Interactions of age, islet cell antibodies, insulin autoantibodies, and first-phase insulin response in predicting risk of progression to IDDM in ICA+ relatives: the ICARUS data set. Islet Cell Antibody Register Users Study. *Diabetes*, 1996. 45: p. 1720-8.
283. Zuppinger, K., C. Aebi, S. Fankhauser, G. Herz, R.P. Zurbrugg, K. Schopfer, et T.M. Neri, Comparison of human and porcine insulin therapies in children with newly diagnosed diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1987. 30: p. 912-5.
284. Sapin, R., Anti-insulin antibodies in insulin immunometric assays: a still possible pitfall. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1997. 35: p. 365-7.

285. Andersen, L., A. Volund, K.J. Olsen, A. Plum, et D. Walsh, Validity and use of a non-parallel insulin assay for pharmacokinetic studies of the rapid-acting insulin analogue, insulin aspart. *J Immunoassay Immunochem*, 2001. 22: p. 147-63.
286. Lindstrom, T., C.A. Hedman, et H.J. Arnqvist, Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes care*, 2002. 25: p. 1049-54.
287. Sapin, R., V. Le-Galudec, F. Gasser, M. Pinget, et D. Grucker, Elecsys insulin assay: free insulin determination and the absence of cross-reactivity with insulin lispro. *Clin Chem*, 2001. 47: p. 602-5.
288. Marshall, M.O., L.G. Heding, J. Villumsen, H.K. Akerblom, H. Baevre, G. Dahlquist, J.J. Kjaergaard, M. Knip, F. Lindgren, J. Ludvigsson, et et al., Development of insulin antibodies, metabolic control and B-cell function in newly diagnosed insulin dependent diabetic children treated with monocomponent human insulin or monocomponent porcine insulin. *Diabetes Res*, 1988. 9: p. 169-75.
289. Lindholm, A., L.B. Jensen, P.D. Home, P. Raskin, B.O. Boehm, et J. Rastam, Immune responses to insulin aspart and biphasic insulin aspart in people with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes care*, 2002. 25: p. 876-82.
290. Vendrell, J., E. Querol, et F.X. Aviles, Metalloprotease and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1477: p. 284-98.
291. Davidson, H.W.etJ.C. Hutton, The insulin-secretory-granule carboxypeptidase H. Purification and demonstration of involvement in proinsulin processing. *Biochem J*, 1987. 245: p. 575-82.
292. Matthews, K.W., S.L. Mueller-Ortiz, et R.A. Wetsel, Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation. *Mol Immunol*, 2004. 40: p. 785-93.
293. Bouma, B.N.etJ.C. Meijers, Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). *J Thromb Haemost*, 2003. 1: p. 1566-74.
294. Bouma, B.N., P.F. Marx, L.O. Mosnier, et J.C. Meijers, Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). *Thromb Res*, 2001. 101: p. 329-54.
295. Hori, Y., E.C. Gabazza, Y. Yano, A. Katsuki, K. Suzuki, Y. Adachi, et Y. Sumida, Insulin resistance is associated with increased circulating level of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87: p. 660-5.
296. Aubert, H., C. Frere, M.F. Aillaud, P.E. Morange, I. Juhan-Vague, et M.C. Alessi, Weak and non-independent association between plasma TAFI antigen levels and the insulin resistance syndrome. *Journal of thrombosis and haemostasis JTH*, 2003. 1: p. 791-7.
297. Carr, M.E., Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *Journal of diabetes and its complications*, 2001. 15: p. 44-54.

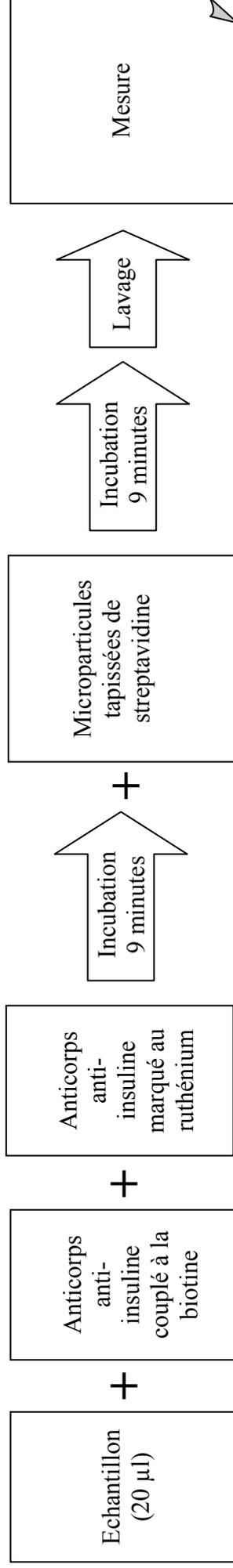
298. Grimaldi, A., J.M. Brun, B. Vialettes, S. Halimi, L. Vaur, I. Dubroca, et A. Blayo, Equivalent efficacy of dinner or bedtime administration of insulin glargine combined with regular or fast-acting analogues in type 1 diabetes [Résumé]. *Diabetologia*, 2004. 47 (Suppl 1): p. Abs 845.

ANNEXE 1

Bi-insulin IRMA



Insuline Elecsys



ANNEXE 2

Tableau récapitulatif des réactivités croisées des analogues de l'insuline avec les dosages Bi-insulin IRMA et Insuline Elecsys calculées pour une concentration de 30 mU/l (ou 200 pmol/l avec les métabolites de la glargine) en milieu tampon (PBS 1% albumine) et en milieu sérique (pool de sérums).

Milieu	Bi-insulin IRMA		Insuline Elecsys	
	PBS 1% Albumine	Pool de sérums	PBS 1% Albumine	Pool de sérums
Lispro	104%	74%	< 0,1%	< 0,1%
Asparte	92%	68%	< 0,1%	< 0,1%
Glargine				
<i>Intacte</i>	145%	-	< 0,1%	-
<i>M1</i>	137%	-	22%	-
<i>M2</i>	126%	-	< 0,2%	-
Détémir	224%	199%	< 0,1%	< 0,1%

ANNEXE 3

ANNEXE 4

Dosage d'insuline lispro (Humalog®)

La concentration en insuline lispro peut être déterminée par le calcul.

Ce calcul n'est pas applicable dans les cas suivants :

- traitement par d'autres analogues de l'insuline ;
- prélèvement hémolysé.

Afin de pouvoir effectuer ce calcul, merci de compléter de façon exhaustive le tableau ci-dessous :

Etiquette Patient

Date du prélèvement :

Heure de prélèvement :

Insulinothérapie administrée au patient dans les **24 heures précédant le prélèvement**

Insuline	Nom commercial	Mode d'administration	Date et heure d'administration	Doses Débit / pompe
Lispro	Humalog			
	Humalog Mix25			
	Humalog Mix50			
Autres insulines				

Ne pas écrire, réservé au laboratoire :

Bi-insulin IRMA.....

Insuline Elecsys.....

Insuline lispro = Bi-insulin IRMA – Insuline Elecsys =

ANNEXE 5

Dosage d'insuline asparte (Novorapid[®] ou Novomix[®])

La concentration en insuline asparte peut être déterminée par le calcul.

Ce calcul n'est pas applicable dans les cas suivants :

- traitement par d'autres analogues de l'insuline ;
- prélèvement hémolysé.

Afin de pouvoir effectuer ce calcul, merci de compléter de façon exhaustive le tableau ci-dessous :

Etiquette Patient

Date du prélèvement :

Heure de prélèvement :

Insulinothérapie administrée au patient dans les **24 heures précédant le prélèvement**

Insuline	Nom commercial	Mode d'administration	Date et heure d'administration	Doses Débit / pompe
Asparte	Novorapid			
	Novomix 30			
Autres insulines				

Ne pas écrire, réservé au laboratoire :

Bi-insulin IRMA.....

Insuline Elecsys.....

Insuline asparte = Bi-insulin IRMA – Insuline Elecsys =

ANNEXE 6

Dosage d'insuline détémir (Levemir®)

La concentration en insuline détémir peut être déterminée par le calcul.
Ce calcul n'est pas applicable dans les cas suivants :

- traitement par d'autres analogues de l'insuline ;
- prélèvement hémolysé.

Afin de pouvoir effectuer ce calcul, merci de compléter de façon exhaustive le tableau ci-dessous :

Etiquette Patient

Date du prélèvement :

Heure de prélèvement :

Insulinothérapie administrée au patient dans les **24 heures précédant le prélèvement**

Insuline	Nom commercial	Mode d'administration	Date et heure d'administration	Doses Débit / pompe
Détémir	Levemir			
Autres insulines				

Ne pas écrire, réservé au laboratoire :

Bi-insulin IRMA.....

Insuline Elecsys.....

Insuline détémir = (Bi-insulin IRMA – Insuline Elecsys) / **1,99** =

ANNEXE 7

Use of insulin immunoassays in clinical studies involving rapid-acting insulin analogues: Bi-insulin IRMA preliminary assessment

Arnaud Agin, Nathalie Jeandidier, Françoise Gasser, Daniel Grucker and Rémy Sapin

Clinical chemistry and Laboratory medicine, 2006, Vol. 44, Pages 1379–1382

Copyright 2006 by Walter de Gruyter • Berlin • New York

Annexe 7

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2006.257>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

ANNEXE 8



This article was originally published in a journal published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

**Glargine blood biotransformation: in vitro appraisal with human insulin
immunoassay**

A. AGIN, N. JEANDIDIER, F. GASSER, D. GRUCKER, R. SAPIN

Diabetes & Metabolism, 2007, Vol. 33, Pages 205–212

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Annexe 8 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2006.12.002>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>